



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

(21) BR 112021000347-9 A2



(22) Data do Depósito: 11/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO VARIANTE PD1-4-1BBL E MÉTODOS DE USO DA MESMA

(51) Int. Cl.: C07K 14/705; C07K 19/00; A61P 35/00; A61K 38/17.

(30) Prioridade Unionista: 11/07/2018 US 62/696,365; 31/12/2018 US 62/786,599.

(71) Depositante(es): KAHR MEDICAL LTD..

(72) Inventor(es): PECKER, IRIS; BLOCH, ITAI.

(86) Pedido PCT: PCT IL2019050782 de 11/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/012485 de 16/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 08/01/2021

(57) Resumo: PROTEÍNA DE FUSÃO VARIANTE PD1-4-1BBL E MÉTODOS DE USO DA MESMA. Todos fornecidos na presente invenção; assim como também são fornecidos polipeptídeos isolados que compreendem uma variante de PD1 ou uma variante de 4-1BBL, e polinucleotídeos e construtos de ácido nucleico que codificam a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado, células hospedeiras que expressam os mesmos e métodos de uso dos mesmos.

MEAPAQLLEFLLLLWLPDTTCHHHHHHPGWFLDSPDRPWNPTFS  
PALLVVTGDNATFTCSFSNTSEFVLNWRMSPSNQTDLAAAF  
PEDRSQPGQDCRFVTLNPNRDFHMSVVRARNDSGTLYCGAI  
SLAPKAQIKESLRAELRVTERAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV  
GACFWAVSGARASPGSAASPRLEGPESLSPDDPAGLLDLRQGMF  
AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA  
KAGVYYVFFQLELRRVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA  
LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH  
AWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGLSPSRSE

## **“PROTEÍNA DE FUSÃO VARIANTE PD1-4-1BBL E MÉTODOS DE USO DA MESMA”**

### Pedido Relacionado

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade sob o Código Norte-Americano de Leis 35 USC §119(e) do Pedido de Patente Provisório Norte-Americana nº 62/696,365 depositado em 11 de julho de 2018 e do Pedido de Patente Provisório dos EUA nº 62/786,599 depositado em 31 de dezembro de 2018, os conteúdos dos quais são incorporados aqui por referência em suas totalidades.

### Declaração de Listagem de Sequências

[0002] O arquivo ASCII, intitulado 76050SequenceListing.txt, criado em 7 de julho de 2019, compreendendo 268 kilobytes, submetido simultaneamente com o depósito deste pedido é aqui incorporado por referência.

### Antecedentes da Invenção

[0003] A presente invenção, em algumas modalidades da mesma, se refere a uma proteína de fusão variante PD1-4-1BBL e métodos de uso da mesma.

[0004] Proteínas de Sinalização Dupla (*DSP*), também conhecidas como Proteínas Conversoras de Sinal (*SCP*), que são atualmente conhecidas na técnica como proteínas de fusão bifuncionais que ligam uma porção extracelular de uma proteína de membrana tipo I (terminal amino extracelular), a uma porção extracelular de uma proteína de membrana do tipo II (terminal carboxila extracelular), formando uma proteína de fusão com dois lados ativos (ver, por exemplo, patentes norte-americanas nºs 7,569,663 e 8,039,437).

[0005] PD1 é um receptor co-inibitório de superfície da superfamília das imunoglobulinas. PD1 é expresso em células T, células B, monócitos, células exterminadoras naturais, células dendríticas e muitos

linfócitos infiltrantes de tumor (TILs). PD1 tem dois ligantes: PDL1 (também denominado B7H1; CD274) e PDL2 (B7DC; CD273), que são ambos co-inibidores. PDL1 é expresso em células T em repouso e ativadas, células B, células dendríticas, macrófagos, células endoteliais vasculares e células das ilhotas pancreáticas. PDL1 também é conhecido por ser expresso em vários tipos de câncer, especialmente em NSCLC, melanoma, carcinoma de células renais, câncer gástrico, hepatocelular, bem como cutâneo e vários cânceres de leucemia, mieloma múltiplo e outros. A expressão de PDL2 é observada em macrófagos e células dendríticas sozinhas e é muito menos prevalente do que PDL1 em todos os tipos de tumor. A expressão de PDL1 é induzida por múltiplas moléculas pró-inflamatórias, incluindo IFN- $\gamma$  tipos I e II, TNF- $\alpha$ , LPS, GM-CSF e VEGF, bem como as citocinas IL-10 e IL-4, sendo IFN- $\gamma$  o indutor mais potente. O microambiente tumoral regula positivamente a expressão de PDL1, promovendo assim a supressão imunológica. Em resposta ao ataque imunológico, as células cancerosas superexpressam PDL1, que se liga ao receptor PD1 nas células T, inibindo a ativação das células T, suprimindo assim o ataque das células T e induzindo o escape imunológico do tumor. A via PD1/PDL1 regula a supressão imunológica por vários mecanismos:

- Induz apoptose de células T ativadas;
- Restringe a atividade dos linfócitos T citotóxicos (CTL-CD8);
- Inibe a proliferação de células T;
- Facilita a anergia e exaustão das células T;
- Aumenta a função das células T reguladoras; e
- Restringe a ativação de células T prejudicadas e a produção de IL-2.

[0006] 4-1BBL é o ligante ativador do receptor 4-1BB (CD137), um membro da superfamília de receptores TNF e uma potente molécula coestimuladora de células T induzida por ativação. 4-1BBL forma naturalmente um homo-trímero, mas a sinalização via 4-1BB requer oligomerização significativa

de 4-1BBL. 4-1BBL está presente em uma variedade de células apresentadoras de antígeno (APCs), incluindo células dendríticas (DCs), células B e macrófagos. O receptor 4-1BB não é detectado (<3%) em células T ou linhas de células T em repouso; no entanto, 4-1BB é regulado positivamente de forma estável quando as células T são ativadas. A ativação de 4-1BB regula positivamente os genes de sobrevivência, aumenta a divisão celular, induz a produção de citocinas e evita a morte celular induzida pela ativação em células T.

[0007] Antecedentes adicionais da técnica incluem:

- Maute *et al.* PNAS, 24 de novembro de 2015; 112 (47): E6506-14;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2018053885;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2018032793;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2018006881;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2013144704;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2016022994;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2010027828;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2018085358;
- Publicação do Pedido de Patente Chinês nº CN 107857819;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2017194641;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO 2014180288;

- Publicação do pedido de patente internacional nº WO2017059168;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO2001/049318;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO2016/139668;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO2014/106839;
- Publicação do pedido de patente internacional nº WO2012/042480;
- Publicação do pedido de patente norte-americana nº 20150183881;
- Publicação do pedido de patente norte-americana nº US20070110746;
- Publicação do pedido de patente norte-americana nº US20070036783; e
- Patente norte-americana nº US9562087.

#### Objetivos da Invenção

[0008] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, ou tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e/ou

em que a sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreende um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreende um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3 ou tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou

(bb) compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL;

e em que a proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o 4-1BB.

[0009] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a

partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e/ou

em que a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que a proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o 4-1BB.

[0010] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou em que a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que a proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o 4-1BB.

[0011] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo um ligante (GGGS)<sub>n</sub> (n = 1-4) entre o PD1 e o 4-1BBL, em que a proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o 4-1BB.

[0012] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 145.

[0013] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 145.

[0014] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 145.

[0015] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, em que a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, ou tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreende um

segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e em que o polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

[0016] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, em que a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e em que o polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

[0017] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, em que a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e em que o polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

[0018] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com um a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e

129 e não compreende um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, ou tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreende um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3; e opcionalmente compreende três repetições da sequência de aminoácidos 4-1BBL; e em que o polipeptídeo é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar 4-1BB,

(ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o 4-1BB.

[0019] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que o polipeptídeo é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar 4-1BB,

(ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o 4-1BB.

[0020] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 não tem mais do que 140 aminoácidos de comprimento.

[0021] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 126 aminoácidos de comprimento.

[0022] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 19, 20 ou 21.

[0023] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89 ou 93.

[0024] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 ou 115.

[0025] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 117 ou 119.

[0026] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95.

[0027] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95.

[0028] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73.

[0029] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18.

[0030] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 19, 20 ou 21.

[0031] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89 ou 93.

[0032] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 ou 115.

[0033] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 117 ou 119.

[0034] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95.

[0035] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95.

[0036] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 73.

[0037] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18.

[0038] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 22-24.

[0039] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos A1-V6 ou A1-G14 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0040] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0041] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0042] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 125, 127 ou 129.

[0043] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 125, 127 ou 129.

[0044] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 123.

[0045] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 123.

[0046] De acordo com algumas modalidades da invenção, a proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende um ligante entre o PD1 e o 4-1BBL.

[0047] De acordo com algumas modalidades da invenção, a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado compreende um ligante entre cada uma das três repetições da sequência de aminoácidos 4-1BBL.

[0048] De acordo com algumas modalidades da invenção, o ligante tem um comprimento de um a seis aminoácidos.

[0049] De acordo com algumas modalidades da invenção, o ligante é um ligante de aminoácido único.

[0050] De acordo com algumas modalidades da invenção, o ligante é glicina.

[0051] De acordo com algumas modalidades da invenção, o ligante não é um domínio Fc de um anticorpo ou um fragmento do mesmo.

[0052] De acordo com algumas modalidades da invenção, o ligante é um domínio Fc de um anticorpo ou um fragmento do mesmo.

[0053] De acordo com algumas modalidades da invenção, o ligante é um ligante (GGGGS)<sub>n</sub> (n = 1-4) (SEQ ID NO: 149).

[0054] De acordo com algumas modalidades da invenção, a proteína de fusão PD1-4-1BBL está em uma forma de pelo menos um homo-trímero.

[0055] De acordo com algumas modalidades da invenção, o pelo menos homo-trímero tem pelo menos 100 kD de peso molecular conforme determinado por SEC-MALS.

[0056] De acordo com algumas modalidades da invenção, a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado é solúvel.

[0057] De acordo com algumas modalidades da invenção, o rendimento de produção da proteína de fusão é pelo menos 1,5 vezes maior do que o rendimento de produção de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção, as condições de produção compreendem expressão em uma célula de mamífero e cultura a 32-37 °C, 5-10% CO<sub>2</sub> por 5-13 dias.

[0058] De acordo com algumas modalidades da invenção, a quantidade de agregados da proteína de fusão é pelo menos 20% menor do que a quantidade de agregados de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção, os agregados têm pelo menos 300 kDa de peso molecular e as condições de produção compreendem a expressão em uma célula de mamífero e cultura a 32-37 °C, 5-10% de CO<sub>2</sub> por 5-13 dias.

[0059] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0060] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0061] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0062] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0063] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma

sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107.

[0064] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16 e 44-56.

[0065] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16.

[0066] De acordo com algumas modalidades da invenção, pelo menos 80% de identidade compreende pelo menos 90% de identidade.

[0067] De acordo com algumas modalidades da invenção, pelo menos 80% de identidade compreende pelo menos 95% de identidade.

[0068] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0069] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0070] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0071] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0072] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107.

[0073] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16 e 44-56.

[0074] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16.

[0075] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0076] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0077] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0078] De acordo com algumas modalidades da invenção,

a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0079] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107.

[0080] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16 e 44-56.

[0081] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16.

[0082] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um polinucleotídeo que codifica a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado.

[0083] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um construto de ácido nucleico que compreende o polinucleotídeo e um elemento regulador para direcionar a expressão do polinucleotídeo em uma célula hospedeira.

[0084] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108, 112, 114, 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148.

[0085] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108 e 112.

[0086] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106, 108 e 112.

[0087] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106 e 108.

[0088] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72.

[0089] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 70-72.

[0090] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148.

[0091] De acordo com algumas modalidades da invenção, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 146.

[0092] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma célula hospedeira que compreende a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo ou o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico.

[0093] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para produzir uma proteína de fusão PD1-4-1BBL ou um polipeptídeo, o método compreendendo expressar em uma célula hospedeira o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico.

[0094] De acordo com algumas modalidades da invenção, o método compreende isolar a proteína de fusão ou o polipeptídeo.

[0095] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método de tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado, o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico ou a célula hospedeira.

[0096] De acordo com algumas modalidades da invenção, o método compreende ainda administrar ao indivíduo um agente terapêutico para o tratamento da doença.

[0097] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado, o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico ou a célula hospedeira, para uso no tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes.

[0098] De acordo com algumas modalidades da invenção, a composição compreende ainda um agente terapêutico para o tratamento da doença.

[0099] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um artigo de fabricação que compreende um material de embalagem que acondiciona um agente terapêutico para o tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes; e a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado, o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico ou a célula hospedeira.

[0100] De acordo com algumas modalidades da invenção, as células da doença expressam PDL1.

[0101] De acordo com algumas modalidades da invenção, a doença compreende uma doença hiperproliferativa.

[0102] De acordo com algumas modalidades da invenção, a doença hiperproliferativa compreende esclerose, fibrose, fibrose pulmonar

idiopática, psoríase, esclerose/esclerodermia sistêmica, colangite biliar primária, colangite esclerosante primária, fibrose hepática, prevenção de fibrose pulmonar induzida por radiação, mielofibrose ou fibrose retroperitoneal.

[0103] De acordo com algumas modalidades da invenção, a doença hiperproliferativa compreende câncer.

[0104] De acordo com algumas modalidades da invenção, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em linfoma, leucemia e carcinoma.

[0105] De acordo com algumas modalidades da invenção, a doença compreende uma doença associada à imunossupressão ou imunossupressão induzida por medicamentos.

[0106] De acordo com algumas modalidades da invenção, a doença compreende HIV, sarampo, influenza, LCCM, RSV, rinovírus humano, EBV, CMV ou Parvo vírus.

[0107] De acordo com algumas modalidades da invenção, a doença compreende uma infecção.

[0108] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método de ativação de células imunes, o método compreendendo a ativação *in vitro* de células imunes na presença da proteína de fusão PD1-4-1BBL ou do polipeptídeo isolado, do polinucleotídeo ou do construto de ácido nucleico ou da célula hospedeira.

[0109] De acordo com algumas modalidades da invenção, a ativação é na presença de células que expressam PDL1 ou PDL1 exógeno.

[0110] De acordo com algumas modalidades da invenção, as células que expressam o PDL1 compreendem células patológicas.

[0111] De acordo com algumas modalidades da invenção, as células patológicas compreendem células cancerosas.

[0112] De acordo com algumas modalidades da invenção, a ativação é na presença de um agente anticâncer.

[0113] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente terapêutico para o tratamento da doença ou o agente anticâncer compreende um anticorpo.

[0114] De acordo com algumas modalidades da invenção, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste em rituximabe, cetuximabe, trastuzumabe, edrecolomabe, almetuzumabe, gemtuzumabe, ibritumomabe, panitumumabe, Belimumabe, Bevacizumabe, Bivatuzumabe mertansina, Blinatumomabe, Blontuvetmabe, Brentuximabe vedotin, Catumaxomabe, Cixutumumabe, Daclizumabe, Adalimumabe, Bezlotoxumabe, Certolizumabe pegol, Citatuzumabe bogatox, Daratumumabe, Dinutuximabe, Elotuzumabe, Ertumaxomabe, Etaracizumabe, Gemtuzumabe ozogamicina, Girentuximabe, Necitumumabe, Obinutuzumabe, Ofatumumabe, Pertuzumabe, Ramucirumabe, Siltuximabe, Tositumomabe, Trastuzumabe e ipilimumabe.

[0115] De acordo com algumas modalidades da invenção, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste em rituximabe e cetuximabe.

[0116] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente terapêutico para o tratamento da doença ou o agente anticâncer compreende um IMiD (por exemplo, Talidomida, Lenalidomida, Pomalidomida).

[0117] De acordo com algumas modalidades da invenção, o método compreende a transferência adotiva das células imunes após a ativação para um indivíduo em necessidade do mesmo.

[0118] De acordo com algumas modalidades da invenção, as células imunes compreendem células T.

[0119] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e/ou científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por alguém versado na técnica à qual a invenção pertence. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática ou teste de modalidades da

invenção, métodos e/ou materiais exemplares são descritos abaixo. Em caso de conflito, o relatório descritivo da patente, incluindo as definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser necessariamente limitantes.

#### Breve Descrição das Diversas Vistas dos Desenhos

[0120] Algumas modalidades da invenção são aqui descritas, apenas a título de exemplo, com referência aos desenhos anexos. Com referência específica agora aos desenhos em detalhes, é enfatizado que os detalhes mostrados são a título de exemplo e para fins de discussão ilustrativa de modalidades da invenção. A este respeito, a descrição feita com os desenhos torna aparente para aqueles versados na técnica como modalidades da invenção podem ser praticadas.

[0121] Nos desenhos:

- A Figura 1 é uma representação esquemática da proteína de fusão PD1-4-1BBL aqui referida como “DSP105” (SEQ ID NO: 5) compreendendo um peptídeo sinal N-terminal e uma His-tag (SEQ ID NO: 26). Mostrado o peptídeo sinal (sublinhado em preto, SEQ ID NO: 4), a His-tag N-terminal (negrito em preto), o domínio PD1 (vermelho, SEQ ID NO: 2), o ligante de glicina (preto) e o domínio 4-1BBL (azul, SEQ ID NO: 3) e

- As Figuras 2A-D demonstram a estrutura 3D prevista de DSP105 (SEQ ID NO: 5). A Figura 2A é um modelo 3D esquemático. PD1 é mostrado em fitas cinzas, PDL1 (ligante PD1) é mostrado em fitas verdes, 4-1BBL é mostrado em fitas azuis e 2 cópias adicionais de 4-1BBL (formando o trímero) são mostradas em azul claro. A Figura 2B é um modelo 3D totalmente atômico esquemático. As Figuras 2C-D são modelos 3D esquemáticos. Os domínios resolvidos por raios X são representados por sua superfície e coloridos por uma escala de hidrofobicidade - azul (mais hidrofílico) a marrom (hidrofóbico).

- A Figura 3 é uma representação esquemática do domínio

e segmentos identificados em *DSP105* (SEQ ID NO: 5). Um domínio do tipo V semelhante a Ig é destacado em azul claro (a sequência sublinhada foi resolvida em raios-X), uma parte resolvida por raios-X é destacada em cinza e as regiões flanqueadoras/não estruturadas são marcadas com caixas vermelhas.

- A Figura 4 demonstra a estrutura 3D prevista da proteína de fusão variante PD1-4-1BBL aqui referida como “*DSP105\_var1*” (SEQ ID NO: 12). No painel superior, os domínios resolvidos por raios-X são exibidos na representação de superfície colorida pela escala de hidrofobicidade - Azul (mais hidrofílico) a Marrom (Hidrofóbico). PDL1 (ligante PD1) é apresentado em fitas verdes. No painel inferior, 4-1BBL é apresentado em fitas vermelhas e PD1 em fitas azuis.

- A Figura 5 demonstra a estrutura 3D prevista da proteína de fusão variante PD1-4-1BBL aqui referida como “*DSP105\_var2*” (SEQ ID NO: 14). O código de cores é o mesmo da Figura 4.

- A Figura 6 demonstra a estrutura 3D prevista da proteína de fusão variante PD1-4-1BBL aqui referida como “*DSP105\_var3*” (SEQ ID NO: 16). O código de cores é o mesmo da Figura 4.

- A Figura 7 apresenta imagens de análise SDS-PAGE de *DSP105* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 1), expresso em células Expi293; e *DSP105\_var17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), expresso em CHO-3E7. Ambas as proteínas de fusão foram purificadas por uma purificação de afinidade em uma única etapa em uma coluna de níquel e separadas em condições redutoras e não redutoras, conforme indicado. As amostras apresentadas nas imagens são as seguintes: Pista M - marcador de peso molecular; Pistas 1-2: Duas preparações separadas de *DSP105* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 1), Pista 3 - *DSP105\_var17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99).

- As Figuras 8A-E apresentam imagens de análise de SDS-PAGE (marcada como PAGE) e análise de Western Blot (marcada como WB)

usando o anticorpo indicado das proteínas de fusão variantes PD1-4-1BBL produzidas em células CHO-3E7. São mostradas proteínas de fusão variantes PD1-4-1BBL aqui referidas como “*DSP105\_var17* marcado com His N-terminal” (SEQ ID NO: 99, Figura 8A), “*DSP105\_var18*” (SEQ ID NO: 101, Figura 8B), “*DSP105\_var19*” (SEQ ID NO: 103, Figura 8C), “*DSP105\_var20*” (SEQ ID NO: 105, Figura 8D) e “*DSP105\_var23*” (SEQ ID NO: 113, Figura 8E) sob condições redutoras ou não redutoras. As amostras apresentadas nas imagens são as seguintes: Pista M - marcador de peso molecular; Pistas 1 a 3 - sobrenadantes de cultura de células coletados no dia 2, dia 4 e dia 5 pós-transfecção, respectivamente, sob condições redutoras; Pista NC1 - controle negativo sob condições redutoras; Pistas 4 a 6 - sobrenadantes de cultura de células coletados no dia 2, dia 4 e dia 5 após a transfecção, respectivamente, sob condições não redutoras; Pista NC2 - controle negativo em condições não redutoras; e pista P - etiqueta múltipla (GenScript, Cat.No. M0101) como um controle positivo.

- As Figuras 9A-B apresentam imagens de análise SDS-PAGE das proteínas de fusão variantes PD1-4-1BBL produzidas em células Expi293F. São mostradas proteínas de fusão variantes PD1-4-1BBL aqui referidas como “*DSP105\_var17* marcado com His N-terminal” (SEQ ID NO: 99), “*DSP105\_var17*” (SEQ ID NO: 97), “*DSP105\_var20*” (SEQ ID NO: 105), “*DSP105\_var23*” (SEQ ID NO: 113), “*DSP105\_var22* marcado com His” (SEQ ID NO: 110), “*DSP105* marcado com His” (SEQ ID NO: 1), “*DSP105\_var24*” (SEQ ID NO: 133), “*DSP105\_var25*” (SEQ ID NO: 135) e “*DSP105\_var31*” (SEQ ID NO: 147), sob condições redutoras (Figura 9A) ou não redutoras (Figura 9B).

- As Figuras 10A-C apresentam análise de citometria de fluxo que demonstra a ligação de *DSP105\_var17* (SEQ ID NO: 99) a células que expressam PDL1 ou 41BB. A Figura 10A demonstra a expressão dos receptores indicados nas linhas celulares DLD1-PDL1 ou HT1080-41BB. O nível de expressão de superfície de PDL1 ou 41BB foi determinado por imunocoloração de cada linha celular com os anticorpos correspondentes, seguido por análise de

citometria de fluxo. As Figuras 10B-C demonstram a ligação de *DSP105\_var17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99) a linhas celulares DLD1-PD1 ou HT1080-41BB.

- A Figura 11 apresenta análise de citometria de fluxo que demonstra a expressão do receptor 4-1BB na linha celular HT1080-4-1BB.

- A Figura 12 apresenta um gráfico que demonstra que a proteína *DSP105\_var17* marcada com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), proteína *DSP105 var\_17* (SEQ ID NO: 97), proteína *DSP105 var\_21* (SEQ ID NO: 107) e PD1-4-1BBL var\_22 marcada com His (SEQ ID NO: 110), promove a sinalização de 4-1BBL/4-1BB como demonstrado pelos valores de OD indicando os níveis de secreção de IL-8 de células HT1080-4-1BB, após a ligação das moléculas *DSP105*.

- As Figuras 13A-D demonstram a estrutura 3D prevista da fusão variante PD1-4-1BBL aqui referida como "*DSP105\_V31*" (SEQ ID NO: 147). A Figura 13A é um modelo de fita 3D esquemático. PD1 é representado em fitas cinza escuras (lado direito), 41BB-L é representado em fitas pretas (lado esquerdo), segmentos de ligantes são representados em fitas brancas entre os elementos estruturais de PD1 e 41BB-L. A Figura 13B é um modelo de exibição de superfície 3D esquemático. PD1 é representado em uma tela de superfície cinza escura (lado direito), 41BB-L é representado em uma tela de superfície preta (lado esquerdo), os segmentos de ligantes são representados em fitas brancas entre os elementos estruturais de PD1 e 41BB-L. A Figura 13C é um modelo de fita 3D esquemático da proteína de fusão e suas contrapartes de ligação. PD1 é representado em fitas cinza escuras (lado direito), 41BB-L é representado em fitas pretas (lado esquerdo), segmentos de ligantes são representados em fitas brancas entre os elementos estruturais de PD1 e 41BB-L, PD-L1 ligado a PD1 é representado em fitas cinzas (lado direito) e três receptores 41BB são representados em fitas cinzas no complexo com 41BB-L (lado esquerdo). A Figura 13D é um modelo de exibição de superfície 3D esquemático da proteína de fusão e suas contrapartes de ligação. PD1 é

representado em uma tela de superfície cinza escura (lado direito), 41BB-L é representado em uma tela de superfície preta (lado esquerdo), segmentos de ligantes são representados em fitas brancas entre os elementos estruturais de PD1 e 41BB-L, PD-L1 ligado a PD1 é representado em fitas cinzas (lado direito) e três receptores 41BB são representados em fitas cinzas no complexo com 41BB-L (lado esquerdo).

#### Descrição de Modalidades Detalhadas da Invenção

[0122] A presente invenção, em algumas modalidades da mesma, se refere a uma proteína de fusão variante PD1-4-1BBL e métodos de uso da mesma.

[0123] Antes de explicar pelo menos uma modalidade da invenção em detalhes, deve ser entendido que a invenção não é necessariamente limitada em sua aplicação aos detalhes estabelecidos na descrição a seguir ou exemplificados pelos Exemplos. A invenção é capaz de outras modalidades ou de ser praticada ou realizada de várias maneiras.

[0124] Proteínas de Sinalização Dupla (*DSP*), também conhecidas como Proteínas Conversoras de Sinal (*SCP*), que são atualmente conhecidas na técnica como proteínas de fusão bifuncionais que ligam uma porção extracelular de uma proteína de membrana tipo I (terminal amino extracelular), a uma porção extracelular de uma proteína de membrana do tipo II (terminal carboxila extracelular), formando uma proteína de fusão com dois lados ativos.

[0125] Empregando ferramentas estruturais-funcionais, os presentes inventores foram capazes de gerar proteínas de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma variante PD1 e/ou uma variante 4-1BBL com características de produção melhoradas (por exemplo, maior rendimento, menor porcentagem de agregados); e que podem ser vantajosamente usadas para ativar células imunes (via coestimulação) em geral e tratar doenças que podem se beneficiar da ativação de células imunes (por exemplo, câncer) em particular.

[0126] Sem estar limitado pela teoria, o seguinte é sugerido pelos inventores como um modo de ação da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da invenção no tratamento do câncer como um exemplo:

[0127] Devido à expressão relativamente alta de PDL1 na superfície das células tumorais e no microambiente tumoral, a fração PD1 da químera PD1-4-1BBL direciona a molécula para os locais de tumor e metástase, levando à ligação da fusão ao PDL1 dentro do microambiente tumoral.

[0128] Direcionar a proteína de fusão para as células tumorais ou/e microambiente tumoral facilita um aumento na concentração de PD1-4-1BBL no microambiente tumoral e subsequente oligomerização da fração 4-1BBL da proteína de fusão no local do tumor. Uma vez que a oligomerização de 4-1BBL é uma etapa necessária para a sinalização de 4-1BB, esta ligação e oligomerização de 4-1BBL fornece um sinal coestimulador de 4-1BB que promove a ativação de células T, células B, células NK, especialmente linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), e outras células do sistema imunológico no local do tumor, para exterminar as células cancerosas.

[0129] Além do sinal coestimulador 4-1BBL - 4-1BB, a ligação da fração PD1 da proteína de fusão ao PDL1 no local do tumor compete com o PD1 endógeno expresso em células T; assim, removendo a inibição nas células T e contribuindo ainda mais para a ativação de TILs no microambiente tumoral.

[0130] Espera-se que as atividades acima de PD1-4-1BBL levem a um efeito sinérgico na ativação de TILs dentro do microambiente tumoral, que se espera que seja um efeito mais específico e mais robusto em comparação com o efeito de cada fração separadamente, bem como ao usar as duas porções diferentes dos mesmos em combinação.

[0131] Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, ou tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e/ou em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreende um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreende um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3 ou tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou;

(bb) compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL;

e em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0132] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e/ou

em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 22-25; e em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0133] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ

ID NO: 18-21 e não compreende qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2 e/ou em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

- i) ligar PDL1 e 4-1BB;
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0134] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecida uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo um ligante (GGGGS)<sub>n</sub> (n = 1-4) entre o referido PD1 e o referido 4-1BBL, em que a referida fusão proteína é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar PDL1 e 4-1BB;
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0135] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; ou tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos

selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e em que o referido polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

[0136] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e em que o referido polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

[0137] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e em que o referido polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

[0138] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos

selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreende um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, ou tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreende um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3; e opcionalmente compreende três repetições da referida sequência de aminoácidos 4-1BBL; e em que o referido polipeptídeo é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar 4-1BB,
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0139] De acordo com uma alternativa ou um aspecto adicional da presente invenção, é fornecido um polipeptídeo isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que o referido polipeptídeo é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar 4-1BB,
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0140] Como usado aqui, o termo “PD1 (*Programmed Death 1*, também conhecido como CD279)” refere-se ao polipeptídeo do gene

PDCD1 (Gene ID 5133) ou um homólogo funcional, por exemplo, fragmento funcional do mesmo. De acordo com modalidades específicas, o termo “PD1” se refere a um homólogo funcional do polipeptídeo PD1. De acordo com modalidades específicas, PD1 é PD1 humano. De acordo com uma modalidade específica, a proteína PD1 refere-se à proteína humana, tal como fornecida no seguinte Número de GenBank NP\_005009.

[0141] Dois ligantes para PD-1 foram identificados até agora, PDL1 e PDL2 (também conhecido como B7-DC). De acordo com uma modalidade específica, a proteína PDL1 refere-se à proteína humana, tal como fornecida nos seguintes Números de GenBank NP\_001254635 e NP\_054862. De acordo com uma modalidade específica, a proteína PDL2 refere-se à proteína humana, tal como fornecida no seguinte Número de GenBank NP\_079515.

[0142] Como usada aqui, a frase “homólogo funcional” ou “fragmento funcional” quando relacionado a PD1 se refere a uma porção do polipeptídeo que mantém a atividade de PD1 de comprimento total, por exemplo, ligação de PD-L1.

[0143] Os ensaios para testar a ligação são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a, citometria de fluxo, BiaCore, ensaio de interferometria de bio-camada Blitz®, HPLC.

[0144] De acordo com modalidades específicas, o PD1 liga PD-L1 com um Kd de 1 nM-100  $\mu$ M, 10 nM-10  $\mu$ M, 100 nM-100  $\mu$ M, 200 nM-10  $\mu$ M, conforme determinado pela análise SPR, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0145] De acordo com modalidades específicas, o PD1 se liga ao PDL1 com um Kd de cerca de 270 nM conforme determinado pela análise de SPR.

[0146] De acordo com modalidades específicas, o PD1 se liga ao PDL1 com um Kd de cerca de 8-9  $\mu$ M, conforme determinado pela análise de SPR.

[0147] De acordo com modalidades específicas, o PD1 compreende um domínio extracelular do referido PD1 ou um fragmento funcional do mesmo.

[0148] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 27.

[0149] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 27.

[0150] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 28.

[0151] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 28.

[0152] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 2.

[0153] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 2.

[0154] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 29.

[0155] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 29.

[0156] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 30 ou SEQ ID NO: 31.

[0157] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 30 ou SEQ ID NO: 31.

[0158] O termo “PD1” também abrange homólogos funcionais (de ocorrência natural ou produzidos sinteticamente/recombinantemente), que exibem a atividade desejada (isto é, ligação a PD-L1 e/ou PD-L2). Tais homólogos podem ser, por exemplo, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos

82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos ou homólogos ao polipeptídeo SEQ ID NO: 2, 27, 30 ou 31; ou pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos à sequência de polinucleotídeo que codifica os mesmos (como descrito adicionalmente a seguir).

[0159] De acordo com modalidades específicas, os homólogos funcionais de PD1 são pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos ou homólogos ao polipeptídeo SEQ ID NO: 2, 27, 30 ou 31; ou pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos à sequência de polinucleotídeo que codifica os mesmos (como descrito adicionalmente a seguir).

[0160] Como usado aqui, “identidade” ou “identidade de sequência” refere-se à identidade global, ou seja, uma identidade sobre todas as sequências de aminoácidos ou ácidos nucleicos divulgadas aqui e não sobre suas porções.

[0161] A identidade ou homologia da sequência pode ser determinada usando qualquer proteína ou algoritmo de alinhamento de sequência de ácido nucleico, como Blast, ClustalW e MUSCLE.

[0162] O homólogo também pode se referir a um ortólogo, uma deleção, inserção, ou variante de substituição, incluindo uma substituição de aminoácido, como descrito adicionalmente a seguir.

[0163] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo PD1 pode compreender substituições conservativas e não conservativas de aminoácidos (também referidas aqui como mutações). Tais substituições são conhecidas na técnica e divulgadas, por exemplo, em Maute *et al. PNAS*. 24 de novembro de 2015; 112 (47): E6506-14; Ju Yeon *et al. Nature Communications*. 2016 volume 7, número do artigo: 13354 (DOI: 10.1038/ncomms13354); e Zack KM *et al. Structure*. 2015 23 (12): 2341-2348 (DOI: 10.1016/j.str.2015.09.010), cujos conteúdos são totalmente incorporados aqui por referência.

[0164] Quando a porcentagem de identidade de sequência é usada em referência a proteínas, reconhece-se que as posições dos resíduos que não são idênticas muitas vezes diferem por substituições de aminoácidos conservativas, onde os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não alteram as propriedades funcionais da molécula. Onde as sequências diferem em substituições conservativas, a identidade de sequência percentual pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. As sequências que diferem por tais substituições conservativas são consideradas como tendo “similaridade de sequência” ou “similaridade”. Os meios para fazer este ajuste são bem conhecidos dos versados na técnica. Normalmente, isso envolve a pontuação de uma substituição conservativa como uma incompatibilidade parcial em vez de uma incompatibilidade total, aumentando assim a porcentagem de identidade de sequência. Assim, por exemplo, onde um aminoácido idêntico recebe uma pontuação de 1 e uma substituição não conservativa recebe uma pontuação de zero, uma substituição conservativa recebe uma pontuação entre zero e 1. A pontuação de substituições conservativas é calculada, por exemplo, de acordo com o algoritmo de Henikoff S e Henikoff JG. [*Amino acid substitution matrices from protein blocks*. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1992, 89(22): 10915-9].

[0165] De acordo com modalidades específicas, uma ou

mais mutações de aminoácidos estão localizadas em um resíduo de aminoácido selecionado a partir de: V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106 e A107 correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 estabelecida em SEQ ID NO: 31. De acordo com modalidades específicas, uma ou mais mutações de aminoácidos estão localizadas em um resíduo de aminoácido selecionado a partir de: V39, L40, N41, Y43, R44, M45, S48, N49, Q50, T51, D52, K53, A56, Q63, G65, Q66, C68, V72, H82, M83, R90, Y96, L97, A100, S102, L103, A104, P105, K106 e A107 correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 estabelecida em SEQ ID NO: 31.

[0166] De acordo com modalidades específicas, uma ou mais alterações de aminoácidos são selecionadas do grupo que consiste em: (1) V39H ou V39R; (2) L40V ou L40I; (3) N41I ou N41V; (4) Y43F ou Y43H; (5) R44Y ou R44L; (6) M45Q, M45E, M45L ou M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G ou S48V; (8) N49C, N49G, N49Y ou N49S; (9) Q50K, Q50E ou Q50H; (10) T51V, T51L ou T51A; (11) D52F, D52R, D52Y ou D52V; (12) K53T ou K53L; (13) A56S ou A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L ou Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F ou G65V; (16) Q66P; (17) V72I; (18) H82Q; (19) M83L ou M83F; (20) R90K; (21) Y96F; (22) L97Y, L97V ou L97I; (23) A100I ou A100V; (24) S102T ou S102A; (25) L103I, L103Y ou L103F; (26) A104S, A104H ou A104D; (27) P105A; (28) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R ou K106T; e (29) A107P, A107I ou A107V correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 estabelecida em SEQ ID NO: 31.

[0167] De acordo com modalidades específicas, uma ou mais alterações de aminoácidos são selecionadas do grupo que consiste em: (1) V39H ou V39R; (2) L40V ou L40I; (3) N41I ou N41V; (4) Y43F ou Y43H; (5) R44Y ou R44L; (6) M45Q, M45E, M45L ou M45D; (7) S48D, S48L, S48N, S48G ou S48V; (8) N49C, N49G, N49Y ou N49S; (9) Q50K, Q50E ou Q50H; (10) T51V, T51L ou T51A; (11) D52F, D52R, D52Y ou D52V; (12) K53T ou K53L; (13) A56S ou A56L; (14) Q63T, Q63I, Q63E, Q63L ou Q63P; (15) G65N, G65R, G65I, G65L, G65F ou G65V; (16) Q66P; (17) C68S (18), V72I; (19) H82Q; (20) M83L ou

M83F; (21) R90K; (22) Y96F; (23) L97Y, L97V ou L97I; (24) A100I ou A100V; (25) S102T ou S102A; (26) L103I, L103Y ou L103F; (27) A104S, A104H ou A104D; (28) P105A; (29) K106G, K106E, K106I, K106V, K106R ou K106T; e (30) A107P, A107I ou A107V correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 estabelecida em SEQ ID NO: 31.

[0168] De acordo com modalidades específicas, uma mutação de aminoácido está localizada em um resíduo de aminoácido C73 correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 estabelecida na SEQ ID NO: 2 (por exemplo, equivalente a um resíduo de aminoácido C68 correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 estabelecida na SEQ ID NO: 31).

[0169] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo PD1 pode compreender uma modificação de aminoácido C para S em uma posição correspondendo ao resíduo de aminoácido 73 da sequência de aminoácido PD1 estabelecida em SEQ ID NO: 2 (por exemplo, equivalente ao resíduo de aminoácido 68 da sequência de aminoácidos PD1 estabelecida em SEQ ID NO: 31).

[0170] Assim, de acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73.

[0171] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 73.

[0172] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 74.

[0173] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 74.

[0174] Como usada aqui, a frase “correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 31”, “correspondendo a SEQ ID NO: 31”, “correspondendo a sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2” ou “correspondendo a SEQ ID NO: 2”, pretende incluir o resíduo de aminoácido correspondente em relação a qualquer outra sequência de aminoácidos PD1.

[0175] Descrições adicionais sobre substituições conservativas e não conservativas de aminoácidos são fornecidas abaixo.

[0176] O PD1 de algumas modalidades da presente invenção é de pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntico ou homólogo ao polipeptídeo SEQ ID NO: 18-21; ou pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntico à sequência de polinucleotídeo que codifica o mesmo (como descrito adicionalmente a seguir), cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0177] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 e 115.

[0178] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119.

[0179] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119.

[0180] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93.

[0181] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21.

[0182] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 18.

[0183] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 19.

[0184] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 20.

[0185] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

[0186] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 85.

[0187] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 89.

[0188] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 93.

[0189] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 115.

[0190] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 117.

[0191] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 119.

[0192] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 e 115.

[0193] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119.

[0194] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119.

[0195] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93.

[0196] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21.

[0197] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 18.

[0198] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 19.

[0199] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 20.

[0200] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

[0201] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 85.

[0202] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 89.

[0203] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 93.

[0204] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 115.

[0205] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 117.

[0206] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 119.

[0207] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 e 115.

[0208] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119.

[0209] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119.

[0210] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93.

[0211] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21.

[0212] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 18.

[0213] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 19.

[0214] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 20.

[0215] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

[0216] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 85.

[0217] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 89.

[0218] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 93.

[0219] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 115.

[0220] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 117.

[0221] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 119.

[0222] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 e 115.

[0223] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos

97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119.

[0224] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119.

[0225] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0226] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0227] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21.

[0228] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 18.

[0229] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 19.

[0230] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 20.

[0231] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

[0232] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 85.

[0233] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 89.

[0234] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 93.

[0235] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 115.

[0236] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 117.

[0237] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 119.

[0238] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18 -21, 85, 89, 93 e 115, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0239] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0240] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0241] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0242] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0243] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18.

[0244] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 19.

[0245] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 20.

[0246] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 21.

[0247] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 85.

[0248] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 89.

[0249] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 93.

[0250] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 115.

[0251] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 117.

[0252] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 119.

[0253] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos PD1 não compreende o segmento de aminoácidos P1-L5 correspondendo a SEQ ID NO: 2.

[0254] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende o segmento de aminoácidos F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2.

[0255] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2.

[0256] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos P1-L5 correspondentes a SEQ ID NO: 2.

[0257] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2.

[0258] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2.

[0259] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende SEQ ID NO: 8 ou qualquer fragmento da mesma.

[0260] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende SEQ ID NO: 8.

[0261] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende SEQ ID NO: 9 ou qualquer fragmento da mesma.

[0262] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende SEQ ID NO: 9.

[0263] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos PD1 não compreende SEQ ID NO: 8 e 9 ou qualquer fragmento das mesmas.

[0264] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 não compreende SEQ ID NO: 8 e 9.

[0265] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 ou 115.

[0266] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 117 ou 119.

[0267] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 117 ou 119.

[0268] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89 ou 93.

[0269] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95.

[0270] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95.

[0271] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18, 19, 20 ou 21.

[0272] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18 ou 21.

[0273] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18.

[0274] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 19.

[0275] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 20.

[0276] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 21.

[0277] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 85.

[0278] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 89.

[0279] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 93.

[0280] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75.

[0281] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 79.

[0282] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 81.

[0283] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 83.

[0284] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 87.

[0285] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 91.

[0286] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 95.

[0287] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 115.

[0288] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 117.

[0289] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 119.

[0290] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 ou 115.

[0291] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 117 ou 119.

[0292] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 117 ou 119.

[0293] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89 ou 93.

[0294] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95.

[0295] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95.

[0296] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18, 19, 20 ou 21.

[0297] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18 ou 21.

[0298] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 18.

[0299] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 19.

[0300] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 20.

[0301] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 21.

[0302] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 85.

[0303] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 89.

[0304] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 93.

[0305] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 75.

[0306] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 79.

[0307] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 81.

[0308] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 83.

[0309] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 87.

[0310] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 91.

[0311] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 95.

[0312] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 115.

[0313] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 117.

[0314] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 119.

[0315] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 e/ou 120, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0316] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0317] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0318] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%,

pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 76, 80, 82, 84, 88, 92 e/ou 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0319] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0320] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0321] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 33, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0322] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 34, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0323] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 35, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0324] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 76, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0325] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos

84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 80, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0326] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 82, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0327] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 84, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0328] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos

97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 86, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0329] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 88, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0330] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 90, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0331] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 92, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0332] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 94, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0333] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0334] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 116, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0335] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos

84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 118, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0336] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 120, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0337] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 94, 96, 116, 118 e/ou 120.

[0338] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96.

[0339] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35.

[0340] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 32.

[0341] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 33.

[0342] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 34.

[0343] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 35.

[0344] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 76.

[0345] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 80.

[0346] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 82.

[0347] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 84.

[0348] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 86.

[0349] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 88.

[0350] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 90.

[0351] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 92.

[0352] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 94.

[0353] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 96.

[0354] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 116.

[0355] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 118.

[0356] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 120.

[0357] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 e/ou 120.

[0358] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96.

[0359] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35.

[0360] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 e/ou 120.

[0361] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96.

[0362] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35.

[0363] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 e/ou 120.

[0364] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96.

[0365] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35.

[0366] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 e/ou 120, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0367] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 e/ou 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0368] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo

menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0369] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 ou 120.

[0370] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[0371] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 32, 33, 34 ou 35.

[0372] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 32.

[0373] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 33.

[0374] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 34.

[0375] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 35.

[0376] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 76.

[0377] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 80.

[0378] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 82.

[0379] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 84.

[0380] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 86.

[0381] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 88.

[0382] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 90.

[0383] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 92.

[0384] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 94.

[0385] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 96.

[0386] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 116.

[0387] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 118.

[0388] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 compreende SEQ ID NO: 120.

[0389] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 180 ou 120.

[0390] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[0391] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 32, 33, 34 e/ou 35.

[0392] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 32.

[0393] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 33.

[0394] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 34.

[0395] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 35.

[0396] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 76.

[0397] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 80.

[0398] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 82.

[0399] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 84.

[0400] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 86.

[0401] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 88.

[0402] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 90.

[0403] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 92.

[0404] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 94.

[0405] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 96.

[0406] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 116.

[0407] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 118.

[0408] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico PD1 consiste na SEQ ID NO: 120.

[0409] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende 100-200 aminoácidos, 120-180 aminoácidos, 120-160, 130-170 aminoácidos, 130-160, 130-150, 140-160 aminoácidos, 145-155 aminoácidos, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0410] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-166 aminoácidos de comprimento.

[0411] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 156 aminoácidos de comprimento.

[0412] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 145-155 aminoácidos de comprimento.

[0413] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 150 aminoácidos de comprimento.

[0414] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende menos que 150 aminoácidos de comprimento.

[0415] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende menos que 149 aminoácidos de comprimento.

[0416] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende menos que 148, menos que 147, menos que 146, menos que 145, menos que 144, menos que 143, menos que 142, menos que 141 aminoácidos de comprimento, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0417] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento.

[0418] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 145 aminoácidos de comprimento.

[0419] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 143 aminoácidos de comprimento.

[0420] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem no máximo 140 aminoácidos de comprimento.

[0421] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 123, pelo menos 124, pelo menos 125, pelo menos 126, pelo menos 127, pelo menos 128, pelo menos 129, pelo menos 130, pelo menos 133, pelo menos 137, pelo menos 138 aminoácidos de comprimento, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0422] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 123, pelo menos, 124, pelo menos 125, pelo menos 126, pelo menos 127, pelo menos 128, pelo menos 129, pelo menos 130 aminoácidos de comprimento, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0423] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende 123-148 aminoácidos de comprimento.

[0424] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 126 aminoácidos de comprimento.

[0425] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 126-148 aminoácidos de comprimento.

[0426] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-140 aminoácidos de comprimento.

[0427] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 126-140 aminoácidos de comprimento.

[0428] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 127-140 aminoácidos de comprimento.

[0429] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 128-140 aminoácidos de comprimento.

[0430] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 130-140 aminoácidos de comprimento.

[0431] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 130-135 aminoácidos de comprimento.

[0432] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende 135-140 aminoácidos de comprimento.

[0433] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende 126-130 aminoácidos de comprimento.

[0434] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 127 aminoácidos de comprimento.

[0435] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 128 aminoácidos de comprimento.

[0436] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 133 aminoácidos de comprimento.

[0437] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 135 aminoácidos de comprimento.

[0438] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 136 aminoácidos de comprimento.

[0439] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 137 aminoácidos de comprimento.

[0440] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138 aminoácidos de comprimento.

[0441] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 140 aminoácidos de comprimento.

[0442] Como usado aqui, o termo “4-1BBL (também conhecido como CD137L e TNFSF9)” refere-se ao polipeptídeo do gene TNFSF9 (Gene ID 8744) ou um homólogo funcional, por exemplo, fragmento funcional do mesmo. De acordo com modalidades específicas, o termo “4-1BBL” refere-se a um homólogo funcional do polipeptídeo 4-1BBL. De acordo com modalidades específicas, 4-1BBL é 4-1BBL humano.

[0443] De acordo com uma modalidade específica, a proteína 4-1BBL refere-se à proteína humana, tal como fornecida no seguinte Número de GenBank NP\_003802.

[0444] Como usada aqui, a frase “homólogo funcional” ou “fragmento funcional” quando relacionado a 4-1BBL, refere-se a uma porção do polipeptídeo que mantém a atividade do 4-1BBL de comprimento total, por exemplo, (i) ligar 4-1BB, (ii) ativar a via de sinalização 4-1BB, (iii) ativar células imunes que expressam 4-1BB, (iv) formar um homotrímero.

[0445] De acordo com modalidades específicas, o homólogo funcional quando relacionado a 4-1BBL é capaz de (i), (ii), (iii), (i)+(ii), (i)+(iii), (ii)+(iii).

[0446] De acordo com modalidades específicas, o homólogo funcional quando relacionado a 4-1BBL é capaz de (i)+(ii)+(iii).

[0447] De acordo com modalidades específicas, o homólogo funcional quando relacionado a 4-1BBL é capaz de (iv), (i)+(iv), (ii)+(iv), (iii)+(iv), (i)+(ii)+(iv), (i)+(iii)+(iv), (ii)+(iii)+(iv).

[0448] De acordo com modalidades específicas, o homólogo funcional quando relacionado a 4-1BBL é capaz de (i)+(ii)+(iii)+(iv).

[0449] De acordo com uma modalidade específica, a proteína 4-1BB refere-se à proteína humana, tal como fornecida no seguinte Número de GenBank NP\_001552.

[0450] Os ensaios para testar a ligação são bem conhecidos na técnica e são adicionalmente descritos aqui acima e abaixo.

[0451] De acordo com modalidades específicas, o 4-1BBL liga 4-1BB com um Kd de cerca de 0,1-1000 nM, 0,1-100 nM, 1-100 nM ou 55,2 nM conforme determinado por SPR, cada possibilidade representa uma modalidade separada da invenção reivindicada.

[0452] Os ensaios para testar a trimerização são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a, NATIVE-PAGE, géis SEC-HPLC 2D, filtração em gel, SEC-MALS, ultracentrifugação analítica (AUC), espectrometria de massa (MS), eletroforese em gel capilar (CGE).

[0453] Como usados aqui, os termos “ativar” ou “ativação” referem-se ao processo de estimulação de uma célula imune (por exemplo, célula T, célula B, célula NK, célula fagocítica) que resulta em proliferação celular, maturação, produção de citocinas, fagocitose e/ou indução de funções regulatórias ou efectoras.

[0454] De acordo com modalidades específicas, a ativação compreende a coestimulação.

[0455] Como usado aqui, o termo “coestimular” ou “coestimulação” refere-se à transmissão de um sinal estimulador independente do antígeno secundário (por exemplo, sinal 4-1BB), resultando na ativação da célula imune.

[0456] De acordo com modalidades específicas, a ativação compreende a supressão de um sinal inibitório (por exemplo, sinal PDL1), resultando na ativação da célula imune.

[0457] Os métodos de determinação da sinalização de um sinal estimulador ou inibidor são bem conhecidos na técnica e também divulgados na seção de Exemplos que segue, e incluem, mas não estão limitados a, ensaio de ligação usando, por exemplo, BiaCore, HPLC ou citometria de fluxo, ensaios de atividade enzimática, tais como ensaios de atividade de quinase, e expressão de moléculas envolvidas na cascata de sinalização usando, por exemplo, PCR, Western Blot, imunoprecipitação e imunohistoquímica. Adicionalmente ou alternativamente, a determinação da transmissão de um sinal (coestimulador ou inibidor) pode ser efetuada avaliando a ativação ou função das células imunes. Os métodos de avaliação da ativação ou função das células imunes são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, ensaios de proliferação, como coloração de CFSE, MTS, azul Alamar, incorporação de BRDU e timidina, ensaios de citotoxicidade, como coloração de CFSE, liberação de cromo, Calcin AM, ensaios de secreção de citocina, como coloração de citocina intracelular, ELISPOT e ELISA, expressão de marcadores de ativação, como CD25, CD69, CD137, CD107a, PD1 e CD62L usando citometria de fluxo.

[0458] De acordo com modalidades específicas, a determinação da atividade de sinalização ou ativação é efetuada *in vitro* ou *ex vivo*, por exemplo, em uma reação de linfócitos mistos (MLR), conforme descrito abaixo.

[0459] Para as mesmas condições de cultura, a atividade de sinalização ou a ativação ou função de células imunes são geralmente expressas em comparação com a sinalização, ativação ou função em uma célula da mesma espécie, mas não em contato com a proteína de fusão PF1-4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que codifica o mesmo; ou em contato com um controle de veículo, também conhecido como controle.

[0460] De acordo com modalidades específicas, o 4-1BBL compreende um domínio extracelular do referido 4-1BBL ou um fragmento funcional do mesmo.

[0461] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 36.

[0462] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 36.

[0463] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 37.

[0464] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 37.

[0465] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3.

[0466] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 3.

[0467] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 38.

[0468] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 38.

[0469] O termo “4-1BBL” também abrange homólogos funcionais (de ocorrência natural ou produzidos sinteticamente/recombinantemente), que exibem a atividade desejada (conforme definido acima). Tais homólogos podem ser, por exemplo, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos ou homólogos ao polipeptídeo SEQ ID NO: 3, 36; ou pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%,

pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos à sequência de polinucleotídeo que codifica os mesmos (como descrito adicionalmente a seguir).

[0470] De acordo com modalidades específicas, os homólogos funcionais de 4-1BBL são pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos ou homólogos ao polipeptídeo SEQ ID NO: 3, 36; ou pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idênticos à sequência de polinucleotídeo que codifica os mesmos (como descrito adicionalmente a seguir).

[0471] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo 4-1BBL pode compreender substituições conservativas de aminoácidos, conforme adicionalmente descrito aqui acima e abaixo.

[0472] O 4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntico ou homólogo ao polipeptídeo SEQ ID NO: 22, 23, 24 e/ou 25; ou pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntico à sequência de polinucleotídeo que codifica o mesmo (como descrito adicionalmente aqui abaixo), cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0473] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0474] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo

menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 e/ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0475] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23 e/ou 24.

[0476] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22.

[0477] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 23.

[0478] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 24.

[0479] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 25.

[0480] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende o segmento de aminoácidos A1-V6 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0481] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende o segmento de aminoácidos A1-G14 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0482] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos A1-V6 ou A1-G14 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0483] Como usada aqui, a frase “correspondendo a SEQ ID NO: 3” pretende incluir o resíduo de aminoácido correspondente em relação a qualquer outra sequência de aminoácidos 4-1BBL.

[0484] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende SEQ ID NO: 6 ou 7 ou qualquer fragmento das mesmas.

[0485] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende SEQ ID NO: 6 ou 7.

[0486] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0487] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 22, 23 ou 24.

[0488] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 22 ou 23.

[0489] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 22.

[0490] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 23.

[0491] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL $\alpha$  compreende SEQ ID NO: 24.

[0492] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 25.

[0493] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0494] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 22, 23 ou 24.

[0495] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 22 ou 23.

[0496] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 22.

[0497] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 23.

[0498] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL $\alpha$  consiste na SEQ ID NO: 24.

[0499] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 25.

[0500] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 127 e 129, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0501] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 127 e 129, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0502] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 127 e 129, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0503] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 127 e 129, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0504] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 127 e 129, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0505] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 127 e 129, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0506] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende o segmento de aminoácidos G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0507] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0508] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende SEQ ID NO: 166 ou qualquer fragmento da mesma.

[0509] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende SEQ ID NO: 166.

[0510] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NOs: 127 ou 129.

[0511] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NOs: 127 ou 129.

[0512] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 125.

[0513] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 125.

[0514] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 125.

[0515] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 125.

[0516] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 125.

[0517] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 125.

[0518] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende o segmento de aminoácidos A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0519] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0520] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende SEQ ID NO: 167 ou qualquer fragmento da mesma.

[0521] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende SEQ ID NO: 167.

[0522] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 125.

[0523] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 125.

[0524] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0525] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0526] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0527] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0528] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0529] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0530] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 123.

[0531] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 123.

[0532] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 39, 40, 41 e/ou 42, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0533] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 39, 40, 41 e/ou 42.

[0534] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 39, 40, 41 e/ou 42.

[0535] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 39 e/ou 40

[0536] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 39, 40, 41 ou 42.

[0537] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 39, 40 ou 41.

[0538] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 39 ou 40.

[0539] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 39.

[0540] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 40.

[0541] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL $\alpha$  compreende SEQ ID NO: 41.

[0542] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 42.

[0543] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 39, 40, 41 ou 42.

[0544] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 39, 40 ou 41.

[0545] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 39 ou 40.

[0546] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 39.

[0547] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 40.

[0548] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 41.

[0549] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 42.

[0550] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo

menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 128 e/ou 130, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0551] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 128 e/ou 130.

[0552] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 128 e/ou 130.

[0553] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 128 ou 130.

[0554] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 128 ou 130.

[0555] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 126.

[0556] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 126.

[0557] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 126.

[0558] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 126.

[0559] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 126.

[0560] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 124.

[0561] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 124.

[0562] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 124.

[0563] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 124.

[0564] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 124.

[0565] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende 100-300 aminoácidos, 150-250 aminoácidos, 100-250 aminoácidos, 150-220 aminoácidos, 180-220 aminoácidos, 180-210 aminoácidos, 185-205 aminoácidos, 190-210 aminoácidos, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0566] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 190-210 aminoácidos de comprimento.

[0567] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 204 aminoácidos de comprimento.

[0568] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento.

[0569] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-200 aminoácidos de comprimento.

[0570] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-199 aminoácidos de comprimento.

[0571] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 170-197 aminoácidos de comprimento.

[0572] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 170-182 aminoácidos de comprimento.

[0573] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 184 aminoácidos de comprimento.

[0574] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185, 191, 197 ou 199 aminoácidos de comprimento, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0575] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 184 aminoácidos de comprimento.

[0576] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 183 aminoácidos de comprimento.

[0577] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 182 aminoácidos de comprimento.

[0578] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 176 aminoácidos de comprimento.

[0579] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreendida na proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo 4-1BBL divulgados aqui compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL.

[0580] De acordo com modalidades específicas, cada uma das três repetições é capaz de pelo menos um de: (i) ligar 4-1BB, (ii) ativar a via de sinalização 4-1BB, (iii) ativar células imunes que expressam 4-1BB, (iv) formar um homotrímero.

[0581] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende um ligante entre cada uma das referidas três repetições da referida sequência de aminoácidos 4-1BBL.

[0582] De acordo com outras modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende um ligante entre cada uma das referidas três repetições da referida sequência de aminoácidos 4-1BBL. Qualquer ligante conhecido na técnica pode ser usado com modalidades específicas da invenção. Exemplos não limitativos de ligantes que podem ser usados são descritos em detalhes a seguir.

[0583] De acordo com uma modalidade específica, o ligante é um ligante (GGGGS)<sub>x</sub>+GGGG (SEQ ID NO: 121).

[0584] De acordo com modalidades específicas, a sequência repetida pode ser qualquer um dos 4-1BBL conforme definidos aqui.

[0585] De acordo com modalidades específicas, as três repetições têm uma sequência de aminoácidos 4-1BBL idêntica.

[0586] De acordo com outras modalidades específicas, as três repetições são distintas, isto é, têm sequências de aminoácidos 4-1BBL diferentes.

[0587] De acordo com outras modalidades específicas, duas das três repetições têm uma sequência de aminoácidos 4-1BBL idêntica.

[0588] De acordo com modalidades específicas, pelo menos uma das repetições compreende uma sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgada aqui.

[0589] De acordo com modalidades específicas, pelo menos uma das repetições consiste em uma sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgada aqui.

[0590] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO: 22.

[0591] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos que consiste na SEQ ID NO: 22.

[0592] Assim, de acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 131.

[0593] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 131.

[0594] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 131.

[0595] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 131.

[0596] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 131.

[0597] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 131.

[0598] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 131.

[0599] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 132.

[0600] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 132.

[0601] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL tem pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 132.

[0602] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 132.

[0603] De acordo com modalidades específicas, a sequência de ácido nucleico 4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 132.

[0604] Os termos “DSP” e “proteína de fusão”, “proteína quimérica” ou “quimera” são usados aqui indistintamente e referem-se a uma sequência de aminoácidos com duas ou mais partes que não são encontradas juntas em uma única sequência de aminoácidos na natureza.

[0605] A proteína de fusão de algumas modalidades da presente invenção compreende uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL (aqui referida como proteína de fusão PD1-4-1BBL).

[0606] De acordo com modalidades específicas, o PD1 é N-terminal para o 4-1BBL.

[0607] De acordo com outras modalidades específicas, o PD1 é C-terminal para o 4-1BBL.

[0608] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer PD1 conforme definido aqui; e qualquer sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tendo 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreendendo um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, tendo 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreendendo um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3 ou tendo 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou

(bb) compreendendo três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL; como por exemplo divulgado aqui, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0609] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer sequência de aminoácidos PD1:

(a) tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo

menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, ou tendo 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreendendo um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreendendo uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; como por exemplo divulgado aqui; e qualquer 4-1BBL como aqui definido, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0610] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer sequência de aminoácidos PD1:

(a) tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, ou tendo 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreendendo um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreendendo uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; como por exemplo divulgado aqui; e

qualquer sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo

pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tendo 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreendendo um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, tendo 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreendendo um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3 ou tendo 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou

(bb) compreendendo três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL; como por exemplo divulgado aqui, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0611] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer PD1 conforme definido aqui; e qualquer sequência de aminoácidos 4-1BBL tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25 tal como, por exemplo, divulgado aqui, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0612] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer sequência de aminoácidos PD1:

(a) tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreendendo uma modificação de aminoácido de C

para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; como por exemplo divulgado aqui; e qualquer 4-1BBL como aqui definido, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0613] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer sequência de aminoácidos PD1 tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, como por exemplo divulgado aqui; e qualquer 4-1BBL como aqui definido, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0614] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer sequência de aminoácidos PD1:

(a) tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreendendo uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; como por exemplo divulgado aqui; e qualquer sequência de aminoácidos 4-1BBL tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25 tal como, por exemplo, divulgado aqui, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0615] A proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção pode compreender qualquer sequência de

aminoácidos PD1 tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, como por exemplo divulgado aqui; e qualquer sequência de aminoácidos 4-1BBL tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25 tal como, por exemplo, divulgado aqui, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0616] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 18-21, 85, 89, 93, 27, 30 e/ou 31; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0617] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 73, 75, 79, 81, 83, 87, 91 e/ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento

tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0618] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 2, 18-21, 27, 30 e/ou 31; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0619] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 2, 18-21, 85, 89, 93, 27, 30 ou 31; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0620] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73, 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0621] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0622] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0623] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0624] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73, 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0625] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 2, 18-21, 27, 30 ou 31; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0626] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2, 18-21, 85, 89, 93, 27, 30 ou 31; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0627] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 73, 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0628] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 73; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0629] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0630] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0631] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 73, 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0632] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2, 18-21, 27, 30 ou 31; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0633] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos

84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e/ou 93; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 3, 22-25 e/ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0634] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18, 19, 20 e/ou 21; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 3, 22-25 e/ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0635] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e/ou 93; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0636] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 ou 93; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0637] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73, 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0638] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0639] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0640] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0641] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73, 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0642] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18, 19, 20 ou 21; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0643] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18, 19, 20 ou 21; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, 22-25 ou 36, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0644] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0645] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento e compreende SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0646] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0647] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23 ou 24.

[0648] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 22, 23 ou 24.

[0649] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23 ou 24.

[0650] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%,

pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22

[0651] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 22.

[0652] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22.

[0653] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 23.

[0654] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 23.

[0655] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 23.

[0656] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 24

[0657] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 24.

[0658] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 24.

[0659] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 19; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo

menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0660] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 19; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0661] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 19; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0662] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 20; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0663] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 20; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo modalidades, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 20; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0664] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 21; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0665] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 21; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0666] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 21; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0667] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 ou 93; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondendo ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 22, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0668] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 85, 89 ou 93; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento e compreende SEQ ID NO: 22.

[0669] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 85, 89 ou 93; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0670] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento e compreende SEQ ID NO: 22.

[0671] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0672] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento e compreende SEQ ID NO: 22.

[0673] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 75, 83,

87, 91 ou 95; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0674] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 75; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento e compreende SEQ ID NO: 22.

[0675] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 75; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0676] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 83; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento e compreende SEQ ID NO: 22.

[0677] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 783; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

[0678] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 compreende SEQ ID NO: 73 e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3.

[0679] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 73; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3.

[0680] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos

92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é qualquer 4-1BBL como definido aqui, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0681] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com um sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreendendo um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%,

pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreendendo um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3, ou tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou

(bb) compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0682] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreendendo um segmento de aminoácido A1-E23 correspondente à SEQ ID NO: 3.

[0683] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 115; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 170-182 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 125.

[0684] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 115; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 125.

[0685] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0686] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 115; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 184 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 123.

[0687] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 115; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 123.

[0688] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é qualquer 4-1BBL como aqui definido, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0689] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, em pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, em pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de

identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreendendo um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreendendo um segmento de aminoácido A1-E23 correspondendo a SEQ ID NO: 3, ou tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou

(bb) compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0690] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo

menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreendendo um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3.

[0691] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 117 e 119; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 170-197 aminoácidos de comprimento compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129.

[0692] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 117 ou 119; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 127 ou 129.

[0693] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 117; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 170-197 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 127.

[0694] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 117; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 127.

[0695] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 138-145 aminoácidos de comprimento

compreendendo SEQ ID NO: 119; e a sequência de aminoácidos de 4-1BBL tem 170-197 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 129.

[0696] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 119; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 129.

[0697] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 115 e não compreendendo qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 123.

[0698] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 115; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 184 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 123.

[0699] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 115; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 123.

[0700] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento ou 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 3.

[0701] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento ou 138-145 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 3.

[0702] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3.

[0703] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento ou 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL tem pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%,

pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 131.

[0704] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento ou 138-145 aminoácidos de comprimento compreendendo SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende SEQ ID NO: 131.

[0705] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos PD1 é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 18; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL é conforme estabelecido em SEQ ID NO: 131.

[0706] Exemplos não limitativos de combinações específicas de sequência de aminoácidos PD1 e sequência de aminoácidos 4-1BBL que podem ser usados com modalidades específicas da presente invenção são fornecidos na Tabela 4 da seção de Exemplos que segue, que serve como uma parte integrante do relatório descritivo.

[0707] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL é solúvel (isto é, não imobilizado em uma superfície sintética ou de ocorrência natural).

[0708] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL é imobilizado em uma superfície sintética ou de ocorrência natural.

[0709] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL é solúvel (isto é, não imobilizada em uma superfície sintética ou de ocorrência natural).

[0710] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL é imobilizada em uma superfície sintética ou de ocorrência natural.

[0711] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL está na forma de pelo menos um homo-trímero.

[0712] De acordo com modalidades específicas, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% da proteína de fusão PD1-4-1BBL está em uma forma de pelo menos um homo-trímero, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0713] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero compreende um homo-trímero.

[0714] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero compreende um homo-tetrâmero.

[0715] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero compreende um homo-pentâmero.

[0716] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero compreende um homo-hexâmero.

[0717] Os métodos de determinação da trimerização são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, NATIVE-PAGE, géis SEC-HPLC 2D, filtração em gel, SEC-MALS, ultracentrifugação analítica (AUC), espectrometria de massa (MS), eletroforese em gel capilar (CGE).

[0718] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero tem pelo menos 100 kD, pelo menos 120 kD, pelo menos 140 kD, pelo menos 160 kD, pelo menos 180 kD em peso molecular, conforme determinado por SEC-MALLS.

[0719] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero tem pelo menos 100 kD em peso molecular conforme determinado por SEC-MALS.

[0720] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero tem pelo menos 140 kD em peso molecular, conforme determinado por SEC-MALS.

[0721] De acordo com modalidades específicas, o pelo menos homo-trímero tem pelo menos 200 kD em peso molecular conforme determinado por SEC-MALS.

[0722] De acordo com modalidades específicas, o PD1-4-1BBL não compreende um ligante entre o PD1 e o 4-1BBL.

[0723] Em algumas modalidades, o PD1-4-1BBL compreende um ligante que pode ter qualquer comprimento.

[0724] Assim, de acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende um ligante entre o referido PD1 e o referido 4-1BBL.

[0725] Qualquer ligante conhecido na técnica pode ser usado com modalidades específicas da invenção.

[0726] De acordo com modalidades específicas, o ligante pode ser derivado de proteínas de múltiplos domínios de ocorrência natural ou é um ligante empírico conforme descrito, por exemplo, em Chichili *et al.*, (2013), *Protein Sci.* 22 (2): 153-167, Chen *et al.*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65 (10): 1357-1369, cujos conteúdos inteiros são aqui incorporados por referência. Em algumas modalidades, o ligante pode ser projetado usando bancos de dados de design de ligante e programas de computador, como aqueles descritos em Chen *et al.*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65 (10): 1357-1369 e Crasto *et al.*, (2000), *Protein Eng.* 13 (5): 309-312, todo o conteúdo dos quais é aqui incorporado por referência.

[0727] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um ligante sintético, como PEG.

[0728] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um domínio Fc ou a região de dobradiça de um anticorpo (por exemplo, de IgG, IgA, IgD ou IgE) ou um fragmento do mesmo.

[0729] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um domínio Fc ou a região de dobradiça de IgG4 humana.

[0730] De acordo com modalidades específicas, o ligante de domínio Fc compreende SEQ ID NO: 160.

[0731] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um domínio Fc ou a região de dobradiça de IgG1 humana.

[0732] De acordo com modalidades específicas, o ligante de domínio Fc compreende SEQ ID NO: 163.

[0733] De acordo com modalidades específicas, o domínio Fc ou o ligante da região de dobradiça pode compreender substituições conservativas e não conservativas de aminoácidos (também referidas aqui como mutações). Essas substituições são conhecidas na técnica.

[0734] De acordo com outras modalidades específicas, o ligante não é um domínio Fc ou uma região de dobradiça de um anticorpo ou um fragmento do mesmo.

[0735] De acordo com modalidades específicas, o ligante pode ser funcional. Por exemplo, sem limitação, o ligante pode funcionar para melhorar o dobramento e/ou estabilidade, melhorar a expressão, melhorar a farmacocinética e/ou melhorar a bioatividade da proteína de fusão PD1-4-1BBL. Em outro exemplo, o ligante pode funcionar para direcionar a proteína de fusão PD1-4-1BBL para um determinado tipo de célula ou localização.

[0736] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um polipeptídeo.

[0737] Exemplos não limitativos de ligantes polipeptídicos incluem ligantes com a sequência LE, GGGGS (SEQ ID NO: 150), (GGGGS)<sub>n</sub>

(n=1 -4) (SEQ ID NO: 149), GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 122), (GGGGS)x2 (SEQ ID NO: 151), (GGGGS)x2+GGGG (SEQ ID NO: 121), (Gly)<sub>8</sub>, (Gly)<sub>6</sub>, (EAAAK)<sub>n</sub> (n=1 -3) (SEQ ID NO: 152), A(EAAAK)<sub>n</sub>A (n = 2-5) (SEQ ID NO: 153), AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO: 154), A(EAAAK)<sub>4</sub>ALEA(EAAAK)<sub>4</sub>A (SEQ ID NO: 155), PAPAP (SEQ ID NO: 156), K ESGSVSS EQ LAQ FRS LD (SEQ ID NO: 157), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 158), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 159), e (XP)<sub>n</sub>, com X designando qualquer aminoácido, por exemplo, Ala, Lys ou Glu.

[0738] De acordo com modalidades específicas, o ligante é selecionado do grupo que consiste em GGGGS (SEQ ID NO: 150), (GGGGS)<sub>n</sub> (n=1 -4) (SEQ ID NO: 149), GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 122), (GGGGS)x2 (SEQ ID NO: 151), (GGGGS)x2+GGGG (SEQ ID NO: 121).

[0739] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um ligante (GGGGS)<sub>n</sub>(n=1-4) (SEQ ID NO: 149).

[0740] De acordo com modalidades específicas, o ligante é o ligante GGGGSx2 (SEQ ID NO: 151).

[0741] Assim, de acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, em pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 145.

[0742] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 145.

[0743] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 145.

[0744] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 145.

[0745] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 145.

[0746] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 145.

[0747] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 145.

[0748] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 145.

[0749] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um ligante GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 122).

[0750] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um ligante (GGGS)x2+GGGG (SEQ ID NO: 121).

[0751] Assim, de acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos

82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, em pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 147.

[0752] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 147.

[0753] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com a SEQ ID NO: 147.

[0754] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 147.

[0755] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 147.

[0756] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 147

[0757] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 147.

[0758] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 147.

[0759] Em algumas modalidades, a proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende um ligante com um comprimento de um a seis aminoácidos.

[0760] De acordo com modalidades específicas, o ligante é substancialmente composto por resíduos de glicina e/ou serina (por exemplo, cerca de 30%, ou cerca de 40%, ou cerca de 50%, ou cerca de 60%, ou cerca de 70%, ou cerca de 80%, ou cerca de 90%, ou cerca de 95%, ou cerca de 97% ou 100% de glicinas e serinas).

[0761] De acordo com modalidades específicas, o ligante é um ligante de aminoácido único.

[0762] Em algumas modalidades da invenção, o um aminoácido que liga PD1 e 4-1BBL é glicina, também aqui referida como proteína de fusão PD1-G-4-1BBL.

[0763] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0764] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos

82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0765] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0766] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0767] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma

sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0768] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16 e 44-56, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0769] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0770] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma

sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44- 56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0771] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0772] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0773] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0774] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0775] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44- 56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0776] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0777] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0778] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0779] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0780] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44- 56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0781] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0782] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0783] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0784] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0785] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44- 56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0786] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0787] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0788] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0789] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0790] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 97.

[0791] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 101.

[0792] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 103.

[0793] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 105.

[0794] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 107.

[0795] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 111.

[0796] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 12.

[0797] De acordo com modalidades específicas, a

sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 14.

[0798] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 16.

[0799] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 113.

[0800] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 133.

[0801] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 135.

[0802] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 137.

[0803] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 139.

[0804] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 141.

[0805] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 143.

[0806] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO: 147.

[0807] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0808] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0809] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0810] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0811] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0812] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0813] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0814] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0815] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0816] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0817] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16 e 44-56.

[0818] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16.

[0819] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 97.

[0820] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 101.

[0821] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 103.

[0822] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 105.

[0823] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 107.

[0824] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 111.

[0825] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 12.

[0826] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 14.

[0827] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 16.

[0828] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 113.

[0829] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 133.

[0830] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 135.

[0831] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 137.

[0832] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 139.

[0833] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 141.

[0834] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 143.

[0835] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende SEQ ID NO: 147.

[0836] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0837] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

[0838] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0839] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105, 107 e 111.

[0840] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 97, 101, 103, 105 e 107, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0841] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16 e 44-56.

[0842] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14 e 16.

[0843] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 97.

[0844] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 101.

[0845] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 103.

[0846] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 105.

[0847] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 107.

[0848] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 111.

[0849] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 12.

[0850] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 14.

[0851] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 16.

[0852] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 113.

[0853] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 133.

[0854] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 135.

[0855] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 137.

[0856] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 139.

[0857] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 141.

[0858] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 143.

[0859] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste na SEQ ID NO: 147.

[0860] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 300-900

aminoácidos, 300-800 aminoácidos, 300-600 aminoácidos, 300-550 aminoácidos, 300-500 aminoácidos de comprimento, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0861] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 300-750 aminoácidos de comprimento.

[0862] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 308-750 aminoácidos de comprimento.

[0863] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 308-400 aminoácidos de comprimento.

[0864] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 308-350 aminoácidos de comprimento.

[0865] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 308-448, 308-362, 308-351, 313-351, 313-339, 318-351, 318-362, 318-340, 318-332 aminoácidos de comprimento, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0866] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 308-488 aminoácidos de comprimento.

[0867] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 308-351 aminoácidos de comprimento.

[0868] De acordo com modalidades específicas, a sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL tem 318-351 aminoácidos de comprimento.

[0869] Exemplos não limitativos de proteínas de fusão PD1-4-1BBL específicas que podem ser usadas com modalidades específicas da presente invenção são fornecidos na Tabela 4 da seção de Exemplos que segue, que serve como parte integrante do relatório descritivo.

[0870] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que o rendimento de produção de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0871] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes maior do que o rendimento de produção de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção.

[0872] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 2 vezes maior do que o rendimento de produção de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção.

[0873] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes,

pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que o rendimento de produção de uma SEQ ID NO: 5, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0874] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes maior do que o rendimento de produção de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção.

[0875] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 2 vezes maior do que o rendimento de produção de uma SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção.

[0876] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que o rendimento de produção de SEQ ID NO: 2, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0877] De acordo com modalidades específicas, o rendimento de produção do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que o rendimento de produção de SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0878] De acordo com modalidades específicas, a

quantidade de agregados da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 95% menor do que a quantidade de agregados de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção, os referidos agregados têm pelo menos 300 kDa em peso molecular como pode ser determinado, por exemplo, por SDS-PAGE ou SEC-MALS.

[0879] De acordo com modalidades específicas, a quantidade de agregados da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 20% menor do que a quantidade de agregados de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção.

[0880] De acordo com modalidades específicas, a quantidade de agregados da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 50% menor do que a quantidade de agregados de uma SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção.

[0881] De acordo com modalidades específicas, a atividade da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a atividade de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, por exemplo sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0882] De acordo com modalidades específicas, a atividade da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a atividade de uma SEQ ID NO: 5, por exemplo sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0883] De acordo com modalidades específicas, a atividade do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a atividade de SEQ ID NO: 2, por exemplo sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0884] De acordo com modalidades específicas, a atividade do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a atividade de SEQ ID NO: 3, por exemplo sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0885] De acordo com modalidades específicas, a estabilidade da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a estabilidade de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0886] De acordo com modalidades específicas, a estabilidade da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a estabilidade de uma SEQ ID NO: 5, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0887] De acordo com modalidades específicas, a

estabilidade do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a estabilidade da SEQ ID NO: 2, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0888] De acordo com modalidades específicas, a estabilidade do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a estabilidade da SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0889] De acordo com modalidades específicas, a segurança da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a segurança de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0890] De acordo com modalidades específicas, a segurança da proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a segurança de uma SEQ ID NO: 5, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0891] De acordo com modalidades específicas, a segurança do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 de

algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a segurança da SEQ ID NO: 2, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0892] De acordo com modalidades específicas, a segurança do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 2,5 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes maior do que a segurança da SEQ ID NO: 3, sob as mesmas condições de produção, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0893] De acordo com modalidades específicas, as condições de produção compreendem a expressão em uma célula de mamífero e cultura a 32-37 °C, 5-10% de CO<sub>2</sub> por 5-13 dias.

[0894] Exemplos não limitativos de condições de produção que podem ser usados com modalidades específicas da invenção são divulgados na seção de Exemplos que segue.

[0895] Assim, por exemplo, um vetor de expressão que codifica a proteína de fusão, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL incluindo um peptídeo sinal artificial (por exemplo, SEQ ID NO: 4) no terminal N e His-tag e um códon de terminação no terminal C, é expresso em células de mamífero, tais como células Expi293F ou ExpiCHO. As células transduzidas são então cultivadas a 32-37°C, 5-10% CO<sub>2</sub> em meio de cultura específico para células de acordo com as instruções do fabricante das células Expi293F ou ExpiCHO (Thermo) e após pelo menos 5 dias em cultura as proteínas são coletadas do sobrenadante e purificadas.

[0896] De acordo com modalidades específicas, a cultura é operada em batelada, batelada dividida, batelada alimentada ou modo de perfusão.

[0897] De acordo com modalidades específicas, a cultura é operada em condições de batelada alimentada.

[0898] De acordo com modalidades específicas, a cultura é realizada a 37 °C.

[0899] De acordo com modalidades específicas, a cultura é realizada a 37 °C com uma mudança de temperatura para 32 °C. Esta mudança de temperatura pode ser efetuada para desacelerar o metabolismo das células antes de atingir a fase estacionária.

[0900] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 é capaz de ligar PDL1.

[0901] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 de algumas modalidades da presente invenção tem uma atividade aprimorada, conforme divulgado aqui, em comparação com a SEQ ID NO: 2.

[0902] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar 4-1BB,

(ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

[0903] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção tem uma atividade aprimorada, conforme divulgado aqui, em comparação com a SEQ ID NO: 3.

[0904] De acordo com modalidades específicas, o

polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL é capaz de (i), (ii), (iii), (i)+(ii), (i)+(iii), (ii)+(iii), (i)+(ii)+(iii).

[0905] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar PDL1 e 4-1BB;
- (ii) ativar a via de sinalização 4-1BB em uma célula imune (por exemplo, célula T) que expressa 4-1BB; e/ou
- (iii) ativar células imunes (por exemplo, células T) que expressam o referido 4-1BB.

[0906] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção tem uma atividade aprimorada, conforme divulgado aqui, em comparação com uma proteína de fusão compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL conforme estabelecido em SEQ ID NO: 3.

[0907] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL de algumas modalidades da presente invenção tem uma atividade aprimorada, conforme divulgado aqui, em comparação com SEQ ID NO: 5.

[0908] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL é capaz de (i), (ii), (iii), (i)+(ii), (i)+(iii), (ii)+(iii).

[0909] De acordo com modalidades específicas, a proteína de fusão PD1-4-1BBL é capaz de (i)+(ii)+(iii).

[0910] Os métodos de determinação da ligação, ativação da via de sinalização de 4-1BB e ativação de células imunes são bem conhecidos na técnica e são adicionalmente descritos acima e na seção de Exemplos que segue.

[0911] Como as composições de algumas modalidades da

presente invenção (por exemplo, a proteína de fusão, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo ou ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo) são capazes de ativar células do sistema imunológico, elas podem ser usadas no método de ativação de células do sistema imunológico, *in vitro*, *ex vivo* e/ou *in vivo*.

[0912] Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método de ativação de células imunes, o método compreendendo a ativação *in vitro* ou *ex vivo* de células imunes na presença da proteína de fusão PD1-4-1BBL, do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgados aqui, de um polinucleotídeo que codifica a mesma, de um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou de uma célula hospedeira que expressa a mesma.

[0913] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método de ativação de células T, o método compreendendo a ativação *in vitro* ou *ex vivo* de células T na presença da proteína de fusão PD1-4-1BBL, do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgados aqui e células que expressam PDL1.

[0914] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença da proteína de fusão PD1-4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica a mesma, um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou uma célula hospedeira que expressa a mesma.

[0915] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[0916] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[0917] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença do polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica a mesma, um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou uma célula hospedeira que expressa a mesma.

[0918] De acordo com modalidades específicas, as células imunes expressam 4-1BB.

[0919] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem células mononucleares de sangue periférico (PBMCs).

[0920] Como usado aqui, o termo “células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)” refere-se a uma célula do sangue com um único núcleo e inclui linfócitos, monócitos e células dendríticas (DCs).

[0921] De acordo com modalidades específicas, as PBMCs são selecionadas a partir do grupo que consiste em células dendríticas (DCs), células T, células B, células NK e células NKT.

[0922] De acordo com modalidades específicas, as PBMCs compreendem células T, células B, células NK e células NKT.

[0923] Os métodos de obtenção de PBMCs são bem conhecidos na técnica, tais como retirar sangue total de um indivíduo e coletar em um recipiente contendo um anticoagulante (por exemplo, heparina ou citrato); e aférese. Em seguida, de acordo com modalidades específicas, pelo menos um tipo de PBMCs é purificada do sangue periférico. Existem vários métodos e

reagentes conhecidos dos versados na técnica para purificar PBMCs de sangue total, tais como leucaferese, sedimentação, centrifugação por gradiente de densidade (por exemplo, ficoll), elutriação centrífuga, fracionamento, lise química de, por exemplo, glóbulos vermelhos (por exemplo, por ACK), seleção de tipos de células específicos usando marcadores de superfície celular (usando, por exemplo, classificador FACS ou técnicas de separação magnética de células, como estão disponíveis comercialmente, por exemplo, da Invitrogen, Stemcell Technologies, Cellpro, Advanced Magnetics ou Miltenyi Biotec.), e depleção de tipos de células específicos por métodos como erradicação (por exemplo, exterminar) com anticorpos específicos ou por purificação baseada em afinidade com base na seleção negativa (usando, por exemplo, técnicas de separação magnética de células, classificação FACS e/ou marcação por ELISA de captura). Tais métodos são descritos, por exemplo, em “THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY”, Volumes 1 a 4, (D.N. Weir, editor) e “*FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING*” (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000).

[0924] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem linfócitos infiltrantes de tumor.

[0925] Como usado aqui, o termo “linfócitos infiltrantes de tumor” (TILs) refere-se a glóbulos brancos mononucleares que não chegaram à corrente sanguínea e migraram para um tumor.

[0926] De acordo com modalidades específicas, os TILs são selecionados a partir do grupo que consiste em células T, células B, células NK e monócitos.

[0927] Os métodos de obtenção de TILs são bem conhecidos na técnica, tais como a obtenção de amostras de tumor de um indivíduo, por exemplo, biópsia ou necropsia e preparação de uma suspensão de células únicas das mesmas. A suspensão de célula única pode ser obtida de qualquer maneira adequada, por exemplo, mecanicamente (desagregando o tumor usando, por exemplo, um Dissociador GentleMACS(TM), Miltenyi Biotec,

Auburn, Calif.) ou enzimaticamente (por exemplo, colagenase ou DNase). Em seguida, pelo menos um tipo de TILs pode ser purificado a partir da suspensão de células. Existem vários métodos e reagentes conhecidos pelos versados na técnica para purificar o tipo desejado de TILs, como a seleção de tipos específicos de células usando marcadores de superfície celular (usando, por exemplo, classificador FACS ou técnicas de separação magnética de células, como estão comercialmente disponíveis, por exemplo, da Invitrogen, Stemcell Technologies, Cellpro, Advanced Magnetics ou Miltenyi Biotec.), e depleção de tipos de células específicos por métodos como erradicação (por exemplo, exterminar) com anticorpos específicos ou por purificação baseada em afinidade com base na seleção negativa (usando, por exemplo, técnicas de separação magnética de células, classificador FACS e/ou marcação por ELISA de captura). Tais métodos são descritos, por exemplo, em *“THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY”*, Volumes 1 a 4, (D.N. Weir, editor) e *“FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING”* (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 2000).

[0928] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem células fagocíticas.

[0929] Como usado aqui, o termo “células fagocíticas” refere-se a uma célula que é capaz de fagocitose e inclui células fagocíticas profissionais e não profissionais. Os métodos de análise de fagocitose são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, ensaios de extermínio, citometria de fluxo e/ou avaliação microscópica (imagem de células vivas, microscopia de fluorescência, microscopia confocal, microscopia eletrônica). De acordo com modalidades específicas, as células fagocíticas são selecionadas do grupo que consiste em monócitos, células dendríticas (DCs) e granulócitos.

[0930] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem monócitos.

[0931] De acordo com modalidades específicas, o termo “monócitos” refere-se a monócitos circulantes e macrófagos (também referidos como fagócitos mononucleares) presentes em um tecido.

[0932] De acordo com modalidades específicas, os monócitos compreendem macrófagos. Normalmente, o fenótipo da superfície celular de macrófagos inclui CD14, CD40, CD11b, CD64, F4/80 (camundongos)/EMR1 (humano), lisozima M, MAC-1/MAC-3 e CD68.

[0933] De acordo com modalidades específicas, os monócitos compreendem monócitos circulantes. Normalmente, os fenótipos da superfície celular de monócitos circulantes incluem CD14 e CD16 (por exemplo, CD14++ CD16-, CD14+CD16++, CD14++CD16+).

[0934] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem DCs.

[0935] Como usado aqui, o termo “células dendríticas (DCs)” refere-se a qualquer membro de uma população diversa de tipos de células morfológicamente semelhantes encontrados em tecidos linfóides ou não linfóides. DCs são uma classe de células apresentadoras de antígenos profissionais e têm uma alta capacidade de sensibilizar células T restritas a HLA. As DCs incluem, por exemplo, células dendríticas plasmocitoides, células dendríticas mieloides (incluindo células dendríticas imaturas e maduras), células de Langerhans, células interdigitantes, células dendríticas foliculares. As células dendríticas podem ser reconhecidas pela função ou pelo fenótipo, particularmente pelo fenótipo da superfície celular. Estas células são caracterizadas por sua morfologia distinta com projeções semelhantes a véus na superfície celular, níveis intermediários a altos de expressão de HLA-classe II de superfície e capacidade de apresentar antígeno para células T, particularmente para células T virgens (Ver Steinman R, *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 1991; 9: 271-196.). Normalmente, o fenótipo da superfície celular das DCs inclui CD1a+, CD4+, CD86+ ou HLA-DR. O termo DCs abrange DCs imaturas e maduras.

[0936] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem granulócitos.

[0937] Como usado aqui, o termo “granulócitos” refere-se

a leucócitos polimorfonucleares caracterizados pela presença de grânulos em seu citoplasma.

[0938] De acordo com modalidades específicas, os granulócitos compreendem neutrófilos.

[0939] De acordo com modalidades específicas, os granulócitos compreendem mastócitos.

[0940] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem células T.

[0941] Como usado aqui, o termo “células T” refere-se a um linfócito diferenciado com um CD3+, receptor de células T (RCT)+ com fenótipo CD4+ ou CD8+. A célula T pode ser uma célula T efetora ou reguladora.

[0942] Como usado aqui, o termo “células T efetoras” refere-se a uma célula T que ativa ou direciona outras células imunes, por exemplo, por produção de citocinas ou tem uma atividade citotóxica, por exemplo, linfócito T citotóxico CD4+, Th1/Th2, CD8+.

[0943] Como usado aqui, o termo “célula T reguladora” ou “Treg” refere-se a uma célula T que regula negativamente a ativação de outras células T, incluindo células T efetoras, bem como células do sistema imunológico inato. As células Treg são caracterizadas pela supressão sustentada das respostas das células T efetoras. De acordo com uma modalidade específica, o Treg é uma célula T CD4+CD25+Foxp3+.

[0944] De acordo com modalidades específicas, as células T são células T CD4+.

[0945] De acordo com outras modalidades específicas, as células T são células T CD8+.

[0946] De acordo com modalidades específicas, as células T são células T de memória. Exemplos não limitativos de células T de memória incluem células T CD4+ de memória efetora com um fenótipo

CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7-, células T CD4+ de memória central com um fenótipo CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7+, células T CD8+ de memória efetora com um fenótipo CD3+/CD8+ CD45RA-/CCR7- e células T CD8+ de memória central com um fenótipo CD3+/CD8+ CD45RA-/CCR7+.

[0947] De acordo com modalidades específicas, as células T compreendem células T manipuladas transduzidas com uma sequência de ácido nucleico que codifica um produto de expressão de interesse.

[0948] De acordo com modalidades específicas, o produto de expressão de interesse é um receptor de células T (RCT) ou um receptor de antígeno quimérico (CAR).

[0949] Como usada aqui, a frase “transduzida com uma sequência de ácido nucleico que codifica um RCT” ou “transdução com uma sequência de ácido nucleico que codifica um RCT” refere-se à clonagem de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  variáveis de células T com especificidade contra um antígeno desejado apresentado no contexto do MHC. Os métodos de transdução com um RCT são conhecidos na técnica e são divulgados, por exemplo, em Nicholson *et al.*, *Adv Hematol.* 2012; 2012: 404081; Wang e Rivière, *Cancer Gene Ther.* Março de 2015; 22 (2): 85-94; e Lamers *et al.*, *Cancer Gene Therapy* (2002) 9, 613-623.

[0950] Como usada aqui, a frase “transduzida com uma sequência de ácido nucleico que codifica um CAR” ou “transdução com uma sequência de ácido nucleico que codifica um CAR” refere-se à clonagem de uma sequência de ácido nucleico que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR), em que o CAR compreende uma fração de reconhecimento de antígeno e uma fração de ativação de células T. Um receptor de antígeno quimérico (CAR) é uma proteína híbrida artificialmente construída ou polipeptídeo contendo um domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo (por exemplo, um fragmento variável de cadeia única (scFv) ligado a sinalização de células T ou domínios de ativação de células T. Os métodos de transdução com um CAR são conhecidos na técnica e são divulgados, por exemplo, em Davila *et al.*, *Oncoimmunology*. 1º

de dezembro de 2012; 1 (9): 1577-1583; Wang e Rivière, *Cancer Gene Ther.* Março de 2015; 22 (2): 85-94; Maus *et al.*, *Blood.* 24 de abril de 2014; 123 (17): 2625-35; Porter DL, *The New England journal of medicine.* 2011, 365 (8): 725-733; Jackson HJ, *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13 (6): 370-383; e Globerson-Levin *et al.*, *Mol Ther.* 2014; 22 (5): 1029-1038.

[0951] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem células B.

[0952] Como usado aqui, o termo “células B” refere-se a um linfócito com um fenótipo de receptor de células B (BCR)+, CD19+ e/ou B220+. As células B são caracterizadas por sua capacidade de se ligar a um antígeno específico e desencadear uma resposta humoral.

[0953] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem células NK.

[0954] Como usado aqui, o termo “células NK” refere-se a linfócitos diferenciados com um fenótipo CD16+CD56+ e/ou CD57+RCT-. NK são caracterizados por sua capacidade de se ligar e exterminar células que não “auto” expressam antígenos MHC/HLA pela ativação de enzimas citolíticas específicas, a capacidade de exterminar células tumorais ou outras células doentes que expressam um ligante para receptores ativadores de NK, e a capacidade de liberar moléculas de proteínas chamadas citocinas que estimulam ou inibem a resposta imune.

[0955] De acordo com modalidades específicas, as células imunes compreendem células NKT.

[0956] Como usado aqui, o termo “células NKT” refere-se a uma população especializada de células T que expressam um receptor de células T  $\alpha\beta$  semi-invariante, mas também expressam uma variedade de marcadores moleculares que estão tipicamente associados a células NK, como NK1.1. As células NKT incluem NK1.1+ e NK1.1-, bem como células CD4+, CD4-, CD8+ e CD8-. O RCT nas células NKT é o único que reconhece

antígenos glicolipídicos apresentados pela molécula CD1d semelhante ao MHC I. As células NKT podem ter efeitos protetores ou deletérios devido à sua capacidade de produzir citocinas que promovem inflamação ou tolerância imunológica.

[0957] De acordo com modalidades específicas, as células imunes são obtidas de um indivíduo saudável.

[0958] De acordo com modalidades específicas, as células imunes são obtidas de um indivíduo que sofre de uma patologia.

[0959] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença de células que expressam PDL1 ou PDL1 exógeno.

[0960] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença de PDL1 exógeno.

[0961] De acordo com modalidades específicas, o PDL1 exógeno é solúvel.

[0962] De acordo com outras modalidades específicas, o PDL1 exógeno é imobilizado em um suporte sólido.

[0963] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença de células que expressam PDL1.

[0964] De acordo com modalidades específicas, as células que expressam o PDL1 compreendem células patológicas (doentes).

[0965] De acordo com modalidades específicas, as células que expressam o PDL1 compreendem células cancerosas.

[0966] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença de um agente estimulador capaz de pelo menos transmitir um sinal de ativação primário [por exemplo, ligação do receptor de células T (RCT) com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC)/complexo de peptídeo na célula que apresenta o antígeno (APC)], resultando em proliferação celular, maturação, produção de citocinas, fagocitose e/ou indução de funções

regulatórias ou efetoras da célula imunológica. De acordo com modalidades específicas, o agente estimulador também pode transmitir um sinal coestimulatório secundário.

[0967] Métodos para determinar a quantidade do agente estimulador e a razão entre o agente estimulador e as células imunes estão bem dentro das capacidades dos versados na técnica e, portanto, não são especificados aqui.

[0968] O agente estimulador pode ativar as células imunes de uma maneira dependente ou independente do antígeno (isto é, policlonal).

[0969] De acordo com modalidades específicas, o agente estimulador compreende um estimulador não específico do antígeno.

[0970] Estimuladores não específicos são conhecidos pelos versados na técnica. Assim, como um exemplo não limitativo, quando as células imunes compreendem células T, o estimulador não específico de antígeno pode ser um agente capaz de se ligar a uma estrutura de superfície de célula T e induzir a estimulação policlonal da célula T, tal como, mas não limitado a, o anticorpo anti-CD3 em combinação com uma proteína coestimuladora, como o anticorpo anti-CD28. Outros exemplos não limitativos incluem anti-CD2, anti-CD137, anti-CD134, ligantes Notch, por exemplo semelhante a Delta 1/4, Jagged1/2 sozinho ou em várias combinações com anti-CD3. Outros agentes que podem induzir a estimulação policlonal de células T incluem, mas não se limitam a, mitógenos, PHA, PMA-ionomicina, CEB e CytoStim (Miltenyi Biotec). De acordo com modalidades específicas, o estimulador não específico do antígeno compreende anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. De acordo com modalidades específicas, o estimulador de células T compreende esferas revestidas de anti-CD3 e anti-CD28, como as CD3CD28 MACSiBeads obtidas de Miltenyi Biotec.

[0971] De acordo com modalidades específicas, o agente estimulador compreende um estimulador específico do antígeno.

[0972] Exemplos não limitativos de estimuladores de

células T específicos para antígeno incluem uma célula de apresentação de antígeno carregada com antígeno [APC, por exemplo, célula dendrítica] e MHC recombinante carregado com peptídeo. Assim, por exemplo, um estimulador de células T pode ser uma célula dendrítica pré-carregada com um antígeno desejado (por exemplo, um antígeno tumoral) ou transfectada com mRNA que codifica para o antígeno desejado.

[0973] De acordo com modalidades específicas, o antígeno é um antígeno de câncer.

[0974] Como usado aqui, o termo “antígeno de câncer” se refere a um antígeno superexpresso ou expresso exclusivamente por uma célula cancerosa em comparação com uma célula não cancerosa. Um antígeno de câncer pode ser um antígeno de câncer conhecido ou um novo antígeno específico que se desenvolve em uma célula de câncer (ou seja, neoantígenos).

[0975] Exemplos não limitativos para antígenos de câncer conhecidos incluem MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-AS, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-AS, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1/CT7, MAGE-C2, NY-ES0-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 e XAGE, antígenos de diferenciação de melanócitos, p53, ras, CEA, MUC1, PMSA, PSA, tirosinase, Melan-A, MART-1, gp100, gp75, alfaactinina-4, proteína de fusão Bcr-Abl, Casp-8, beta-catenina, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, proteína de fusão dek-can, EF2, proteína de fusão ETV6-AML1, proteína de fusão LDLR-fucosiltransferaseAS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2 e 3, neo-PAP, miosina classe I, OS-9, proteína de fusão pml-RAR alfa, PTPRK, K-ras, N-ras, Triosefosfato isomerase, GnTV, Herv-K-mel, NA-88, SP17 e TRP2-Int2, (MART-1), E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, Epstein Antígenos de vírus Barr, EBNA, antígenos de papilomavírus humano (HPV) E6 e E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p185erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA,

TAG- 72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, alfa-fetoproteína, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, C0-029, FGF-5, 0250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\170K, NYCO-I, RCASI, SDCCAG16, TA-90 (proteína de ligação a Mac-2\proteína associada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP, TPS, proteínas relacionadas com tirosinase, TRP-1 ou TRP-2.

[0976] Outros antígenos tumorais que podem ser expressos são bem conhecidos na técnica (ver por exemplo W000/20581; *Cancer Vaccines and Immunotherapy* (2000) Eds Stern, Beverley e Carroll, Cambridge University Press, Cambridge). As sequências destes antígenos tumorais estão prontamente disponíveis em bancos de dados públicos, mas também são encontradas em WO 1992/020356 AI, WO 1994/005304 AI, WO 1994/023031 AI, WO 1995/020974 AI, WO 1995/023874 AI e WO 1996/026214 AI.

[0977] Alternativamente, ou adicionalmente, um antígeno tumoral pode ser identificado usando células cancerosas obtidas a partir do indivíduo, por exemplo, por biópsia.

[0978] Assim, de acordo com modalidades específicas, o agente estimulador compreende uma célula cancerosa.

[0979] De acordo com modalidades específicas, a ativação é na presença de um agente anticâncer.

[0980] De acordo com modalidades específicas, as células imunes são purificadas após a ativação.

[0981] Assim, a presente invenção também contemplou células imunes isoladas obtidas de acordo com os métodos da presente invenção.

[0982] De acordo com modalidades específicas, as células imunes utilizadas e/ou obtidas de acordo com a presente invenção podem ser recentemente isoladas, armazenadas, por exemplo, criopreservadas (ou seja,

congeladas) em, por exemplo, temperatura do nitrogênio líquido em qualquer estágio por longos períodos de tempo (por exemplo, meses, anos) para uso futuro; e linhas celulares.

[0983] Os métodos de criopreservação são comumente conhecidos por aqueles versados na técnica e são divulgados, por exemplo, na Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO2007054160 e WO 2001039594 e na Publicação do Pedido de Patente norte-americana N° US20120149108.

[0984] De acordo com modalidades específicas, as células obtidas de acordo com a presente invenção podem ser armazenadas em um banco de células ou um depósito ou instalação de armazenamento.

[0985] Consequentemente, os presentes ensinamentos sugerem ainda o uso das células imunes isoladas e os métodos da presente invenção como, mas não limitado a, uma fonte de terapias com células imunes adotivas para doenças que podem se beneficiar da ativação de células do sistema imunológico, por exemplo, uma doença hiperproliferativa; uma doença associada à supressão imunológica e infecções.

[0986] Assim, de acordo com modalidades específicas, o método da presente invenção compreende a transferência adotiva das células imunes após a referida ativação para um indivíduo em necessidade.

[0987] De acordo com modalidades específicas, são fornecidas as células imunes que podem ser obtidas de acordo com os métodos da presente invenção para uso em terapia celular adotiva.

[0988] As células usadas de acordo com modalidades específicas da presente invenção podem ser autólogas ou não autólogas; podem ser singênicas ou não singênicas: alogênicas ou xenogênicas ao indivíduo; cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[0989] Os presentes ensinamentos também contemplam o uso das composições da presente invenção (por exemplo, a proteína de fusão,

o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo ou construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo) em métodos de tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes.

[0990] Assim, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método de tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgadas aqui, um polinucleotídeo ou construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que codifica o mesmo.

[0991] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecida a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgados aqui, um polinucleotídeo ou construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que codifica o mesmo para uso no tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes.

[0992] De acordo com modalidades específicas, tratar ou o tratamento é com a proteína de fusão PD1-4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica a mesma, um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou uma célula hospedeira que expressa a mesma.

[0993] De acordo com modalidades específicas, tratar ou o tratamento é com o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[0994] De acordo com modalidades específicas, tratar ou o tratamento é com o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[0995] De acordo com modalidades específicas, tratar ou o tratamento é com o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[0996] O termo “tratar” ou “tratamento” refere-se a inibir, prevenir ou interromper o desenvolvimento de uma patologia (doença, distúrbio ou condição médica) e/ou causar a redução, remissão ou regressão de uma patologia ou sintoma de uma patologia. Os versados na técnica entenderão que várias metodologias e ensaios podem ser usados para avaliar o desenvolvimento de uma patologia e, da mesma forma, várias metodologias e ensaios podem ser usados para avaliar a redução, remissão ou regressão de uma patologia.

[0997] Como usado aqui, o termo “indivíduo” inclui mamíferos, por exemplo, seres humanos em qualquer idade e de qualquer sexo. De acordo com modalidades específicas, o termo “indivíduo” se refere a um indivíduo que sofre da patologia (doença, distúrbio ou condição médica). De acordo com modalidades específicas, este termo abrange indivíduos que estão em risco de desenvolver a patologia.

[0998] De acordo com modalidades específicas, o indivíduo sofre de uma doença associada a células que expressam PDL1.

[0999] De acordo com modalidades específicas, as células doentes do indivíduo expressam PDL1.

[1000] Como usada aqui, a frase “uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes” refere-se a doenças em que a atividade de resposta imune do indivíduo pode ser suficiente para, pelo menos, melhorar os sintomas da doença ou retardar o início dos sintomas, no entanto, por qualquer motivo, a atividade da resposta imune do indivíduo ao fazer isso é inferior a ideal.

[1001] Exemplos não limitativos de doenças que podem se beneficiar da ativação de células imunes incluem doenças hiperproliferativas, doenças associadas à supressão imunológica, imunossupressão causada por medicação (por exemplo, inibidores de mTOR, inibidor de calcineurina, esteróides) e infecções.

[1002] De acordo com modalidades específicas, a doença compreende uma doença hiperproliferativa.

[1003] De acordo com modalidades específicas, a doença hiperproliferativa compreende esclerose, fibrose, fibrose pulmonar idiopática, psoríase, esclerose/esclerodermia sistêmica, colangite biliar primária, colangite esclerosante primária, fibrose hepática, prevenção de fibrose pulmonar induzida por radiação, mielofibrose ou fibrose retroperitoneal.

[1004] De acordo com outras modalidades específicas, a doença hiperproliferativa compreende câncer.

[1005] Assim, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método de tratamento de câncer compreendendo administrar a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL divulgadas aqui para um indivíduo em necessidade do mesmo.

[1006] Como usado aqui, o termo câncer abrange cânceres malignos e pré-malignos.

[1007] No que diz respeito às formas pré-malignas ou

benignas de câncer, opcionalmente, as composições e métodos das mesmas podem ser aplicados para interromper a progressão do câncer pré-maligno para uma forma maligna.

[1008] Os cânceres que podem ser tratados pelos métodos de algumas modalidades da invenção podem ser qualquer câncer sólido ou não sólido e/ou metástase de câncer.

[1009] De acordo com modalidades específicas, o câncer compreende câncer maligno.

[1010] Os cânceres que podem ser tratados pelos métodos de algumas modalidades da invenção podem ser qualquer câncer sólido ou não sólido e/ou metástase de câncer. Exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem câncer de células escamosas, câncer de pulmão (incluindo câncer de pulmão de células pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago (incluindo câncer gastrointestinal), câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer de bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer de rim ou renal, câncer de fígado, câncer de próstata, câncer de vulva, câncer de tireoide, carcinoma hepático e vários tipos de câncer de cabeça e pescoço, bem como linfoma de células B (incluindo linfoma não Hodgkin folicular de baixo grau/(NHL); linfocítico pequeno (SL) NHL; NHL de grau intermediário/folicular; NHL difuso de grau intermediário; NHL imunoblástico de alto grau; Linfoma de Burkitt, Linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), NHL linfoblástico de alto grau; SM de alto grau NHL de todas as células não clivadas; doença volumosa NHL; linfoma de células do manto; Linfoma relacionado à AIDS; e Macroglobulinemia de Waldenstrom); Linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); Leucemia mieloide aguda (AML), Leucemia

promielocítica aguda (APL), Leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crônica (CML); e distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (PTLD), bem como proliferação vascular anormal associada a facomatoses, edema (como aquele associado a tumores cerebrais) e síndrome de Meigs. De preferência, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de mama, câncer colorretal, câncer retal, câncer de pulmão de células não pequenas, linfoma de não Hodgkins (NHL), câncer de células renais, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer pancreático, sarcoma de tecido, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer de ovário, mesotelioma e mieloma múltiplo. As condições cancerosas passíveis de tratamento da invenção incluem cânceres metastáticos.

[1011] De acordo com modalidades específicas, o câncer compreende câncer pré-maligno.

[1012] Cânceres pré-malignos (ou pré-cânceres) são bem caracterizados e conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, Berman JJ. E Henson DE., 2003. *Classifying the precancers: a metadata approach*. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8). Classes de cânceres pré-malignos passíveis de tratamento através do método da invenção incluem cânceres pré-malignos pequenos ou microscópicos adquiridos, grandes lesões adquiridas com atipia nuclear, lesões precursoras que ocorrem com síndromes hiperplásicas hereditárias que progridem para câncer e hiperplasias difusas adquiridas e metaplasias difusas. Exemplos de cânceres pré-malignos pequenos ou microscópicos incluem HGSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau do colo uterino), AIN (neoplasia intraepitelial anal), displasia das cordas vocais, criptas aberrantes (do cólon), PIN (neoplasia intraepitelial prostática). Exemplos de grandes lesões adquiridas com atipia nuclear incluem adenoma tubular, AILD (linfadenopatia angioimunoblástica com disproteinemia), meningioma atípico, pólipos gástricos, parapsoríase de placa grande, mielodisplasia, carcinoma de células transicionais papilares *in situ*, anemia refratária com excesso de blastos, e papiloma de Schneider. Exemplos de lesões precursoras que ocorrem com

síndromes hiperplásicas hereditárias que progridem para câncer incluem síndrome de toupeira atípica, adenomatose de células C e MEA. Exemplos de hiperplasias difusas adquiridas e metaplasias difusas incluem AIDS, hiperplasia linfóide atípica, doença óssea de Paget, doença linfoproliferativa pós-transplante e colite ulcerativa.

[1013] De acordo com modalidades específicas, o câncer é leucemia mieloide aguda, câncer anal, carcinoma basocelular, linfoma não-Hodgkin de células B, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer cervical, leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia mielocítica crônica (CML), Câncer colorretal, Linfoma cutâneo de células T, Linfoma difuso de grandes células B, Câncer endometrial, Câncer de esôfago, Câncer de trompa de Falópio, Linfoma folicular, Câncer gástrico, Carcinomas de junção gastroesofágico (GE), Tumores de células germinativas, Germinomatoso), Tumores de células germinativas, glioblastoma multiforme (GBM), gliosarcoma, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, câncer de hipofaringe, câncer de laringe, leiomiossarcoma, linfoma de células de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, linfoma de Hodgkin, câncer de hipofaringe, câncer de laringe, leiomiossarcoma, linfoma de células de Merkel, mieloma, Carcinoma de células de Merkel, mieloma múltiplo, tumores neuroendócrinos, linfoma não-Hodgkin, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de cavidade oral (boca), câncer orofaríngeo, osteossarcoma, câncer de ovário, câncer pancreático, tumor de bainha do nervo periférico (neurofibrossarcoma periférico), Linfomas periféricos de células T (PTCL), câncer peritoneal, câncer de próstata, carcinoma de células renais, câncer de glândula salivar, câncer de pele, câncer de pulmão de células pequenas, sarcoma de tecido mole, carcinoma de células escamosas, sarcoma sinovial, câncer testicular, carcinoma tímico, câncer de tireoide, Câncer de ureter, câncer uretral, câncer uterino, câncer vaginal ou câncer vulvar.

[1014] De acordo com modalidades específicas, o câncer é leucemia mieloide aguda, câncer de bexiga, câncer de mama, leucemia

linfocítica crônica, leucemia mielóide crônica, câncer colorretal, linfoma difuso de grandes células B, câncer epitelial de ovário, tumor epitelial, câncer de trompa de falópio, linfoma folicular, Glioblastoma multiforme, carcinoma hepatocelular, câncer de cabeça e pescoço, leucemia, linfoma, linfoma de células do manto, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiplo, câncer de nasofaringe, linfoma não Hodgkin, carcinoma de células não pequenas do pulmão, câncer de ovário, câncer de próstata ou carcinoma de células renais.

[1015] De acordo com modalidades específicas, o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em linfoma, leucemia e carcinoma.

[1016] De acordo com modalidades específicas, o câncer é selecionado do grupo que consiste em linfoma, leucemia, câncer de cólon, câncer de pâncreas, câncer de ovário, câncer de pulmão e carcinoma de células escamosas.

[1017] De acordo com modalidades específicas, o câncer é carcinoma de cólon.

[1018] De acordo com modalidades específicas, o câncer é carcinoma de ovário.

[1019] De acordo com modalidades específicas, o câncer é carcinoma de pulmão.

[1020] De acordo com modalidades específicas, o câncer é carcinoma de cabeça e pescoço.

[1021] De acordo com modalidades específicas, o câncer é leucemia.

[1022] De acordo com modalidades específicas, a leucemia é selecionada a partir do grupo que consiste em leucemia não linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crônica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucêmica, leucemia blástica basal, leucemia celular, leucemia bovina, leucemia mielocítica crônica, leucemia cutis, leucemia

embrionária, leucemia eosinofílica, leucemia ross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células-tronco, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopênica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfogênica, leucemia linfóide, leucemia de linfossarcoma, leucemia de mastócitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia mieloide granulocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmocítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células-tronco, leucemia subleucêmica e leucemia de células indiferenciadas.

[1023] De acordo com modalidades específicas, a leucemia é leucemia promielocítica, leucemia mielóide aguda ou leucemia mielóide crônica.

[1024] De acordo com modalidades específicas, o câncer é linfoma.

[1025] De acordo com modalidades específicas, o linfoma é linfoma de células B.

[1026] De acordo com modalidades específicas, o linfoma é linfoma de células T.

[1027] De acordo com outras modalidades específicas, o linfoma é linfoma de Hodgkins.

[1028] De acordo com modalidades específicas, o linfoma é linfoma não-Hodgkin.

[1029] De acordo com modalidades específicas, o Linfoma não Hodgkin é selecionado do grupo que consiste em NHL agressivo, NHL transformado, NHL indolente, NHL recidivante, NHL refratário, Linfoma não Hodgkin de baixo grau, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de células do manto, linfoma de Burkitt, linfoma de

células NK, linfoma difuso de grandes células B, linfoma linfoblástico agudo e câncer cutâneo de células T, incluindo micose fungóide/síndrome de Sezary.

[1030] De acordo com modalidades específicas, o câncer é mieloma múltiplo.

[1031] De acordo com pelo menos algumas modalidades, o mieloma múltiplo é selecionado a partir do grupo que consiste em cânceres de mieloma múltiplo que produzem cadeias leves do tipo kappa e/ou cadeias leves do tipo lambda; mieloma múltiplo agressivo, incluindo leucemia de células plasmáticas primárias (LCP); doenças benignas das células plasmáticas, como MGUS (gamopatia monoclonal de significado indeterminado), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM, também conhecido como linfoma linfoplasmocitário), que pode evoluir para mieloma múltiplo; mieloma múltiplo latente (SMM), mieloma múltiplo indolente, formas pré-malignas de mieloma múltiplo que também podem evoluir para mieloma múltiplo; amiloidose primária.

[1032] De acordo com modalidades específicas, o câncer é definido pela presença de tumores que têm linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) no microambiente tumoral e/ou tumores com uma expressão relativamente alta de PDL1 no microambiente tumoral.

[1033] De acordo com modalidades específicas, as células do câncer expressam PDL1.

[1034] De acordo com modalidades específicas, a doença compreende uma doença associada à imunossupressão ou imunossupressão causada por medicação (por exemplo, inibidores de mTOR, inibidor de calcineurina, esteróides).

[1035] De acordo com modalidades específicas, a doença compreende vírus HIV, sarampo, influenza, LCCM, RSV, rinovírus humano, EBV, CMV ou Parvo.

[1036] De acordo com modalidades específicas, a doença compreende uma infecção.

[1037] Como usado aqui, o termo “infecção” ou “doença infecciosa” refere-se a uma doença induzida por um patógeno. Exemplos específicos de patógenos incluem patógenos virais, patógenos bacterianos, por exemplo, patógenos micobacterianos intracelulares (como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*), patógenos bacterianos intracelulares (como, por exemplo, *Listeria monocytogenes*), ou patógenos protozoários intracelulares (como, por exemplo, *Leishmania* e *Trypanosoma*).

[1038] Tipos específicos de patógenos virais que causam doenças infecciosas tratáveis de acordo com os ensinamentos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, retrovírus, circovírus, parvovírus, papovavírus, adenovírus, herpesvírus, iridovírus, poxvírus, hepadnavírus, picornavírus, calicivírus, a flavírus, reovírus, ortomixovírus, paramixovírus, rabdovírus, bunyavírus, coronavírus, arenavírus e filovírus.

[1039] Exemplos específicos de infecções virais que podem ser tratadas de acordo com os ensinamentos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, síndrome da imunodeficiência adquirida induzida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (AIDS), gripe, infecção rinoviral, meningite viral, Infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), infecção pelo vírus da hepatite A, B ou C, sarampo, infecção pelo vírus do papiloma/verrugas, infecção pelo citomegalovírus (CMV), infecção pelo vírus Herpes simplex, febre amarela, infecção pelo vírus Ebola, raiva, etc.

[1040] De acordo com modalidades específicas, as composições aqui divulgadas (por exemplo, proteína de fusão PD1-4-1BBL, polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, polinucleotídeo ou construto de ácido nucleico que codifica a mesma e/ou célula hospedeira que expressa a mesma) podem ser administradas a um indivíduo em combinação com outro regime terapêutico estabelecido ou experimental para tratar uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes (por exemplo, câncer) incluindo, mas não se limitando a, analgésicos, agentes quimioterápicos,

agentes radioterapêuticos, terapias citotóxicas (condicionamento), terapia hormonal, anticorpos e outros regimes de tratamento (por exemplo, cirurgia) que são bem conhecidos na técnica.

[1041] De acordo com modalidades específicas, as composições aqui divulgadas (por exemplo, proteína de fusão PD1-4-1BBL, polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, polinucleotídeo ou construto de ácido nucleico que codifica a mesma e/ou célula hospedeira que expressa a mesma) podem ser administradas a um indivíduo em combinação com o transplante de células adotivas, tais como, mas não se limitando a, o transplante de células da medula óssea, células-tronco hematopoiéticas, PBMCs, células-tronco do cordão umbilical e/ou células-tronco pluripotentes induzidas.

[1042] De acordo com modalidades específicas, o agente terapêutico administrado em combinação com a composição de algumas modalidades da invenção compreende um agente anticâncer.

[1043] Assim, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método de tratamento de câncer que compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo um agente anticâncer; e a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgados, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[1044] O agente anticâncer que pode ser usado com modalidades específicas da invenção incluem, mas não estão limitados a, os medicamentos anticâncer Acivicina; Aclarubicina; Cloridrato de Acodazol; Acronina; Adriamicina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramicina; Asparaginase; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat;

Benzodepa; Bicalutamida; Cloridrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar de Sódio; Bropirimina; Bussulfano; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetímer; Carboplatina; Carmustina; Cloridrato de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucila; Cirolemicina; Cisplatina; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Cloridrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatina; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; Cloridrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Cloridrato de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatina; Enpromato; Epiropidina; Cloridrato de Epirubicina; Erbulozola; Cloridrato de Esorubicina; Estramustina; Estramustina Fosfato de Sódio; Etanidazol; Etoposida; Fosfato de Etoposido; Etoprina; Cloridrato de Fadrozola; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracil; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina de Sódio; Gencitabina; Cloridrato de Gencitabina; Hidroxiureia; Cloridrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferon Alfa-2a; Interferon Alfa-2b; Interferon Alfa-n1; Interferon Alfa-n3; Interferon Beta-1a; Interferon Gamma- 1b; Iproplatina; Cloridrato de Irinotecano; Acetato de Lanreotida; Letrozola; Acetato de Leuprolida; Cloridrato de Liarozola; Lometrexol de Sódio; Lomustina; Cloridrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maytansina; Cloridrato de Mecloretamina; Acetato de megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalano; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato de Sódio; Metoprina; Meturedepa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Cloridrato de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatina; Oxisurano; Paclitaxel; Pegaspargase; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromano; Pipsulfano; Cloridrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero de Sódio; Porfiromicina; Prednimustina; Cloridrato de Procarbazina; Puomicina; Cloridrato de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Cloridrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Sparfosato de Sódio; Esparsomicina; Cloridrato de Espirogermânio; Espiromustina; Espiroplatina;

Estreptonigrina; Estreptozocina; Sulofenuro; Talisomicina; Taxol; Tecogalano de Sódio; Tegafur; Cloridrato de Teloxantrona; Temoporfina; Teniposida; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofuirin; Tirapazamina; Cloridrato de Topotecano; Citrato de toremifeno; Acetato De Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Cloridrato de Tubulozol; Mostarda Uracil; Uredepa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozola; Zeniplatina; Zinostatina; Cloridrato de Zorubicina. Agentes antineoplásicos adicionais incluem aqueles divulgados no Capítulo 52 de *Antineoplastic Agents* (Paul Calabresi e Bruce A. Chabner), e a introdução aos mesmos, 1202-1263, de Goodman e Gilman's "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*", Oitava Edição, 1990, McGraw- Hill, Inc. (Divisão de Profissões de Saúde).

[1045] De acordo com modalidades específicas, o agente anticâncer compreende um anticorpo.

[1046] De acordo com modalidades específicas, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste em rituximabe, cetuximabe, trastuzumabe, edrecolomabe, alemtuzumabe, gemtuzumabe, ibritumomabe, panitumumabe, Belimumabe, Bevacizumabe, Bivatuzimumabe mertansine, Blinatumabumabutimabe, Brontumabumabe, Catexumabumabe, Catexumabumabe, Adixotumabumabe, Vedixumabumabe, Blontuxumabumabe, Blontuxumabe, Bezlotoxumabe, certolizumabe, certolizumabe, Citatuzumabe bogatox, Daratumumabe, Dinutuximabe, elotuzumabe, Ertumaxomabe, Etaracizumabe, gemtuzumabe ozogamicina, Girentuximabe, Necitumumabe, Obinutuzumabe, ofatumumabe, pertuzumabe, Ramucirumabe, Siltuximabe, Tositumomabe, Nivolumabe, Pembrolizumabe, Durvalumabe, Atezolizumabe, Avelumabe, Trastuzumabe e ipilimumabe.

[1047] De acordo com modalidades específicas, o anticorpo é selecionado do grupo que consiste em rituximabe e cetuximabe.

[1048] De acordo com modalidades específicas, o agente terapêutico ou o agente anticâncer compreende um IMiD (por exemplo, Talidomida, Lenalidomida, Pomalidomida).

[1049] De acordo com modalidades específicas, o IMiD é selecionado do grupo que consiste em Talidomida, Lenalidomida, Pomalidomida.

[1050] De acordo com modalidades específicas, o agente terapêutico administrado em combinação com a composição de algumas modalidades da invenção compreende um agente anti-infecção (por exemplo, antibióticos e agentes antivirais)

[1051] De acordo com modalidades específicas, o agente terapêutico administrado em combinação com a composição de algumas modalidades da invenção compreende um agente imunossupressor (por exemplo, GCSF e outros estimuladores da medula óssea, esteroides).

[1052] De acordo com modalidades específicas, a terapia de combinação tem um efeito aditivo.

[1053] De acordo com modalidades específicas, a terapia de combinação tem um efeito sinérgico.

[1054] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um artigo de fabricação que compreende um material de embalagem que acondiciona um agente terapêutico para o tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes; e a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgados, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[1055] De acordo com modalidades específicas, o artigo de fabricação é identificado para o tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes.

[1056] De acordo com modalidades específicas, o agente terapêutico para tratar a referida doença; e a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, o polinucleotídeo que codifica o mesmo, o construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou a célula hospedeira que expressa o mesmo são embalados em recipientes separados.

[1057] De acordo com modalidades específicas, o agente terapêutico para tratar a referida doença; e a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, o polinucleotídeo ou o ácido nucleico que codifica o mesmo, o construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou o a célula hospedeira que expressa o mesmo são embalados em uma coformulação.

[1058] De acordo com modalidades específicas, o artigo de fabricação compreende a proteína de fusão PD1-4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica a mesma, um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou uma célula hospedeira que expressa a mesma.

[1059] De acordo com modalidades específicas, o artigo de fabricação compreende o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[1060] De acordo com modalidades específicas, o artigo de fabricação compreende o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[1061] De acordo com modalidades específicas, o artigo de

fabricação compreende a sequência de aminoácidos PD1, um polinucleotídeo que codifica a mesma, um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou uma célula hospedeira que expressa a mesma; e a sequência de aminoácidos 4-1BBL, um polinucleotídeo que codifica a mesma, um construto de ácido nucleico que codifica a mesma ou uma célula hospedeira que expressa a mesma.

[1062] Assim, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um artigo de fabricação que compreende um material de embalagem que acondiciona o polipeptídeo isolado que compreende a sequência de aminoácidos PD1 aqui divulgada, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo; e o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgada, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo.

[1063] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 aqui divulgada, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo; e o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgada, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo são embalados em recipientes separados.

[1064] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1 aqui divulgada, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo; e o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgada, um polinucleotídeo que codifica o mesmo, um construto de ácido nucleico que codifica o mesmo ou uma célula hospedeira que expressa o mesmo são embalados em uma coformulação.

[1065] De acordo com modalidades específicas, o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos PD1; e/ou o polipeptídeo isolado compreendendo a sequência de aminoácidos 4-1BBL está ligado a ou compreende uma fração terapêutica heteróloga. A porção terapêutica pode ser qualquer molécula, incluindo compostos químicos de moléculas pequenas e polipeptídeos.

[1066] Exemplos não limitativos de frações terapêuticas que podem ser usadas com modalidades específicas da invenção incluem uma fração citotóxica, uma fração tóxica, uma fração de citocina, uma fração imunomoduladora, um polipeptídeo, um anticorpo, um medicamento, um produto químico e/ou um radioisótopo.

[1067] De acordo com algumas modalidades da invenção, a fração terapêutica é conjugada por fusão de tradução do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de algumas modalidades da invenção com a sequência de ácido nucleico que codifica a fração terapêutica.

[1068] Adicionalmente ou alternativamente, a porção terapêutica pode ser quimicamente conjugada (acoplada) ao polipeptídeo de algumas modalidades da invenção, usando qualquer método de conjugação conhecido por um versado na técnica. Por exemplo, um peptídeo pode ser conjugado a um agente de interesse, usando um éster N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propionico (também chamado de N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato) ("SDPD") (Sigma, Cat. No. P-3415; ver, por exemplo, Cumber *et al.* 1985, *Methods of Enzymology* 112: 207-224), um procedimento de conjugação de glutaraldeído (ver, por exemplo, GT Hermanson 1996, "*Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques*", Academic Press, San Diego) ou um procedimento de conjugação de carbodiimida [ver, por exemplo, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure*, pp. 349-50 & 372-74 (3d ed.), 1985; B. Neises *et al.* 1978, *Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 17: 522; A. Hassner *et al.* 1978, *Tetrahedron Lett.* 4475; EP Boden *et al.* 1986, *J. Org. Chem.* 50: 2394 e LJ Mathias 1979, *Synthesis* 561].

[1069] Uma fração terapêutica pode ser anexada, por exemplo, ao polipeptídeo de algumas modalidades da invenção usando técnicas de síntese química padrão amplamente praticadas na técnica [ver, por exemplo, [hypertexttransferprotocol://worldwideweb\(ponto\)chemistry\(ponto\)org/portal/Chemistry](http://worldwideweb(ponto)chemistry(ponto)org/portal/Chemistry)]], tal como o uso de qualquer ligação química adequada, direta ou indireta, por meio de uma ligação peptídica (quando a fração funcional é um polipeptídeo), ou via ligação covalente a um elemento ligante interveniente, tal como um peptídeo ligante ou outra fração química, como um polímero orgânico. Os peptídeos quiméricos podem ser ligados por meio de ligação nos terminais carboxi (C) ou amino (N) dos peptídeos, ou via ligação a grupos químicos internos, tais como cadeias laterais lineares, ramificadas ou cíclicas, átomos de carbono ou nitrogênio internos e semelhantes.

[1070] Como usados aqui, os termos “proteína”, “peptídeo” e “polipeptídeo”, que são usados indistintamente aqui, abrangem peptídeos nativos (produtos de degradação, peptídeos sintetizados sinteticamente ou peptídeos recombinantes) e peptidomiméticos (tipicamente, peptídeos sinteticamente sintetizados), bem como peptídeos e semipeptídeos que são análogos de peptídeos, que podem ter, por exemplo, modificações que tornam os peptídeos mais estáveis enquanto em um corpo ou mais capazes de penetrar nas células. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas a modificação do terminal N, modificação do terminal C, modificação da ligação peptídica, modificações da estrutura principal e modificação do resíduo. Os métodos para a preparação de compostos peptidomiméticos são bem conhecidos na técnica e são especificados, por exemplo, em *Quantitative Drug Design*, CA. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), que é incorporado por referência como se aqui fosse totalmente apresentado. Mais detalhes a esse respeito são fornecidos a seguir.

[1071] As ligações peptídicas (-CO-NH-) dentro do peptídeo podem ser substituídas, por exemplo, por ligações amida N-metilada (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-), ligações éster (-C(=O)-O-), ligações cetometileno (-CO-CH<sub>2</sub>-),

ligações sulfinilmetileno (-S(=O)-CH<sub>2</sub>-), ligações  $\alpha$ -aza (-NH-N(R)-CO-), em que R é qualquer alquil (por exemplo, metil), ligações de amina (-CH<sub>2</sub>-NH-), ligações de sulfeto (-CH<sub>2</sub>-S-), ligações de etileno (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), ligações de hidroxietileno (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-), ligações de tioamida (-CS-NH-), ligações duplas olefínicas (-CH=CH-), ligações duplas olefínicas fluoradas (-CF=CH-), ligações retroamida (-NH-CO-), derivados de peptídeos (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), em que R é a cadeia lateral “normal”, naturalmente presente no átomo de carbono.

[1072] Estas modificações podem ocorrer em qualquer uma das ligações ao longo da cadeia peptídica e até mesmo em várias ligações (2-3) ao mesmo tempo.

[1073] Aminoácidos aromáticos naturais, Trp, Tyr e Phe, podem ser substituídos por aminoácidos aromáticos não naturais, tais como ácido 1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic), naftilalanina, derivados metilados em anel de Phe, derivados halogenados de Phe ou O-metil-Tyr.

[1074] Os peptídeos de algumas modalidades da invenção também podem incluir um ou mais aminoácidos modificados ou um ou mais monômeros de não aminoácidos (por exemplo, ácidos graxos, carboidratos complexos etc.).

[1075] O termo “aminoácido” ou “aminoácidos” é entendido como incluindo os 20 aminoácidos de ocorrência natural; aqueles aminoácidos frequentemente modificados pós-tradução *in vivo*, incluindo, por exemplo, hidroxiprolina, fosfoserina e fosfotreonina; e outros aminoácidos incomuns, incluindo, mas não se limitando a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina e ornitina. Além disso, o termo “aminoácido” inclui os aminoácidos D e L.

[1076] As Tabelas 1 e 2 abaixo listam aminoácidos de ocorrência natural (Tabela 1) e aminoácidos não convencionais ou modificados (por exemplo, sintético, Tabela 2) que podem ser usados com algumas modalidades da invenção.

**Tabela 1**

| <b>Aminoácido</b>              | <b>Abreviatura de três letras</b> | <b>Símbolo de uma letra</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Alanina                        | Ala                               | A                           |
| Arginina                       | Arg                               | R                           |
| Asparagina                     | Asn                               | N                           |
| Ácido aspártico                | Asp                               | D                           |
| Cisteína                       | Cys                               | C                           |
| Glutamina                      | Gln                               | Q                           |
| Ácido glutâmico                | Glu                               | E                           |
| Glicina                        | Gly                               | G                           |
| Histidina                      | His                               | H                           |
| Isoleucina                     | Ile                               | I                           |
| Leucina                        | Leu                               | L                           |
| Lisina                         | Lys                               | K                           |
| Metionina                      | Met                               | M                           |
| Fenilalanina                   | Phe                               | F                           |
| Prolina                        | Pro                               | P                           |
| Serina                         | Ser                               | S                           |
| Treonina                       | Thr                               | T                           |
| Triptofano                     | Trp                               | W                           |
| Tirosina                       | Tyr                               | Y                           |
| Valina                         | Val                               | V                           |
| Qualquer aminoácido como acima | Xaa                               | X                           |

**Tabela 2**

| <b>Aminoácido não convencional</b> | <b>Código</b> | <b>Aminoácido não convencional</b> | <b>Código</b> |
|------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
| ornitina                           | Orn           | hidroxiprolina                     | Hyp           |
| ácido $\alpha$ -aminobutírico      | Abu           | aminonorbornil- carboxilato        | Norb          |
| D-alanina                          | Dala          | aminociclopropano- carboxilato     | Cpro          |

|                     |        |                               |       |
|---------------------|--------|-------------------------------|-------|
| D-arginina          | Darg   | N-(3-guanidinopropil) glicina | Narg  |
| D-asparagina        | Dasn   | N-(carbamilmetil) glicina     | Nasn  |
| Ácido D-aspartico   | Dasp   | N-(carboximetil) glicina      | Nasp  |
| D-cisteína          | Dcys   | N-(tiometil) glicina          | Ncys  |
| D-glutamina         | Dgln   | N-(2-carbamiletil) glicina    | Ngln  |
| Ácido D-glutâmico   | Dglu   | N-(2-carboxietil) glicina     | Nglu  |
| D-histidina         | Dhis   | N-(imidazoliletil) glicina    | Nhis  |
| D-isoleucina        | Dile   | N-(1-metilpropil) glicina     | Nile  |
| D-leucina           | Dleu   | N-(2-metilpropil) glicina     | Nleu  |
| D-lisina            | Dlys   | N-(4-aminobutil) glicina      | Nlys  |
| D-metionina         | Dmet   | N-(2-metiltioetil) glicina    | Nmet  |
| D-ornitina          | Dorn   | N-(3-aminopropil) glicina     | Norn  |
| D-fenilalanina      | Dphe   | N-benzilglicina               | Nphe  |
| D-prolina           | Dpro   | N-(hidroximetil) glicina      | Nser  |
| D-serina            | Dser   | N-(1-hidroxietil) glicina     | Nthr  |
| D-treonina          | Dthr   | N-(3-indoliletil) glicina     | Nhtrp |
| D-triptofano        | Dtrp   | N-(p-hidroxifenil) glicina    | Ntyr  |
| D-tirosina          | Dtyr   | N-(1-metiletil) glicina       | Nval  |
| D-valina            | Dval   | N-metilglicina                | Nmgly |
| D-N-metilalanina    | Dnmala | L-N-metilalanina              | Nmala |
| D-N-metilarginina   | Dnmarg | L-N-metilarginina             | Nmarg |
| D-N-metilasparagina | Dnmasn | L-N-metilasparagina           | Nmasn |
| D-N-metilasparatato | Dnmasp | Ácido L-N-metilaspartico      | Nmasp |
| D-N-metilcisteína   | Dnmcys | L-N-metilcisteína             | Nmcys |
| D-N-metilglutamina  | Dnmgln | L-N-metilglutamina            | Nmgln |
| D-N-metilglutamato  | Dnmglu | Ácido L-N-metilglutâmico      | Nmglu |
| D-N-metilhistidina  | Dnmhis | L-N-metilhistidina            | Nmhis |
| D-N-metilisoleucina | Dnmile | L-N-metilisoleucina           | Nmile |
| D-N-metileucina     | Dnmleu | L-N-metileucina               | Nmleu |
| D-N-metilisina      | Dnmlys | L-N-metilisina                | Nmlys |
| D-N-metilmetionina  | Dnmmet | L-N-metilmetionina            | Nmmet |

|                                           |        |                                                    |         |
|-------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------|---------|
| D-N-metilornitina                         | Dnmorn | L-N-metilornitina                                  | Nmorn   |
| D-N-metilfenilalanina                     | Dnmphe | L-N-metilfenilalanina                              | Nmphe   |
| D-N-metilprolina                          | Dnmpro | L-N-metilprolina                                   | Nmpro   |
| D-N-metilserina                           | Dnmser | L-N-metilserina                                    | Nmser   |
| D-N-metiltreonina                         | Dnmthr | L-N-metiltreonina                                  | Nmthr   |
| D-N-metilriptofano                        | Dnmtrp | L-N-metilriptofano                                 | Nmtrp   |
| D-N-metiltirosina                         | Dnmtyr | L-N-metiltirosina                                  | Nmtyr   |
| D-N-metilvalina                           | Dnmval | L-N-metilvalina                                    | Nmval   |
| L-norleucina                              | Nle    | L-N-metilnorleucina                                | Nmnle   |
| L-norvalina                               | Nva    | L-N-metilnorvalina                                 | Nmnva   |
| L-etilglicina                             | Etg    | L-N-metil-etilglicina                              | Nmetg   |
| L-t-butilglicina                          | Tbug   | L-N-metil-t-butilglicina                           | Nmtbug  |
| L-homofenilalanina                        | Hphe   | L-N-metil-homofenilalanina                         | Nmhphe  |
| $\alpha$ -naftilalanina                   | Anap   | N-metil- $\alpha$ -naftilalanina                   | Nmanap  |
| penicilamina                              | Pen    | N-metilpenicilamina                                | Nmpen   |
| ácido $\gamma$ -aminobutírico             | Gabu   | N-metil- $\gamma$ -aminobutirato                   | Nmgabu  |
| ciclohexilalanina                         | Chexa  | N-metil-ciclohexilalanina                          | Nmchexa |
| ciclopentilalanina                        | Cpen   | N-metil-ciclopentilalanina                         | Nmcpen  |
| $\alpha$ -amino- $\alpha$ - metilbutirato | Aabu   | N-metil- $\alpha$ -amino- $\alpha$ - metilbutirato | Nmaabu  |
| ácido $\alpha$ -aminoisobutírico          | Aib    | N-metil- $\alpha$ -aminoisobutirato                | Nmaib   |
| D- $\alpha$ -metilarginina                | Dmarg  | L- $\alpha$ -metilarginina                         | Marg    |
| D- $\alpha$ -metilasparagina              | Dmasn  | L- $\alpha$ -metilasparagina                       | Masn    |
| D- $\alpha$ -metilaspartato               | Dmasp  | L- $\alpha$ -metilaspartato                        | Masp    |
| D- $\alpha$ -metilcisteína                | Dmcys  | L- $\alpha$ -metilcisteína                         | Mcys    |
| D- $\alpha$ -metilglutamina               | Dmgln  | L- $\alpha$ -metilglutamina                        | Mgln    |
| Ácido D- $\alpha$ -metil glutâmico        | Dmglu  | L- $\alpha$ -metilglutamato                        | Mglu    |
| D- $\alpha$ -metilhistidina               | Dmhis  | L- $\alpha$ -metilhistidina                        | Mhis    |
| D- $\alpha$ -metilisoleucina              | Dmile  | L- $\alpha$ -metilisoleucina                       | Mile    |
| D- $\alpha$ -metileucina                  | Dmleu  | L- $\alpha$ -metilleucina                          | Mleu    |
| D- $\alpha$ -metilisina                   | Dmlys  | L- $\alpha$ -metilisina                            | Mlys    |
| D- $\alpha$ -metilmetionina               | Dmmet  | L- $\alpha$ -metilmetionina                        | Mmet    |

|                                                 |       |                                                    |        |
|-------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------|--------|
| D- $\alpha$ -metilornitina                      | Dmorn | L- $\alpha$ -metilornitina                         | Morn   |
| D- $\alpha$ -metilfenilalanina                  | Dmphe | L- $\alpha$ -metilfenilalanina                     | Mphe   |
| D- $\alpha$ -metilprolina                       | Dmpro | L- $\alpha$ -metilprolina                          | Mpro   |
| D- $\alpha$ -metilserina                        | Dmser | L- $\alpha$ -metilserina                           | Mser   |
| D- $\alpha$ -metiltreonina                      | Dmthr | L- $\alpha$ -metiltreonina                         | Mthr   |
| D- $\alpha$ -metiltryptofano                    | Dmtrp | L- $\alpha$ -metiltryptofano                       | Mtrp   |
| D- $\alpha$ -metiltirosina                      | Dmtyr | L- $\alpha$ -metiltirosina                         | Mtyr   |
| D- $\alpha$ -metilvalina                        | Dmval | L- $\alpha$ -metilvalina                           | Mval   |
| N-ciclobutilglicina                             | Ncbut | L- $\alpha$ -metilnorvalina                        | Mnva   |
| N-cicloheptilglicina                            | Nchep | L- $\alpha$ -metiletilglicina                      | Metg   |
| N-ciclohexilglicina                             | Nchex | L- $\alpha$ -metil- <i>t</i> -butilglicina         | Mtbug  |
| N-ciclododecilglicina                           | Ncdec | L- $\alpha$ -metil-homofenilalanina                | Mhphe  |
| N-ciclododecilglicina                           | Ncdod | $\alpha$ -metil- $\alpha$ - naftilalanina          | Manap  |
| N-ciclooctilglicina                             | Ncoct | $\alpha$ -metilpenicilamina                        | Mpen   |
| N-ciclopropilglicina                            | Ncpro | $\alpha$ -metil- $\gamma$ - aminobutirato          | Mgabu  |
| N-cicoundecilglicina                            | Ncund | $\alpha$ -metil-ciclohexilalanina                  | Mchexa |
| N-(2-aminoetil) glicina                         | Naeg  | $\alpha$ -metil-ciclopentilalanina                 | Mcpen  |
| N-(2,2-difeniletil) glicina                     | Nbhm  | N-(N-(2,2-difeniletil) carbamilmetil-glicina       | Nnbhm  |
| N-(3,3-difenilpropil) glicina                   | Nbhe  | N-(N-(3,3-difenilpropil) carbamilmetil-glicina     | Nnbhe  |
| 1-carboxi-1-(2,2-difeniletilamino) ciclopropano | Nmbc  | Ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico | Tic    |
| fosfoserina                                     | pSer  | fosfotreonina                                      | pThr   |
| fosfotirosina                                   | pTyr  | O-metil-tirosina                                   |        |
| Ácido 2-aminoadípico                            |       | hidroxilisina                                      |        |

[1077] Os peptídeos de algumas modalidades da invenção são preferencialmente utilizados em uma forma linear, embora seja apreciado que nos casos em que a ciclização não interfere gravemente com as características do peptídeo, as formas cíclicas do peptídeo também podem ser utilizadas.

[1078] Uma vez que os presentes peptídeos são preferencialmente utilizados em terapêuticas que requerem que os peptídeos estejam na forma solúvel, os peptídeos de algumas modalidades da invenção incluem preferencialmente um ou mais aminoácidos polares não naturais ou naturais, incluindo, mas não se limitando a, serina e treonina que são capazes de aumentar a solubilidade do peptídeo devido à sua cadeia lateral contendo hidroxila.

[1079] Os aminoácidos dos peptídeos da presente invenção podem ser substituídos de forma conservativa ou não conservativa.

[1080] O termo “substituição conservativa”, como usado aqui, refere-se à substituição de um aminoácido presente na sequência nativa no peptídeo por um amino de ocorrência natural ou não natural ou um peptidomimético com propriedades estéricas semelhantes. Quando a cadeia lateral do aminoácido nativo a ser substituído é polar ou hidrofóbica, a substituição conservativa deve ser com um aminoácido de ocorrência natural, um aminoácido de ocorrência não natural ou com uma fração peptidomimética que também é polar ou hidrofóbica (além de ter as mesmas propriedades estéricas que a cadeia lateral do aminoácido substituído).

[1081] Como os aminoácidos de ocorrência natural são tipicamente agrupados de acordo com suas propriedades, as substituições conservativas por aminoácidos de ocorrência natural podem ser facilmente determinadas tendo em mente o fato de que, de acordo com a invenção, a substituição de aminoácidos carregados por aminoácidos não carregados estericamente semelhantes é considerada como substituições conservativas.

[1082] Para produzir substituições conservativas por aminoácidos de ocorrência não natural, também é possível usar análogos de aminoácidos (aminoácidos sintéticos) bem conhecidos na técnica. Um peptidomimético do aminoácido de ocorrência natural está bem documentado na literatura conhecida do versado na técnica.

[1083] Ao afetar as substituições conservativas, o aminoácido substituto deve ter o mesmo ou um grupo funcional semelhante na cadeia lateral do aminoácido original.

[1084] As tabelas de substituições conservativas que fornecem aminoácidos funcionalmente semelhantes são bem conhecidas na técnica. Orientações sobre quais alterações de aminoácidos são prováveis de serem fenotipicamente silenciosas também podem ser encontradas em Bowie *et al.*, 1990, *Science* 247: 1306 1310. Essas variantes modificadas de forma conservativa são adicionais e não excluem variantes polimórficas, homólogos interespecies, e alelos. As substituições conservativas típicas incluem, mas não estão limitadas a: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por exemplo, Creighton, *Proteins* (1984)). Os aminoácidos podem ser substituídos com base nas propriedades associadas às cadeias laterais, por exemplo, os aminoácidos com cadeias laterais polares podem ser substituídos, por exemplo, Serina (S) e Treonina (T); aminoácidos baseados na carga elétrica de cadeias laterais, por exemplo, Arginina (R) e Histidina (H); e aminoácidos que possuem cadeias laterais hidrofóbicas, por exemplo, Valina (V) e Leucina (L). Conforme indicado, as alterações são tipicamente de natureza secundária, como substituições conservativas de aminoácidos que não afetam significativamente o dobramento ou a atividade da proteína.

[1085] A frase “substituições não conservativas”, como usada aqui, refere-se à substituição do aminoácido como presente na sequência parental por outro aminoácido de ocorrência natural ou não natural, com diferentes propriedades eletroquímicas e/ou estéricas. Assim, a cadeia lateral do aminoácido substituto pode ser significativamente maior (ou menor) do que a cadeia lateral do aminoácido nativo sendo substituído e/ou pode ter grupos funcionais com propriedades eletrônicas significativamente diferentes do

aminoácido sendo substituído. Exemplos de substituições não conservativas deste tipo incluem a substituição de fenilalanina ou ciclohexilmetil glicina por alanina, isoleucina por glicina ou  $\text{-NH-CH}[(\text{CH}_2)_5\text{-COOH}]\text{-CO-}$  por ácido aspártico. As substituições não conservativas que caem no escopo da presente invenção são aquelas que ainda constituem um peptídeo com propriedades antibacterianas.

[1086] Os terminais N e C dos peptídeos da presente invenção podem ser protegidos por grupos funcionais. Os grupos funcionais adequados são descritos em Green e Wuts, *“Protecting Groups in Organic Synthesis”*, John Wiley e Sons, Capítulos 5 e 7, 1991, cujos ensinamentos são aqui incorporados por referência. Os grupos de proteção preferidos são aqueles que facilitam o transporte do composto a eles ligado para uma célula, por exemplo, reduzindo a hidrofiliabilidade e aumentando a lipofiliabilidade dos compostos.

[1087] De acordo com modalidades específicas, um ou mais dos aminoácidos podem ser modificados pela adição de um grupo funcional, por exemplo (conceitualmente vistas como “quimicamente modificado”). Por exemplo, os resíduos de aminoácidos laterais que aparecem na sequência nativa podem ser opcionalmente modificados, embora, conforme descrito abaixo, em alternativa, outras partes da proteína possam ser opcionalmente modificadas, além de ou no lugar dos resíduos de aminoácidos laterais. A modificação pode ser opcionalmente realizada durante a síntese da molécula se um processo de síntese química for seguido, por exemplo, adicionando um aminoácido modificado quimicamente. No entanto, a modificação química de um aminoácido quando ele já está presente na molécula (modificação *“in situ”*) também é possível. As modificações no peptídeo ou proteína podem ser introduzidas por síntese gênica, direcionada ao local (por exemplo, com base em PCR) ou mutagênese aleatória (por exemplo, EMS) por deleção de exonuclease, por modificação química ou por fusão de sequências polinucleotídicas que codificam um domínio heterólogo ou ligação proteína, por exemplo.

[1088] Como usado aqui, o termo “modificação química”, quando se refere a um peptídeo, refere-se a um peptídeo em que pelo menos um de seus resíduos de aminoácidos é modificado por processos naturais, como processamento ou outras modificações pós-tradução, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica. Tipos exemplares não limitativos de modificações incluem carboximetilação, acetilação, acilação, fosforilação, glicosilação, amidação, ADP-ribosilação, acilação graxa, adição de grupo farnesil, um grupo isofarnesil, um grupo de carboidrato, um grupo de ácido graxo, um ligante para conjugação, funcionalização, formação de âncora GPI, fixação covalente de um lipídeo ou derivado de lipídeo, metilação, miristilação, peguilação, prenilação, fosforilação, ubiquitinação ou qualquer processo semelhante e grupos de proteção/bloqueio conhecidos. As ligações de éter podem ser opcionalmente usadas para unir o hidroxil de serina ou treonina ao hidroxil de um açúcar. As ligações amida podem ser usadas opcionalmente para unir os grupos carboxil glutamato ou aspartato a um grupo amino em um açúcar (Garg e Jeanloz, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 43, Academic Press (1985); Kunz, *Ang. Chem. Int Ed. English* 26: 294-308 (1987)). As ligações acetal e cetel também podem ser formadas opcionalmente entre aminoácidos e carboidratos. Derivados de ácido graxo acil podem ser opcionalmente feitos, por exemplo, por acilação de um grupo amino livre (por exemplo, lisina) (Toth *et al.*, *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Rivier e Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)).

[1089] De acordo com modalidades específicas, as modificações incluem a adição de uma porção cicloalcano ao peptídeo, como descrito no Pedido PCT nº WO 2006/050262, aqui incorporado por referência como se totalmente estabelecido aqui. Essas porções são projetadas para uso com biomoléculas e podem, opcionalmente, ser usadas para transmitir várias propriedades às proteínas.

[1090] Além disso, opcionalmente, qualquer ponto do peptídeo pode ser modificado. Por exemplo, a PEGilação de uma porção de

glicosilação em uma proteína pode ser opcionalmente realizada, conforme descrito no Pedido PCT nº WO 2006/050247, aqui incorporado por referência como se totalmente estabelecido aqui. Um ou mais grupos de polietilenoglicol (PEG) podem ser opcionalmente adicionados à glicosilação ligada a O e/ou ligada a N. O grupo PEG pode ser opcionalmente ramificado ou linear. Opcionalmente, qualquer tipo de polímero solúvel em água pode ser ligado a um local de glicosilação em uma proteína através de um ligante de glicosil.

[1091] Por “proteína PEGuilada” entende-se uma proteína, ou um fragmento desta possuindo atividade biológica, tendo uma porção de polietilenoglicol (PEG) covalentemente ligada a um resíduo de aminoácido da proteína.

[1092] Por “polietilenoglicol” ou “PEG” entende-se um composto de polialquilenoglicol ou um derivado do mesmo, com ou sem agentes de acoplamento ou derivatização com acoplamento ou ativação de frações (por exemplo, com tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirano, ou preferencialmente com uma porção maleimida). Compostos tais como maleimido monometoxi PEG são exemplos ou compostos de PEG ativados da invenção. Outros compostos de polialquilenoglicol, tais como polipropilenoglicol, podem ser usados na presente invenção. Outros compostos de polialquilenoglicol apropriados incluem, mas não estão limitados a, polímeros carregados ou neutros dos seguintes tipos: dextrano, ácidos colomínicos ou outros polímeros à base de carboidratos, polímeros de aminoácidos e derivados de biotina.

[1093] De acordo com modalidades específicas, o peptídeo é modificado para ter um padrão de glicosilação alterado (isto é, alterado do padrão de glicosilação original ou nativo). Como usado aqui, “alterado” significa ter uma ou mais porções de carboidrato deletadas e/ou ter pelo menos um local de glicosilação adicionado à proteína original.

[1094] A glicosilação de proteínas é tipicamente ligada a N ou ligada a O. Ligado a N refere-se à ligação da porção de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas, asparagina-X-

serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento para ligação enzimática da fração de carboidrato à cadeia lateral da asparagina. Assim, a presença de qualquer uma dessas sequências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um local de glicosilação potencial. A glicosilação ligada a O refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um hidroxiaminoácido, mais comumente serina ou treonina, embora 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usados.

[1095] A adição de locais de glicosilação a um peptídeo é convenientemente realizada alterando a sequência de aminoácidos do peptídeo de modo a que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para locais de glicosilação ligados a N). A alteração também pode ser feita pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do peptídeo original (para locais de glicosilação ligada a O). A sequência de aminoácidos do peptídeo também pode ser alterada através da introdução de mudanças no nível do DNA.

[1096] Outro meio de aumentar o número de porções de carboidrato em peptídeos é por acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos aos resíduos de aminoácidos do peptídeo. Dependendo do modo de acoplamento usado, os açúcares podem ser ligados a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxila livres, (c) grupos sulfidril livres, tais como aqueles de cisteína, (d) grupos hidroxila livres, tais como aqueles de serina, treonina, ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos tais como os de fenilalanina, tirosina ou triptofano, ou (f) o grupo amida de glutamina. Esses métodos são descritos, por exemplo, em WO 87/05330 e em Aplin e Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 259-306 (1981).

[1097] A remoção de qualquer porção de carboidrato presente em um peptídeo pode ser realizada quimicamente, enzimaticamente ou introduzindo alterações no nível do DNA. A desglicosilação química requer a exposição do peptídeo ao ácido trifluorometanossulfônico ou a um composto

equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou de todos os açúcares, exceto o açúcar de ligação (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina), deixando a sequência de aminoácidos intacta.

[1098] A desglicosilação química é descrita por Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987); e Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118: 131 (1981). A clivagem enzimática de porções de carboidrato em peptídeos pode ser alcançada pelo uso de uma variedade de endo- e exoglicosidasas como descrito por Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138: 350 (1987).

[1099] De acordo com modalidades específicas, o peptídeo compreende uma etiqueta detectável. Como usado aqui, em uma modalidade, o termo “etiqueta detectável” refere-se a qualquer fração que pode ser detectada por um profissional experiente usando técnicas conhecidas. As etiquetas detectáveis podem ser sequências de peptídeos. Opcionalmente, a etiqueta detectável pode ser removível por agentes químicos ou por meios enzimáticos, como proteólise. Etiquetas detectáveis de algumas modalidades da presente invenção podem ser usadas para purificação do peptídeo. Por exemplo, o termo “etiqueta detectável” inclui etiqueta de proteína de ligação de quitina (CBP), etiqueta de proteína de ligação de maltose (MBP), etiqueta de glutathione-S-transferase (GST), etiqueta de poli (His), etiqueta de FLAG, etiquetas de epítipo, como V5-tag, c-myc-tag e HA-tag, e etiquetas de fluorescência, como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha (RFP), proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente azul (BFP), e proteína fluorescente ciano (CFP); bem como derivados dessas etiquetas, ou qualquer etiqueta conhecida na técnica. O termo “etiqueta detectável” também inclui o termo “marcador detectável”.

[1100] De acordo com modalidade específica, o peptídeo compreende uma etiqueta detectável ligada ao seu terminal N (por exemplo, poli(His)-tag).

[1101] De acordo com modalidade específica, o peptídeo compreende uma etiqueta detectável ligada ao seu terminal C (por exemplo, poli(His)-tag).

[1102] De acordo com modalidades específicas, o terminal N do peptídeo não compreende uma etiqueta detectável (por exemplo, poli(His)-tag).

[1103] De acordo com modalidades específicas, o terminal C do peptídeo não compreende uma etiqueta detectável (por exemplo, poli(His)-tag).

[1104] De acordo com modalidades específicas, o peptídeo é fundido a uma fração clivável. Assim, por exemplo, para facilitar a recuperação, a sequência de codificação expressa pode ser projetada para codificar o peptídeo de algumas modalidades da presente invenção e fração clivável fundida. Em uma modalidade, o peptídeo é projetado de modo que seja facilmente isolado por cromatografia de afinidade; por exemplo, por imobilização em uma coluna específica para a porção clivável. Em uma modalidade, um local de clivagem é projetado entre o peptídeo e a fração clivável e o peptídeo pode ser liberado da coluna cromatográfica por tratamento com uma enzima ou agente apropriado que cliva especificamente a proteína de fusão neste local [por exemplo, ver Booth *et al.*, *Immunol. Lett.* 19: 65-70 (1988); e Gardella *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 15854-15859 (1990)]. De acordo com modalidades específicas, o peptídeo é um peptídeo isolado.

[1105] Os peptídeos de algumas modalidades da invenção podem ser sintetizados e purificados por quaisquer técnicas que são conhecidas pelos versados na técnica de síntese de peptídeos, tais como, mas não se limitando a, técnicas de fase sólida e recombinantes.

[1106] Para a síntese de peptídeos em fase sólida, um resumo das muitas técnicas pode ser encontrado em J. M. Stewart e J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 e J. Meienhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 2, pág. 46, Academic Press (Nova Iorque), 1973. Para a síntese de solução clássica, ver G. Schroder e K. Lupke, *The Peptides*, vol. 1, Academic Press (Nova Iorque), 1965.

[1107] Em geral, esses métodos compreendem a adição sequencial de um ou mais aminoácidos ou aminoácidos adequadamente protegidos a uma cadeia de peptídeo em crescimento. Normalmente, o grupo amino ou carboxila do primeiro aminoácido é protegido por um grupo protetor adequado. O aminoácido protegido ou derivado pode então ser ligado a um suporte sólido inerte ou utilizado em solução adicionando o próximo aminoácido na sequência com o grupo complementar (amino ou carboxila) adequadamente protegido, sob condições adequadas para formar a ligação amida. O grupo de proteção é então removido deste resíduo de aminoácido recém-adicionado e o próximo aminoácido (adequadamente protegido) é então adicionado, e assim por diante. Depois de todos os aminoácidos desejados terem sido ligados na sequência apropriada, quaisquer grupos de proteção restantes (e qualquer suporte sólido) são removidos sequencialmente ou simultaneamente, para se obter o composto peptídico final. Por simples modificação deste procedimento geral, é possível adicionar mais de um aminoácido de cada vez a uma cadeia em crescimento, por exemplo, por acoplamento (sob condições que não racemizam os centros quirais) de um tripeptídeo protegido com um dipeptídeo adequadamente protegido para formar, após a desproteção, um pentapeptídeo e assim por diante. Uma descrição adicional da síntese de peptídeos é divulgada na Pat. US No. 6,472,505.

[1108] Um método preferido de preparação de compostos peptídicos de algumas modalidades da invenção envolve a síntese de peptídeos em fase sólida.

[1109] A síntese de peptídeos em grande escala é descrita por Andersson, *Biopolymers* 2000; 55 (3): 227-50.

[1110] De acordo com modalidades específicas, o peptídeo é sintetizado usando sistemas de expressão *in vitro*. Tais métodos de síntese *in vitro* são bem conhecidos na técnica e os componentes do sistema estão disponíveis comercialmente.

[1111] De acordo com modalidades específicas, o peptídeo

é produzido por tecnologia de DNA recombinante. Um peptídeo ou proteína “recombinante” refere-se a um peptídeo ou proteína produzida por técnicas de DNA recombinante; isto é, produzida a partir de células transformadas por um construto de DNA exógeno que codifica o peptídeo ou proteína desejada.

[1112] Assim, de acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer um dos polipeptídeos descritos acima e proteínas de fusão.

[1113] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108, 112, 114, 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1114] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1115] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108 ou 112, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1116] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106, 108 ou 112, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1117] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106 ou 108, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1118] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 57-72, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1119] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 146.

[1120] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108, 112, 114, 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1121] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1122] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108 ou 112, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1123] De acordo com modalidades específicas, o

polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106, 108 ou 112, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1124] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106 ou 108, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1125] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1126] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 146.

[1127] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108, 112, 114, 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1128] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 134, 136, 138, 140, 142, 144 e 148, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1129] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, 98, 102, 104, 106, 108 ou 112, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1130] De acordo com modalidades específicas, o

polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106, 108 ou 112, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1131] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 98, 102, 104, 106 ou 108, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1132] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 57-72, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1133] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 70-72.

[1134] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 70-72.

[1135] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 70-72.

[1136] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 146.

[1137] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer uma das sequências de aminoácidos PD1 descritas acima tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreende

qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2, ou tendo 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreendendo um segmento de aminoácido F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreendendo uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondente ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; ou qualquer uma das sequências de aminoácidos 4-1BBL descritas acima tendo 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tendo 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreendendo um segmento de aminoácido G198-E205 correspondendo a SEQ ID NO: 3, ou tendo 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreendendo um segmento de aminoácido A1-E23 correspondente à SEQ ID NO: 3; e opcionalmente compreendendo três repetições da sequência de aminoácidos 4-1BBL.

[1138] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer uma das sequências de aminoácidos PD1 descritas acima tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreende qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreendendo uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondente ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; ou qualquer uma das sequências de aminoácidos 4-1BBL descritas acima tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25.

[1139] De acordo com um aspecto adicional ou alternativo da presente invenção, é fornecido um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica qualquer uma das sequências de aminoácidos PD1 descritas acima tendo 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreende qualquer um dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondendo a SEQ ID NO: 2; ou qualquer uma das sequências de aminoácidos 4-1BBL descritas acima tendo 185-202 aminoácidos de comprimento e tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25.

[1140] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 ou 120, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1141] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1142] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 ou 120, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1143] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo

à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[1144] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 ou 120. De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[1145] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 116, 118 ou 120.

[1146] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[1147] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1148] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[1149] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[1150] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 74, 76, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94 ou 96.

[1151] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 32, 33, 34 ou 35, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1152] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 32, 33, 34 ou 35.

[1153] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 32, 33, 34 ou 35.

[1154] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 32, 33, 34 ou 35.

[1155] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 126, 128, 130 ou 132, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1156] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 39, 40, 41 ou 42, cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

[1157] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 126, 128, 130 ou 132.

[1158] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogo à sequência de ácido nucleico conforme estabelecido em SEQ ID NO: 39, 40, 41 ou 42.

[1159] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 126, 128, 130 ou 132.

[1160] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 39, 40, 41 ou 42.

[1161] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 126, 128, 130 ou 132.

[1162] De acordo com modalidades específicas, o polinucleotídeo consiste em SEQ ID NO: 39, 40, 41 ou 42.

[1163] Como usado aqui, o termo “polinucleotídeo” refere-se a uma sequência de ácido nucleico de fita simples ou dupla que é isolada e fornecida na forma de uma sequência de RNA, uma sequência polinucleotídica complementar (cDNA), uma sequência polinucleotídica genômica e/ou uma sequência polinucleotídica composta (por exemplo, uma combinação dos itens acima).

[1164] De acordo com modalidades específicas, qualquer um dos polinucleotídeos e sequências de ácido nucleico divulgados aqui podem compreender substituições de ácido nucleico conservativas. Polinucleotídeos modificados de forma conservativa referem-se aos ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucleico não codifica uma sequência de aminoácidos, a sequências essencialmente idênticas ou associadas (por exemplo, naturalmente contíguas). Devido à degenerescência do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codifica a maioria das proteínas. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU codificam o aminoácido alanina. Assim, em cada posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon

pode ser alterado para outro dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Essas variações de ácido nucleico são “variações silenciosas”, que são uma espécie de polinucleotídeos modificados de forma conservativa. De acordo com modalidades específicas, qualquer polinucleotídeo e sequência de ácido nucleico aqui descrito que codifica um polipeptídeo também descreve variações silenciosas do ácido nucleico. Um versado na técnica reconhecerá que, em certos contextos, cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que normalmente é o único códon para metionina, e TGG, que normalmente é o único códon para triptofano) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Consequentemente, variações silenciosas de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo estão implícitas em uma sequência descrita em relação ao produto de expressão.

[1165] Para expressar um polipeptídeo exógeno em células de mamífero, uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo é preferencialmente ligada em um construto de ácido nucleico adequado para a expressão de células de mamífero. Tal construto de ácido nucleico inclui uma sequência promotora para direcionar a transcrição da sequência polinucleotídica na célula de uma maneira constitutiva ou induzível.

[1166] Assim, de acordo com modalidades específicas, é fornecido um construto de ácido nucleico que compreende o polinucleotídeo e um elemento regulador para direcionar a expressão do referido polinucleotídeo em uma célula hospedeira.

[1167] De acordo com modalidades específicas, o elemento regulador é um elemento regulador heterólogo.

[1168] O construto de ácido nucleico (também referido aqui como um “vetor de expressão”) de algumas modalidades da invenção inclui sequências adicionais que tornam este vetor adequado para replicação e integração em procariontes, eucariontes ou, de preferência, ambos (por exemplo, vetores de transporte). Além disso, um vetor de clonagem típico também pode conter uma sequência de iniciação de transcrição e tradução,

terminador de transcrição e tradução e um sinal de poliadenilação. A título de exemplo, tais construtos incluirão tipicamente um LTR 5', um local de ligação de tRNA, um sinal de empacotamento, uma origem de síntese de DNA de segunda fita e um LTR 3' ou uma porção deste.

[1169] O construto de ácido nucleico de algumas modalidades da invenção inclui tipicamente uma sequência sinal para secreção do peptídeo de uma célula hospedeira na qual é colocado. De preferência, a sequência sinal para este propósito é uma sequência sinal de mamífero ou a sequência sinal das variantes polipeptídicas de algumas modalidades da invenção.

[1170] Os promotores eucarióticos contêm tipicamente dois tipos de sequências de reconhecimento, a caixa TATA e os elementos promotores a montante. Acredita-se que a caixa TATÁ, localizada 25-30 pares de bases a montante do local de iniciação da transcrição, esteja envolvida no direcionamento da RNA polimerase para iniciar a síntese de RNA. Os outros elementos promotores a montante determinam a taxa à qual a transcrição é iniciada.

[1171] De preferência, o promotor utilizado pelo construto de ácido nucleico de algumas modalidades da invenção é ativo na população de células específicas transformadas. Exemplos de promotores específicos do tipo de célula e/ou específicos do tecido incluem promotores tais como a albumina, que é específica do fígado [Pinkert *et al.*, (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277], promotores específicos de linfóides [Calame *et al.*, (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275]; em particular promotores de receptores de células T [Winoto *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8: 729-733] e imunoglobulinas; [Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740], promotores específicos de neurônios, tais como o promotor de neurofilamento [Byrne *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86: 5473-5477], promotores específicos do pâncreas [Edlunch *et al.* (1985) *Science* 230: 912-916] ou promotores específicos da glândula mamária, tais como o promotor do soro de leite (patente norte-americana nº 4,873,316 e publicação de pedido europeu nº 264,166).

[1172] Os elementos estimuladores podem estimular a transcrição em até 1.000 vezes a partir de promotores homólogos ou heterólogos ligados. Os potencializadores são ativos quando colocados a jusante ou a montante do local de iniciação da transcrição. Muitos elementos potenciadores derivados de vírus têm uma ampla gama de hospedeiros e são ativos em uma variedade de tecidos. Por exemplo, o intensificador de gene inicial SV40 é adequado para muitos tipos de células. Outras combinações potenciador/promotor que são adequadas para algumas modalidades da invenção incluem aquelas derivadas de vírus de polioma, citomegalovírus humano ou murino (CMV), a repetição de longo prazo de vários retrovírus, como vírus da leucemia murina, vírus murino ou sarcoma de Rous e HIV. Ver, *Enhancers and Eukaryotic Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983, que é aqui incorporado por referência.

[1173] Na construção do vetor de expressão, o promotor é preferencialmente posicionado aproximadamente à mesma distância do local de início da transcrição heteróloga como está do local de início da transcrição em seu cenário natural. Como é conhecido na técnica, no entanto, alguma variação nesta distância pode ser acomodada sem perda da função do promotor.

[1174] As sequências de poliadenilação também podem ser adicionadas ao vetor de expressão a fim de aumentar a eficiência da tradução do mRNA de PD1-4-1BBL, PD1 ou 4-1BBL. Dois elementos de sequência distintos são necessários para a poliadenilação precisa e eficiente: sequências ricas em GU ou U localizadas a jusante do local de poliadenilação e uma sequência altamente conservada de seis nucleotídeos, AAUAAA, localizada 11-30 nucleotídeos a montante. Os sinais de terminação e poliadenilação que são adequados para algumas modalidades da invenção incluem aqueles derivados de SV40.

[1175] Além dos elementos já descritos, o vetor de expressão de algumas modalidades da invenção pode conter tipicamente outros elementos especializados destinados a aumentar o nível de expressão de ácidos

nucleicos clonados ou a facilitar a identificação de células que carregam o DNA recombinante. Por exemplo, vários vírus animais contêm sequências de DNA que promovem a replicação cromossômica extra do genoma viral em tipos de células permissivas. Os plasmídeos portadores desses replicons virais são replicados epissomaticamente, desde que os fatores apropriados sejam fornecidos pelos genes transportados no plasmídeo ou com o genoma da célula hospedeira.

[1176] O vetor pode ou não incluir um replicon eucariótico. Se um replicon eucariótico estiver presente, então o vetor é amplificável em células eucarióticas usando o marcador selecionável apropriado. Se o vetor não compreende um replicon eucariótico, nenhuma amplificação epissomal é possível. Em vez disso, o DNA recombinante se integra ao genoma da célula modificada, onde o promotor direciona a expressão do ácido nucleico desejado.

[1177] O vetor de expressão de algumas modalidades da invenção pode incluir ainda sequências polinucleotídicas adicionais que permitem, por exemplo, a tradução de várias proteínas de um único mRNA, como um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES) e sequências para integração genômica do polipeptídeo promotor quimérico.

[1178] Será apreciado que os elementos individuais compreendidos no vetor de expressão podem ser dispostos em uma variedade de configurações. Por exemplo, elementos potenciadores, promotores e semelhantes, e mesmo a(s) sequência(s) polinucleotídica(s) que codifica(m) PD1-4-1BBL, um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 ou um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL podem ser arranjados em uma configuração “cabeça a cauda”, pode estar presente como um complemento invertido, ou em uma configuração complementar, como uma fita antiparalela. Embora essa variedade de configuração seja mais provável de ocorrer com elementos não codificantes do vetor de expressão, configurações alternativas da sequência de codificação dentro do vetor de expressão também são previstas.

[1179] Exemplos de vetores de expressão de mamíferos incluem, mas não estão limitados a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que estão disponíveis na Invitrogen, pCI que está disponível na Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV e pBK-CMV que estão disponíveis na Strategene, pTRES que está disponível na Clontech e seus derivados.

[1180] Os vetores de expressão contendo elementos reguladores de vírus eucarióticos, como retrovírus, também podem ser usados. Os vetores de SV40 incluem pSVT7 e pMT2. Os vetores derivados do vírus do papiloma bovino incluem pBV-1MTHA, e os vetores derivados do vírus Epstein Bar incluem pHEBO e p2O5. Outros vetores exemplares incluem pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE e qualquer outro vetor que permite a expressão de proteínas sob a direção do promotor inicial SV-40, promotor posterior SV-40, promotor de metalotioneína, promotor do vírus do tumor mamário murino, promotor do vírus do sarcoma de Rous, promotor da poliedrina ou outros promotores que se mostraram eficazes para a expressão em células eucarióticas.

[1181] Conforme descrito acima, os vírus são agentes infecciosos muito especializados que evoluíram, em muitos casos, para iludir os mecanismos de defesa do hospedeiro. Normalmente, os vírus infectam e se propagam em tipos específicos de células. A especificidade de direcionamento de vetores virais utiliza sua especificidade natural para direcionar especificamente tipos de células predeterminadas e, assim, introduzir um gene recombinante na célula infectada. Assim, o tipo de vetor usado por algumas modalidades da invenção dependerá do tipo de célula transformada. A capacidade de selecionar vetores adequados de acordo com o tipo de célula transformada está bem dentro das capacidades do versado na técnica e, como tal, nenhuma descrição geral de consideração de seleção é fornecida aqui. Por exemplo, as células da medula óssea podem ser direcionadas usando o vírus da

leucemia de células T humanas tipo I (HTLV-I) e as células renais podem ser direcionadas usando o promotor heterólogo presente no baculovírus *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), conforme descrito em Liang CY *et al.*, 2004 (Arch Virol. 149: 51-60).

[1182] Os vetores virais recombinantes são úteis para a expressão *in vivo* de PD1-4-1BBL, PD1 ou 4-1BBL, uma vez que oferecem vantagens, como infecção lateral e especificidade de direcionamento. A infecção lateral é inerente ao ciclo de vida de, por exemplo, retrovírus e é o processo pelo qual uma única célula infectada produz muitos vírions descendentes que brotam e infectam células vizinhas. O resultado é que uma grande área é rapidamente infectada, a maioria da qual não foi inicialmente infectada pelas partículas virais originais. Isso contrasta com o tipo de infecção vertical, em que o agente infeccioso se espalha apenas pela progênie filha. Também podem ser produzidos vetores virais incapazes de se espalhar lateralmente. Esta característica pode ser útil se o propósito desejado for introduzir um gene especificado em apenas um número localizado de células-alvo.

[1183] Vários métodos podem ser usados para introduzir o vetor de expressão de algumas modalidades da invenção nas células. Tais métodos são geralmente descritos em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nova York (1989, 1992), em Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley e Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang *et al.*, *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega *et al.*, *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) e Gilboa *et al.* [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluem, por exemplo, transfecção estável ou transitória, lipofecção, eletroporação e infecção com vetores virais recombinantes. Além disso, consulte as patentes norte-americanas nºs 5,464,764 e 5,487,992 para métodos de seleção positivo-negativo.

[1184] A introdução de ácidos nucleicos por infecção viral

oferece várias vantagens sobre outros métodos, como lipofecção e eletroporação, uma vez que uma maior eficiência de transfecção pode ser obtida devido à natureza infecciosa dos vírus.

[1185] As técnicas de transferência de ácido nucleico *in vivo* atualmente preferidas incluem a transfecção com construtos virais ou não virais, tais como adenovírus, lentivírus, vírus Herpes simplex I ou vírus adeno-associado (AAV) e sistemas baseados em lipídeos. Lipídeos úteis para a transferência do gene mediada por lipídeos são, por exemplo, DOTMA, DOPE e DC-Chol [Tonkinson *et al.*, *Cancer Investigation*, 14 (1): 54-65 (1996)]. Os construtos mais preferidos para uso em terapia gênica são vírus, mais preferencialmente adenovírus, AAV, lentivírus ou retrovírus. Um construto viral, como um construto retroviral, inclui pelo menos um promotor/potencializador transcricional ou elemento(s) de definição de locus, ou outros elementos que controlam a expressão gênica por outros meios, como splicing alternativo, exportação de RNA nuclear ou modificação pós-tradução de mensageiro. Tais construtos de vetor também incluem um sinal de empacotamento, repetições terminais longas (LTRs) ou porções das mesmas e locais de ligação do iniciador de fita positiva e negativa apropriados para o vírus usado, a menos que já esteja presente no construto viral. Além disso, tal construto inclui tipicamente uma sequência sinal para secreção do peptídeo de uma célula hospedeira na qual é colocado. De preferência, a sequência sinal para este propósito é uma sequência sinal de mamífero ou a sequência sinal das variantes polipeptídicas de algumas modalidades da invenção. Opcionalmente, o construto também pode incluir um sinal que direciona a poliadenilação, bem como um ou mais locais de restrição e uma sequência de terminação da tradução. A título de exemplo, tais construtos incluirão tipicamente um LTR 5', um local de ligação de tRNA, um sinal de empacotamento, uma origem de síntese de DNA de segunda fita e um LTR 3' ou uma porção deste. Podem ser usados outros vetores que não são virais, como lipídeos catiônicos, polilisina e dendrímeros.

[1186] Conforme mencionado, além de conter os

elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência de codificação inserida, o construto de expressão de algumas modalidades da invenção também pode incluir sequências projetadas para aumentar a estabilidade, produção, purificação, rendimento ou toxicidade do peptídeo expresso. Por exemplo, a expressão de uma proteína de fusão ou uma proteína de fusão clivável compreendendo a proteína PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo de algumas modalidades da invenção e uma proteína heteróloga pode ser projetada. Essa proteína de fusão pode ser concebida de modo a que a proteína de fusão possa ser facilmente isolada por cromatografia de afinidade; por exemplo, por imobilização em uma coluna específica para a proteína heteróloga. Quando um local de clivagem é projetado entre a proteína PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo de algumas modalidades da presente invenção e a proteína heteróloga, a proteína PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo pode ser liberado da coluna cromatográfica por tratamento com uma enzima ou agente apropriado que interrompe o local de clivagem [por exemplo, ver Booth *et al.* (1988) *Immunol. Lett.* 19: 65-70; e Gardella *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 15854-15859].

[1187] A presente invenção também contempla células compreendendo a composição aqui descrita.

[1188] Assim, de acordo com modalidades específicas, é fornecida uma célula hospedeira que compreende a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos PD1 e/ou o polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgados, o polinucleotídeo que codifica os mesmos ou o construto de ácido nucleico que codifica os mesmos.

[1189] Como mencionado acima, uma variedade de células procarióticas ou eucarióticas podem ser usadas como sistemas de expressão de hospedeiro para expressar os polipeptídeos de algumas modalidades da invenção. Estes incluem, mas não estão limitados a, microrganismos, tais como bactérias transformadas com um DNA de bacteriófago recombinante, DNA de

plasmídeo ou vetor de expressão de DNA de cosmídeo contendo a sequência de codificação; levedura transformada com vetores de expressão de levedura recombinantes contendo a sequência de codificação; sistemas de células vegetais infectados com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeo recombinante, tal como plasmídeo Ti, contendo a sequência de codificação. Os sistemas de expressão de mamíferos também podem ser usados para expressar os polipeptídeos de algumas modalidades da invenção.

[1190] Exemplos de construtos bacterianos incluem a série pET de vetores de expressão de *E. coli* [Studier *et al.* (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89).

[1191] Exemplos de células eucarióticas que podem ser utilizadas juntamente com os ensinamentos da invenção incluem, mas não estão limitados a, células de mamíferos, células de fungos, células de levedura, células de inseto, células de algas ou células vegetais.

[1192] Em levedura, uma série de vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis podem ser usados, como divulgado na Patente norte-americana Nº 5,932,447. Alternativamente, podem ser usados vetores que promovem a integração de sequências de DNA estranho no cromossomo de levedura.

[1193] Nos casos em que são usados vetores de expressão em plantas, a expressão da sequência de codificação pode ser conduzida por uma série de promotores. Por exemplo, promotores virais, tais como os promotores 35S RNA e 19S RNA de CaMV [Brisson *et al.* (1984) *Nature* 310: 511-514], ou o promotor da proteína de revestimento para TMV [Takamatsu *et al.* (1987) *EMBO J.* 6: 307-311]. Alternativamente, promotores de plantas, como a pequena subunidade de RUBISCO [Coruzzi *et al.* (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680 e Brogli *et al.*, (1984) *Science* 224: 838-843] ou promotores de choque térmico, por exemplo, hsp17.5-E ou hsp17.3-B de soja [Gurley *et al.*

(1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565] pode ser usado. Estes construtos podem ser introduzidos em células vegetais usando plasmídeo Ti, plasmídeo Ri, vetores virais de plantas, transformação direta de DNA, microinjeção, eletroporação e outras técnicas bem conhecidas do versado na técnica. Ver, por exemplo, Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463.

[1194] Outros sistemas de expressão, tais como insetos e sistemas de células hospedeiras de mamíferos, que são bem conhecidos na técnica, também podem ser usados por algumas modalidades da invenção.

[1195] De acordo com modalidades específicas, a célula é uma célula de mamífero.

[1196] De acordo com a modalidade específica, a célula é uma célula humana.

[1197] De acordo com uma modalidade específica, a célula é uma linha celular.

[1198] De acordo com outra modalidade específica, a célula é uma célula primária.

[1199] A célula pode ser derivada de um tecido adequado, incluindo, mas não se limitando, a sangue, músculo, nervo, cérebro, coração, pulmão, fígado, pâncreas, baço, timo, esôfago, estômago, intestino, rim, testículo, ovário, cabelo, pele, osso, mama, útero, bexiga, medula espinhal ou vários tipos de fluidos corporais. As células podem ser derivadas de qualquer estágio de desenvolvimento, incluindo os estágios embrionário, fetal e adulto, bem como a origem do desenvolvimento, isto é, origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica.

[1200] Exemplos não limitativos de células de mamífero incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS, por exemplo, COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionário humano (células HEK293 ou HEK293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão,

Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 1977); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de rato (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 1980); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); Células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renais caninas, NIH3T3, Jurkat (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); Células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sei.*, 383: 44-68 1982); Células MRC 5; Células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2), PER.C6, K562 e células de ovário de hamster chinês (CHO).

[1201] De acordo com algumas modalidades da invenção, a célula de mamífero é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO), HEK293, PER.C6, HT1080, NS0, Sp2/0, BHK, Namalwa, COS, HeLa e Vero.

[1202] De acordo com algumas modalidades da invenção, a célula hospedeira compreende uma célula de Ovário de Hamster Chinês (CHO), PER.C6 ou uma célula 293 (por exemplo, Expi293F).

[1203] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para produzir de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL, um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1 ou um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, o método compreendendo expressar em uma célula hospedeira o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico aqui descrito.

[1204] De acordo com modalidades específicas, os métodos compreendem isolar a proteína de fusão ou o polipeptídeo.

[1205] De acordo com modalidades específicas, a recuperação do polipeptídeo recombinante é realizada após um tempo apropriado em cultura. A frase “recuperar o polipeptídeo recombinante” refere-

se à coleta de todo o meio de fermentação contendo o polipeptídeo e não precisa implicar em etapas adicionais de separação ou purificação. Não obstante o acima, os polipeptídeos de algumas modalidades da invenção podem ser purificados usando uma variedade de técnicas de purificação de proteína padrão, tais como, mas não se limitando a, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, filtração, eletroforese, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de fase reversa, cromatografia de concanavalina A, cromatografia de modo de mistura, cromatografia de afinidade de metal, cromatografia de afinidade de Lectinas, cromatofocagem e solubilização diferencial.

[1206] De acordo com modalidades específicas, após síntese e purificação, a eficácia terapêutica do peptídeo pode ser avaliada *in vivo* ou *in vitro*. Tais métodos são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, viabilidade celular, sobrevivência de camundongos transgênicos e expressão de marcadores de ativação.

[1207] As composições (por exemplo, a proteína de fusão PD1-4-1BBL, o polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos PD1 ou o polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos 4-1BBL aqui divulgados, o polinucleotídeo que codifica o mesmo, construto de ácido nucleico que codifica o mesmo e/ou células) de algumas modalidades da invenção podem ser administradas a um organismo *per se*, ou em uma composição farmacêutica onde é misturada com carreadores ou excipientes adequados.

[1208] Assim, a presente invenção, em algumas modalidades, apresenta uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição aqui divulgada.

[1209] Aqui, o termo “ingrediente ativo” refere-se à composição (por exemplo, proteína de fusão PD1-4-1BBL, polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos PD1, polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, polinucleotídeo, construto de ácido nucleico e/ou células aqui descritos) responsável pelo efeito biológico.

[1210] Aqui, o termo “excipiente” refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar ainda mais a administração de um ingrediente ativo. Exemplos, sem limitação, de excipientes incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais e polietilenoglicóis.

[1211] Daqui em diante, as frases “carreador fisiologicamente aceitável” e “carreador farmacêuticamente aceitável” que podem ser usados de forma intercambiável referem-se a um carreador ou um diluente que não causa irritação significativa a um organismo e não anula a atividade biológica e as propriedades do composto administrado. Um adjuvante está incluído nessas frases.

[1212] Como usado aqui, “carreador farmacêuticamente aceitável” inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento da absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. De preferência, o carreador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, um polipeptídeo, um polinucleotídeo, um construto de ácido nucleico e/ou célula como aqui descrito, pode incluir um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis. Um “sal farmacêuticamente aceitável” refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto original e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (ver, por exemplo, Berge, SM, *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e semelhantes, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos, como ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanóicos substituídos com fenil, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos

sulfônicos alifáticos e aromáticos e semelhantes. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino-terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e semelhantes, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e semelhantes.

[1213] Uma composição farmacêutica de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção também pode incluir um antioxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes. Uma composição farmacêutica de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção também pode incluir aditivos, tais como detergentes e agentes solubilizantes (por exemplo, TWEEN 20 (polissorbato-20), TWEEN 80 (polissorbato-80)) e conservantes (por exemplo, Thimersol, álcool benzílico) e substâncias de volume (por exemplo, lactose, manitol).

[1214] Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção incluem água, solução salina tamponada de vários conteúdos de tampão (por exemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH e força iônica, etanol, polióis (como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e semelhantes) e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, como azeite e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila.

[1215] A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões, e pelo uso de surfactantes.

[1216] Estas composições também podem conter adjuvantes, tais como conservantes, agentes molhantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada por procedimentos de esterilização, supra, e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e semelhantes. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e semelhantes nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

[1217] Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, o uso deste nas composições farmacêuticas de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção é contemplado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

[1218] As composições terapêuticas normalmente devem ser estéreis e estáveis nas condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de medicamento. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol ou

cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por microfiltração de esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e crio-dissecação (liofilização) que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[1219] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por microfiltração de esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e crio-dissecação (liofilização) que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[1220] A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única irá variar dependendo do indivíduo a ser tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única será

geralmente a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento do ingrediente ativo, de preferência de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, mais preferencialmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento do ingrediente ativo em combinação com um carreador farmacologicamente aceitável.

[1221] Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária conforme aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção são ditadas por e diretamente dependentes de (a) as características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de composição de um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

[1222] As técnicas para formulação e administração de medicamentos podem ser encontradas em "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edição, que é aqui incorporado por referência.

[1223] As composições farmacêuticas de algumas modalidades da invenção podem ser fabricadas por processos bem conhecidos

na técnica, por exemplo, por meio de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, fabricação de drágeas, levigação, emulsificação, encapsulação, aprisionamento ou liofilização.

[1224] Uma composição da presente invenção pode ser administrada por meio de uma ou mais vias de administração usando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo versado na técnica, a via e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados. As vias de administração preferidas para agentes terapêuticos de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção incluem administração intravascular (por exemplo, injeção ou infusão), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal, oral, enteral, retal, pulmonar (por exemplo, inalação), nasal, tópico (incluindo transdérmico, bucal e sublingual), intravesical, intravítreo, intraperitoneal, vaginal, entrega cerebral (por exemplo, intracerebroventricular, intracerebral e difusão aprimorada por convecção), entrega CNS (por exemplo, intratecal, perispinal e intra-espinhal) ou parenteral (incluindo subcutâneo, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso (IV) e intradérmico), transdérmico (passivamente ou usando iontoforese ou eletroporação), transmucosal (por exemplo, administração sublingual, nasal, vaginal, retal ou sublingual), administração ou administração através de um implante, ou outras vias parenterais de administração, por exemplo, por injeção ou infusão, ou outras vias de entrega e/ou formas de administração conhecidas na técnica. A frase “administração parenteral”, como usada aqui, significa modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e inclui, sem limitação, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, injeção subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide, intraespinhal, epidural e intraesternal e infusão ou usando inserções bioerodíveis, e podem ser formuladas em formas de dosagem apropriadas para cada via de administração. Em uma modalidade específica, uma proteína, um agente terapêutico ou uma composição farmacêutica de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção pode ser administrada por via intraperitoneal ou intravenosa.

[1225] De acordo com modalidades específicas, as composições aqui divulgadas são administradas em uma solução aquosa, por injeção parenteral. A formulação também pode estar na forma de uma suspensão ou emulsão. Em geral, as composições farmacêuticas para injeção parenteral são fornecidas incluindo quantidades eficazes das composições aqui descritas e, opcionalmente, incluem diluentes, conservantes, solubilizantes, emulsificantes, adjuvantes e/ou carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Essas composições incluem opcionalmente um ou mais dos seguintes: diluentes, água estéril, solução salina tamponada com vários conteúdos de tampão (por exemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH e força iônica; e aditivos, como detergentes e agentes solubilizantes (por exemplo, TWEEN 20 (polissorbato-20), TWEEN 80 (polissorbato-80)), antioxidantes (por exemplo, antioxidantes solúveis em água, como ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio; antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol; e agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico) e conservantes (por exemplo, Thimersol, álcool benzílico) e substâncias de volume (por exemplo, lactose, manitol). Exemplos de solventes ou veículos não aquosos são etanol, propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, como azeite e óleo de milho, gelatina e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. As formulações podem ser secas por congelamento (liofilizadas) ou secas a vácuo e redissolvidas/ressuspensas imediatamente antes do uso. A formulação pode ser esterilizada, por exemplo, por filtração através de um filtro de retenção de bactérias, por incorporação de agentes esterilizantes nas composições, por irradiação das composições ou por aquecimento das composições.

[1226] Várias composições (por exemplo, polipeptídeos) aqui divulgadas podem ser aplicadas topicamente. A administração tópica não funciona bem para a maioria das formulações de peptídeos, embora possa ser eficaz especialmente se aplicada aos pulmões, mucosa nasal, oral (sublingual, bucal), vaginal ou retal.

[1227] As composições da presente invenção podem ser distribuídas aos pulmões durante a inalação e atravessar o revestimento epitelial do pulmão para a corrente sanguínea quando distribuídas como um aerossol ou partículas secas por pulverização com um diâmetro aerodinâmico inferior a cerca de 5 microns. Uma ampla gama de dispositivos mecânicos projetados para distribuição pulmonar de produtos terapêuticos pode ser usada, incluindo, mas não se limitando a, nebulizadores, inaladores de dose medida e inaladores de pó, todos os quais são familiares para aqueles versados na técnica. Alguns exemplos específicos de dispositivos comercialmente disponíveis são o nebulizador Ultravent (Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); o nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, Colorado); o inalador de dose medida Ventolin (Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); e o inalador de pó Spinhaler (Fisons Corp., Bedford, Mass.). Nektar, Alkermes e Mannkind têm preparações em pó de insulina inalável aprovadas ou em ensaios clínicos onde a tecnologia pode ser aplicada às formulações aqui descritas.

[1228] As formulações para administração à mucosa serão tipicamente partículas de medicamento secas por pulverização, que podem ser incorporadas em um comprimido, gel, cápsula, suspensão ou emulsão. Excipientes farmacêuticos padrão estão disponíveis em qualquer formulador. As formulações orais podem ser na forma de goma de mascar, tiras de gel, comprimidos ou pastilhas.

[1229] As formulações transdérmicas também podem ser preparadas. Normalmente, são pomadas, loções, pulverizadores ou adesivos, que podem ser preparados usando a tecnologia padrão. As formulações transdérmicas exigirão a inclusão de intensificadores de penetração. Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma

variedade de fatores farmacocinéticos, incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular a ser empregado, a duração do tratamento, outros medicamentos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente a ser tratado e fatores semelhantes bem conhecidos nas artes médicas.

[1230] De acordo com modalidades específicas, as composições aqui divulgadas são administradas a um indivíduo em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Como usado aqui, o termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma dosagem suficiente para tratar, inibir ou aliviar um ou mais sintomas do distúrbio a ser tratado ou de outra forma fornecer um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. A dosagem precisa irá variar de acordo com uma variedade de fatores, tais como variáveis dependentes do indivíduo (por exemplo, idade, saúde do sistema imunológico, etc.), a doença e o tratamento que está sendo realizado. Para as composições polipeptídicas divulgadas aqui, os construtos de polinucleotídeos e ácidos nucleicos que codificam os mesmos e as células descritas aqui, conforme estudos adicionais são conduzidos, as informações emergirão sobre os níveis de dosagem apropriados para o tratamento de várias condições em vários pacientes, e o trabalhador qualificado comum, considerando o contexto terapêutico, idade e saúde geral do receptor, será capaz de determinar a dosagem adequada. A dosagem selecionada depende do efeito terapêutico desejado, da via de administração e da duração do tratamento desejado. Para composições polipeptídicas, geralmente níveis de dosagem de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal diariamente são administrados a mamíferos e mais geralmente de 0,001 a 20 mg/kg. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro do intervalo de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar envolve a administração 5 vezes por semana, 4 vezes por semana, 3 vezes por semana,

2 vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez a cada três a 6 meses. Geralmente, para injeção intravenosa ou infusão, a dosagem pode ser mais baixa. Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta desejada ideal (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária conforme aqui utilizada refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção são ditadas por e diretamente dependentes de (a) as características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de composição de um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

[1231] Opcionalmente, a formulação de polipeptídeo pode ser administrada em uma quantidade entre 0,0001 a 100 mg/kg de peso do paciente/dia, de preferência entre 0,001 a 20,0 mg/kg/dia, de acordo com qualquer regime de tempo adequado. Uma composição terapêutica de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção pode ser administrada, por exemplo, três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, três vezes por semana, duas vezes por semana ou uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas ou 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas. Além disso, a composição pode ser administrada durante um curto ou longo período de tempo (por exemplo, 1 semana, 1 mês, 1 ano, 5 anos).

[1232] Alternativamente, as composições aqui divulgadas podem ser administradas como uma formulação de liberação sustentada, caso em que uma administração menos frequente é necessária. A dosagem e a frequência variam dependendo da meia-vida do agente terapêutico no paciente. Em geral, os anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguidos por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A meia-vida para proteínas de fusão pode variar amplamente. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente infrequentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam recebendo tratamento pelo resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, às vezes é necessária uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada, e de preferência até que o paciente apresente melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, o paciente pode receber um regime profilático.

[1233] Em certas modalidades, o polipeptídeo, polinucleotídeo, construto de ácido nucleico ou composições de células são administrados localmente, por exemplo, por injeção diretamente em um local a ser tratado. Normalmente, a injeção causa uma concentração localizada aumentada da composição que é maior do que aquela que pode ser alcançada por administração sistêmica. As composições polipeptídicas podem ser combinadas com uma matriz conforme descrito acima para auxiliar na criação de uma concentração localizada aumentada das composições polipeptídicas, reduzindo a difusão passiva dos polipeptídeos para fora do local a ser tratado.

[1234] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade opcional, uma composição farmacêutica de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica de

agulhas, tais como os dispositivos divulgados nas patentes norte-americanas nºs 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; ou 4,596,556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: patente norte-americana nº 4,487,603, que divulga uma bomba de microinfusão implantável para dispensar medicação a uma taxa controlada; patente norte-americana nº 4,486,194, que divulga um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; patente norte-americana nº 4,447,233, que divulga uma bomba de infusão de medicamento para distribuir medicamento a uma taxa de infusão precisa; patente norte-americana nº 4,447,224, que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para administração contínua de medicamentos; patente norte-americana nº 4,439,196, que divulga um sistema de distribuição osmótica de medicamentos com compartimentos de múltiplas câmaras; e patente norte-americana nº 4,475,196, que divulga um sistema de distribuição osmótica de medicamentos. Estas patentes são aqui incorporadas por referência. Muitos outros implantes, sistemas de entrega e módulos são conhecidos dos versados na técnica.

[1235] Os compostos ativos podem ser preparados com carreadores que irão proteger o composto contra a liberação rápida, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos dos versados na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

[1236] Dispositivos poliméricos de liberação controlada podem ser feitos para liberação sistemática de longo prazo após implantação de um dispositivo polimérico (haste, cilindro, filme, disco) ou injeção

(micropartículas). A matriz pode estar na forma de micropartículas, tais como microesferas, onde os peptídeos são dispersos dentro de uma matriz polimérica sólida ou microcápsulas, onde o núcleo é de um material diferente do invólucro polimérico, e o peptídeo está disperso ou suspenso no núcleo, que pode ser de natureza líquida ou sólida. A menos que especificamente definido aqui, micropartículas, microesferas e microcápsulas são usadas indistintamente. Alternativamente, o polímero pode ser fundido como uma placa fina ou película, variando de nanômetros a quatro centímetros, um pó produzido por moagem ou outras técnicas padrão, ou mesmo um gel, como um hidrogel.

[1237] Matrizes não biodegradáveis ou biodegradáveis podem ser utilizadas para a entrega dos agentes ativos aqui divulgados, embora matrizes biodegradáveis sejam preferidas. Estas podem ser polímeros naturais ou sintéticos, embora os polímeros sintéticos sejam preferidos devido à melhor caracterização dos perfis de degradação e liberação. O polímero é selecionado com base no período durante o qual a liberação é desejada. Em alguns casos, a liberação linear pode ser mais útil, embora em outros uma liberação por pulso ou “liberação em massa” possa fornecer resultados mais eficazes. O polímero pode estar na forma de um hidrogel (tipicamente absorvendo até cerca de 90% em peso de água) e pode, opcionalmente, ser reticulado com íons ou polímeros multivalentes.

[1238] As matrizes podem ser formadas por evaporação de solvente, secagem por pulverização, extração com solvente e outros métodos conhecidos dos versados na técnica. As microesferas bioerodíveis podem ser preparadas usando qualquer um dos métodos desenvolvidos para fazer microesferas para distribuição de medicamentos, por exemplo, como descrito por Mathiowitz e Langer, J. *Controlled Release*, 5: 13-22 (1987); Mathiowitz, *et al.*, *Reactive Polymers*, 6: 275-283 (1987); e Mathiowitz, *et al.*, *J. Appl Polymer Sci*, 35: 755-774 (1988).

[1239] Os dispositivos podem ser formulados para liberação local para tratar a área de implantação ou injeção - que normalmente fornecerá uma dosagem que é muito menor do que a dosagem para o tratamento

de um corpo inteiro - ou administração sistêmica. Estes podem ser implantados ou injetados por via subcutânea, no músculo, gordura, ou engolidos.

[1240] Em certas modalidades, para garantir que os compostos terapêuticos de acordo com pelo menos algumas modalidades da presente invenção cruzem o BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação de lipossomas, ver, por exemplo, patente norte-americana nºs 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são transportadas seletivamente para células ou órgãos específicos, aumentando assim a distribuição direcionada do medicamento (ver, por exemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Porções de direcionamento exemplares incluem folato ou biotina (ver, por exemplo, patente norte-americana nº 5,416,016 de Low *et al.*); manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticorpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína A do surfactante (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); ver também K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

[1241] As composições de algumas modalidades da invenção podem, se desejado, ser apresentadas em um pacote ou dispositivo dispensador, como um kit aprovado pela FDA, que pode conter uma ou mais formas de dosagem unitária contendo o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, compreender uma folha de metal ou de plástico, tal como uma embalagem blister. A embalagem ou dispositivo dispensador pode ser acompanhado por instruções de administração. A embalagem ou dispensador também pode ser acomodado por um aviso associado ao recipiente em uma forma prescrita por uma agência governamental que regulamenta a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência da forma das composições ou administração humana ou veterinária. Tal

aviso, por exemplo, pode ser de rotulagem aprovada pela Food and Drug Administration dos EUA para medicamentos prescritos ou de uma bula de produto aprovada. As composições compreendendo uma preparação da invenção formulada em um carreador farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um recipiente apropriado e rotuladas para o tratamento de uma condição indicada, como é mais detalhado acima.

[1242] Como usado aqui, o termo “cerca de” refere-se a  $\pm 10\%$ .

[1243] Os termos “compreende”, “compreendendo”, “inclui”, “incluindo”, “tendo” e seus conjugados significam “incluindo, mas não se limitando a”.

[1244] O termo “consistindo em” significa “incluindo e limitado a”.

[1245] O termo “consistindo essencialmente em” significa que a composição, método ou estrutura pode incluir ingredientes, etapas e/ou partes adicionais, mas apenas se os ingredientes, etapas e/ou partes adicionais não alteram materialmente as características básicas e novas da composição, método ou estrutura reivindicados.

[1246] Como usada aqui, a forma singular “um”, “uma” e “o/a” incluem referências no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Por exemplo, o termo “um composto” ou “pelo menos um composto” pode incluir uma pluralidade de compostos, incluindo misturas dos mesmos.

[1247] Ao longo deste pedido, várias modalidades desta invenção podem ser apresentadas em um formato de intervalo. Deve ser entendido que a descrição em formato de intervalo é meramente por conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo da invenção. Por conseguinte, a descrição de um intervalo deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todos os subintervalos possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro desse intervalo. Por exemplo, a descrição de uma faixa, como de 1 a 6, deve ser considerada como tendo as subfaixas especificamente divulgadas, como de 1 a

3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro desse intervalo, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Isso se aplica independentemente da amplitude do intervalo.

[1248] Sempre que um intervalo numérico é indicado aqui, pretende-se incluir qualquer número citado (fracionário ou integral) dentro do intervalo indicado. As frases “variando/varia entre” um primeiro número indicado e um segundo número indicado e “variando/varia de” um primeiro número indicado “até” um segundo número indicado são usadas aqui indistintamente e se destinam a incluir o primeiro e o segundo números indicados e todos os números fracionários e inteiros entre eles.

[1249] Como usado aqui, o termo “método” refere-se a maneiras, meios, técnicas e procedimentos para realizar uma determinada tarefa, incluindo, mas não se limitando a, essas maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos ou prontamente desenvolvidos a partir de maneiras, meios, técnicas e procedimentos por profissionais das artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas.

[1250] Quando é feita referência a listagens de sequências particulares, tal referência deve ser entendida como abrangendo também sequências que correspondem substancialmente à sua sequência complementar, incluindo pequenas variações de sequência, resultantes de, por exemplo, erros de sequenciamento, erros de clonagem ou outras alterações que resultam em substituição de base, deleção de base ou adição de base, desde que a frequência de tais variações seja inferior a 1 em 50 nucleotídeos, alternativamente, inferior a 1 em 100 nucleotídeos, alternativamente, inferior a 1 em 200 nucleotídeos, alternativamente, inferior a 1 em 500 nucleotídeos, alternativamente, inferior a 1 em 1.000 nucleotídeos, alternativamente, inferior a 1 em 5.000 nucleotídeos, alternativamente, inferior a 1 em 10.000 nucleotídeos.

## **EXEMPLOS**

[1251] É feita agora referência aos seguintes exemplos,

que juntamente com as descrições acima ilustram algumas modalidades da invenção de uma forma não limitativa.

[1252] Geralmente, a nomenclatura aqui utilizada e os procedimentos laboratoriais utilizados na presente invenção incluem técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Essas técnicas são amplamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” Sambrook et al., (1989); “*Current Protocols in Molecular Biology*” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., “*Current Protocols in Molecular Biology*”, John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “*A Practical Guide to Molecular Cloning*”, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1988); Watson et al., “*Recombinant DNA*”, Scientific American Books, Nova Iorque; Birren et al. (eds) “*Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque (1998); metodologias conforme estabelecido nas patentes norte-americanas nºs 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 e 5,272,057; “*Cell Biology: A Laboratory Handbook*”, Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); “*Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique*” por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Terceira Edição; “*Current Protocols in Immunology*” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “*Basic and Clinical Immunology*” (8ª Edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell e Shiigi (eds), “*Selected Methods in Cellular Immunology*”, W. H. Freeman and Co., Nova Iorque (1980); os imunoensaios disponíveis são amplamente descritos na literatura científica e de patentes, ver, por exemplo, Patentes US Nºs 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 e 5,281,521; “*Oligonucleotide Synthesis*” Gait, M. J., ed. (1984); “*Nucleic Acid Hybridization*” Hames, BD, e Higgins SJ, eds. (1985); “*Transcription and Translation*” Hames, BD e Higgins SJ, eds. (1984); “*Animal Cell Culture*” Freshney, RI, ed. (1986); “*Immobilized Cells and Enzymes*” IRL Press, (1986); “*A Practical Guide to Molecular Cloning*” Perbal, B., (1984) e “*Methods in Enzymology*” Vol. 1-317, Academic Press; “*PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*”,

Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, “*Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual*” CSHL Press (1996); todos os quais são incorporados por referência como se totalmente estabelecidos aqui. Outras referências gerais são fornecidas ao longo deste documento. Os procedimentos nos mesmos são considerados bem conhecidos na técnica e são fornecidos para a conveniência do leitor. Todas as informações contidas nos mesmos são incorporadas aqui por referência.

### **EXEMPLO 1 – SELEÇÃO DE VARIANTES DE PD1-4-1BBL**

[1253] Uma análise estrutural de uma proteína de fusão PD1-4-1BBL aqui referida como “*DSP105*” compreendendo um peptídeo sinal N-terminal e uma his-tag (SEQ ID NO: 26, Figura 1) foi efetuada a fim de otimizar os seguintes parâmetros:

- Dobramento - dobramento adequado para permitir a ligação aos alvos, minimizar o potencial embaralhamento de di-sulfeto
- Integridade - sem locais proteolíticos expostos;
- Multimerização - explora a potencial multimerização dos dois domínios. Especificamente, otimiza a trimerização da formação do domínio C-terminal;
- Alta expressão no sistema de expressão de mamíferos; e
- Baixa imunogenicidade.

[1254] Especificamente, para o domínio PD1 (correspondendo aos aminoácidos 21-170 do domínio extracelular UniProt ID Q15116, SEQ ID NO: 2):

1. Um modelo abrangente PD1 foi gerado com base nas estruturas PDB: 3RRQ, 5GGR, 5GGS, 5IUS, 5JXE, 4ZQK, 5B8C, 5WT9 e uma estrutura NMR 2M2D. A parte C-terminal de PD1 que está faltando nas estruturas PDB mencionadas acima (a partir de GLU150, ou seja,

EVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV, SEQ ID NO: 6) inclui um segmento Pro-rico que se espera que seja dobrado sobre si mesmo (de acordo com algoritmos de modelagem de peptídeo).

2. A proteína de fusão foi analisada quanto a sítios proteolíticos usando o servidor PROSPER.

[1255] Para 4-1BBL (correspondendo aos aminoácidos 50-254 do domínio EM UniProt ID P41273, SEQ ID NO: 3):

1. Um modelo de domínio extracelular (EC) 4-1BBL foi gerado com base na estrutura PDB: 2X29. Uma vez que a parte N-terminal de 4-1BBL está ausente nesta estrutura PDB e não foi resolvida no raio-X, parece que este segmento (ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPD, SEQ ID NO: 7) expõe resíduos hidrofóbicos ao solvente e as tentativas de prever sua estrutura indicaram uma região não estruturada. Isso pode diminuir a estabilidade do *DSP105* de fusão e também pode interferir com a orientação adequada para trimerização via 4-1BBL.

2. A proteína de fusão foi analisada quanto a sítios proteolíticos usando o servidor PROSPER.

3. Um laço dentro do domínio resolvido 4-1BBL foi detectado que está voltado para fora em direção ao solvente, o que implica que pode ser uma região que sofre processamento.

[1256] As Figuras 2A-3 e Tabela 3 abaixo demonstram os modelos 3D gerados, os domínios e segmentos identificados e os locais proteolíticos previstos detectados na análise da proteína de fusão *DSP105*.

[1257] Em conjunto, a análise estrutural indicou o seguinte:

1. A remoção de um segmento de cinco resíduos no N-terminal de PD1 (PGWFL, SEQ ID NO: 8) é recomendada, uma vez que estes são principalmente hidrofóbicos por natureza, eles não são necessários para reconhecer PDL1 e se estendem fora do domínio estruturado.

2. A remoção de um segmento de cinco resíduos no C-terminal de PD1 também é recomendada (FQTLV, SEQ ID NO: 9) devido ao comportamento aparente semelhante, conforme explicado no ponto 1 acima (ou seja, estes são principalmente hidrofóbicos por natureza, eles são não é necessário para reconhecer PDL1 e eles se estendem fora do domínio estruturado).

3. Existem 4 locais de clivagem previstos encontrados (focando apenas em segmentos não estruturados), no C-terminal de PD1 e no N-terminal de 4-1BBL.

4. A remoção de um segmento N-terminal do domínio 4-1BBL (ACPWAVSGARASPG, SEQ ID NO: 10/ACPWAV, SEQ ID NO: 11) deve diminuir a flexibilidade e hidrofobicidade de *DSP105*.

5. Neste segmento N-terminal removido há um resíduo Cys livre que pode impedir o dobramento/rearranjo adequado devido a ligações dissulfeto incorretas.

**Tabela 3: Locais proteolíticos previstos na proteína de fusão *DSP105* PD1-4-1BBL (SEQ ID NO: 1).**

| ID Merops | Nome da Protease         | Posição | Local P4-P4' | Fragmento N (kDa) | Fragmento C (kDa) | Pontuação de clivagem |
|-----------|--------------------------|---------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| M10.003   | matriz metalopeptidase-2 | 144     | RPAG QFQT    | 19,03             | 24,84             | 0,99                  |
| M10.004   | matriz metalopeptidase-9 | 144     | RPAG QFQT    | 19,03             | 24,84             | 0,96                  |
| C01.036   | cathepsina K             | 147     | GQFQ TLVG    | 19,44             | 24,44             | 1,1                   |
| C02.001   | calpaína-1               | 151     | TLVG ACPW    | 19,92             | 23,95             | 0,94                  |
| S01.269   | glutamil peptidase I     | 174     | RLRE GPEL    | 22,43             | 21,44             | 1,04                  |

[1258] Com base na análise estrutural, várias variantes de PD1 foram projetadas com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 73, 75, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 115, 117 ou 119 que podem ser fundidos a 4-1BBL ou qualquer variante do mesmo.

[1259] Além disso, com base na análise estrutural, várias variantes de 4-1BBL foram projetadas com uma sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 123, 125, 127 ou 129 que pode ser fundida a PD1 ou qualquer variante do mesmo.

[1260] Além disso, para evitar a necessidade de trimerização da proteína de fusão para induzir a atividade da fração 4-1BBL, variantes de 4-1BBL compreendendo 3 repetições da sequência de aminoácidos de 4-1BBL foram projetadas, que podem ser fundidas com PD1 ou qualquer variante do mesmo. Uma sequência exemplar de tal variante 4-1BBL compreende três repetições de SEQ ID NO: 23 tendo um ligante (GGGGS)<sub>2</sub>+GGGG (SEQ ID NO: 121) entre as repetições com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 131.

[1261] Como um exemplo para *DSP105* compreendendo tal sequência de aminoácidos de 4-1BBL de 3 repetições, os modelos de *DSP105\_V31* (SEQ ID NO: 147) foram gerados usando modelagem de homologia seguida por cadeias laterais e refinamento de alça. A modelagem de homologia foi realizada para cada parte com base em uma estrutura de raios-X homóloga. Para PD1 - IDs de PDB: 3RRQ, 5GGR, 5GGS, 5JXE e 4ZQK foram usados como modelos. Para hlgG4 - IDs de PDB: 4C54, 4C55, 5W5M e 5W5N foram usados como modelos. Para 41BB-L - IDs de PDB: 6CPR, 6A3V e 6CU0 foram usados como modelos. Os segmentos de ligação foram modelados usando modelagem de laço no CHARMM principalmente a fim de remover violações estruturais e permitir uma estimativa plausível para um possível 'espaçador'. A análise desses modelos previu possível ligação aos ligantes e nenhuma interferência entre os diferentes domínios (Figuras 13A-D).

[1262] Além disso, uma proteína de fusão PD1-4-1BBL compreendendo um ligante (GGGGS)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 149) foi projetada para permitir uma distância mais longa entre porções PD1 de proteínas de fusão PD1-4-1BBL distintas após a trimerização.

[1263] A seguir, várias variantes PD1-4-1BBL foram projetadas. Suas sequências, incluindo o racional para sua seleção e seu modelo 3D, são demonstradas na Tabela 4 a seguir e nas Figuras 4-6

**Tabela 4: Descrição das variantes PD1-4-1BBL projetadas.**

| Variante                | Sequência                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Descrição                                                                                                |                                                                                                                               | Comentário                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DSP105</b>           | PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNA<br>TFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLA<br>AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRA<br>ELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV<br>GACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP<br>DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS<br>WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA<br>GVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ<br>PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF<br>QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT<br>QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID<br>NO: 5) | PD1 SEQ ID NO: 2 (150<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 3 (205<br>aminoácidos)   |                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>DSP105_<br/>var1</b> | DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPSPRPAGQGSAAASPRLREG<br>PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID<br>GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV<br>VAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA<br>LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN<br>AFGFQGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA<br>WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE<br>(SEQ ID NO: 12)                            | PD1 SEQ ID NO: 18 (140<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191<br>aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do N-ter de PD1<br>+ 5AA do C-ter<br>de PD1 + 14AA<br>do N-ter de 4-<br>1BBL<br>(mantendo o<br>ligante Gly) | Remoção de<br>pequenos<br>segmentos<br>flanqueadore<br>s hidrofóbicos<br>(previstos<br>para serem<br>menos<br>estruturados)<br>de ambos os<br>terminais de<br>PD1, além da<br>remoção dos<br>primeiros 14<br>N-ter AA de 4-<br>1BBL devido<br>aos longos<br>segmentos<br>não<br>estruturados<br>e hidrofóbicos<br>precedendo o<br>domínio<br>estruturado<br>de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var2</b>      | DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPSPRPAGQGARASPGSAAS<br>PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA<br>QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE<br>DTKELVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGS<br>GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS<br>SEARNSAFGFQGRLHLSAGQRLGVHLHTE<br>ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS<br>RSE (SEQ ID NO: 14)                      | PD1 SEQ ID NO: 18 (140<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 23 (197<br>aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do N-ter de PD1<br>+ 5AA do C-ter<br>de PD1 + 8AA<br>do N-ter de 4-<br>1BBL<br>(mantendo o<br>ligante Gly)  | Remoção de<br>pequenos<br>segmentos<br>flanqueadore<br>s hidrofóbicos<br>(previstos<br>para serem<br>menos<br>estruturados)<br>de ambos os<br>terminais de<br>PD1, além da<br>remoção dos<br>primeiros 8 N-<br>ter AA de 4-<br>1BBL que se<br>prevê serem<br>não                                                                                                      |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                 |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                 |                                                                                                          | estruturados e são o segmento hidrofóbico central que precede o domínio estruturado de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                 |
| <b>DSP105_var3</b> | <p>DSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/> FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFD<br/> RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/> RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/> RRAEVPTAHPSPSPRPAGQGLREGPELSPD<br/> DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW<br/> YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG<br/> VYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL<br/> RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ<br/> GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ<br/> GATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 16)</p>                      | PD1 SEQ ID NO: 18 (140 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 24 (185 aminoácidos) | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1 + 20AA do N-ter de 4-1BBL (mantendo o ligante Gly)  | Remoção de pequenos segmentos flanqueadores hidrofóbicos (previstos para serem menos estruturados) de ambos os terminais de PD1, além da remoção dos primeiros 20 N-ter AA de 4-1BBL devido aos longos segmentos não estruturados e hidrofóbicos que precedem o domínio estruturado de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var4</b> | <p>DSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/> FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFD<br/> RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/> RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/> RRAEVPTAHPSPSPRPAGQGS GARASPGS<br/> AASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ<br/> LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS<br/> YKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGE<br/> GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP<br/> ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLH<br/> TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL<br/> PSRSE (SEQ ID NO: 44)</p> | PD1 SEQ ID NO: 18 (140 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 25 (199 aminoácidos) | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1 + Deleção de 6 aminoácidos do N-terminal de 4-1BBL  | Remoção de pequenos segmentos flanqueadores hidrofóbicos (previstos para serem menos estruturados) de ambos os terminais de PD1, e Remoção do segmento hidrofóbico central de 4-1BBL                                                                                                          |
| <b>DSP105_var5</b> | <p>DSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/> FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFD<br/> RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/> RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/> RRAEVPTAHPSPSGGARASPGSAASPRLRE<br/> GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI<br/> DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL<br/> VVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL</p>                                                                                                                                           | PD1 SEQ ID NO: 21 (133 aa), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 25 (199 aminoácidos)          | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 12AA do C-ter de PD1 + Deleção de 6 aminoácidos do N-terminal de 4-1BBL | Remoção de um pequeno segmento hidrofóbico do N-ter de PD1 e um segmento flanqueador                                                                                                                                                                                                          |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                              |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    | ALHLQPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARN<br>SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH<br>AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE<br>(SEQ ID NO: 45)                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                              |                                                                                                                                 | maior<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado)<br>do C-ter de<br>PD1 (com<br>base em<br>construtos<br>cristalizados),<br>além de<br>remoção do<br>segmento<br>central<br>hidrofóbico de<br>4-1BBL                                                                                                                                                                   |
| <b>DSP105_var6</b> | DSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPGSAASPRLREGPELSPDD<br>PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY<br>SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGV<br>YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR<br>SAAGAAALATVDLPPASSEARNSAFGFQG<br>RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG<br>ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO:<br>46)        | PD1 SEQ ID NO: 21 (133 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ<br>ID NO: 22 (191 aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do N-ter de PD1<br>+ 12AA do C-ter<br>de PD1 +<br>Deleção de 14<br>aminoácidos do<br>N-terminal de 4-<br>1BBL | Remoção de<br>um pequeno<br>segmento<br>hidrofóbico do<br>N-ter de PD1<br>e um<br>segmento<br>flanqueador<br>maior<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado)<br>do C-ter de<br>PD1 (com<br>base em<br>construtos<br>cristalizados),<br>além de<br>remoção de<br>flanqueador<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado) e<br>segmento<br>hidrofóbico de<br>4-1BBL |
| <b>DSP105_var7</b> | DSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPGARASPGSAASPRLREGP<br>ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG<br>PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV<br>AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL<br>HLQPLRSAAGAAALATVDLPPASSEARNSA<br>FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW<br>QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE<br>(SEQ ID NO: 47) | PD1 SEQ ID NO: 21 (133 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ<br>ID NO: 23 (197 aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do N-ter de PD1<br>+ 12AA do C-ter<br>de PD1 +<br>Deleção de 8<br>aminoácidos do<br>N-terminal de 4-<br>1BBL  | Remoção de<br>um pequeno<br>segmento<br>hidrofóbico do<br>N-ter de PD1<br>e um<br>segmento<br>flanqueador<br>maior<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado)<br>do C-ter de<br>PD1 (com<br>base em<br>construtos<br>cristalizados),<br>além da<br>remoção dos                                                                                                        |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                              |                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                              |                                                                                                             | primeiros 8 N-ter AA de 4-1BBL que se prevê serem não estruturados e são o segmento hidrofóbico central que precede o domínio estruturado de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                   |
| <b>DSP105_var8</b> | <p>DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/>         FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br/>         RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/>         RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/>         RRAEVPTAHPSPGLREGPELSPDDPAGLLD<br/>         LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA<br/>         GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQL<br/>         ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA<br/>         ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA<br/>         GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF<br/>         RVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 48)</p>                         | PD1 SEQ ID NO: 21 (133 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ<br>ID NO: 24 (185 aminoácidos) | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 12AA do C-ter de PD1 + 20AA do N-ter de 4-1BBL (mantendo o ligante de Gly) | Remoção de um pequeno segmento hidrofóbico do N-ter de PD1 e um segmento flanqueador maior (previsto para ser menos estruturado) do C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados), além da remoção dos primeiros 20 N-ter AA de 4-1BBL devido aos longos segmentos não estruturados e hidrofóbicos que precedem o domínio estruturado de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var9</b> | <p>PWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSE<br/>         SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPG<br/>         QDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SG<br/>         TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTEARRAEV<br/>         PTAHPSPGSGARASPGSAASPRLREGPELS<br/>         PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS<br/>         WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA<br/>         GVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ<br/>         PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF<br/>         QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT<br/>         QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID<br/>         NO: 49)</p> | PD1 SEQ ID NO: 19 (128 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ<br>ID NO: 25 (199 aminoácidos) | Deleção do 10AA do N-ter de PD1 + 12AA do C-ter de PD1 + Deleção de 6 aminoácidos do N-terminal de 4-1BBL   | Remoção de segmentos flanqueadores maiores (previsto para serem menos estruturados) de ambos os terminais de PD1 (com base em construtos cristalizados), além de                                                                                                                                                                                      |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                              |                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                              |                                                                                                                                  | remoção do segmento central hidrofóbico de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>DSP105_var10</b> | <p>PWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE<br/> SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br/> QDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG<br/> TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br/> PTAHPSPGsAASPRLREGPELSPDDPAGLLD<br/> LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA<br/> GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQL<br/> ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA<br/> ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA<br/> GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF<br/> RVTPPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 50)</p>            | PD1 SEQ ID NO: 19 (128 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ<br>ID NO: 22 (191 aminoácidos) | Deleção do<br>10AA do N-ter<br>de PD1 + 12AA<br>do C-ter de PD1<br>+ Deleção de 14<br>aminoácidos do<br>N-terminal de 4-<br>1BBL | Remoção de<br>segmentos<br>flanqueadore<br>s maiores<br>(previsto para<br>serem menos<br>estruturados)<br>de ambos os<br>terminais de<br>PD1 (com<br>base em<br>construtos<br>cristalizados,<br>além de<br>remoção de<br>flanqueador<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado) e<br>segmento<br>hidrofóbico de<br>4-1BBL                                                                                           |
| <b>DSP105_var11</b> | <p>PWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE<br/> SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br/> QDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG<br/> TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br/> PTAHPSPGARASPGSAASPRLREGPELSPD<br/> DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW<br/> YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAG<br/> VYVFFQLLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL<br/> RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ<br/> GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ<br/> GATVLGLFRVTPPEIPAGLPSRSE (SEQ ID<br/>NO: 51)</p> | PD1 SEQ ID NO: 19 (128 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ<br>ID NO: 23 (197 aminoácidos) | Deleção do<br>10AA do N-ter<br>de PD1 + 12AA<br>do C-ter de PD1<br>+ Deleção de 8<br>aminoácidos do<br>N-terminal de 4-<br>1BBL  | Remoção de<br>segmentos<br>flanqueadore<br>s maiores<br>(previsto para<br>serem menos<br>estruturados)<br>de ambos os<br>terminais de<br>PD1 (com<br>base em<br>construtos<br>cristalizados),<br>além da<br>remoção dos<br>primeiros 8 N-<br>ter AA de 4-<br>1BBL que se<br>prevê serem<br>não<br>estruturados<br>e são o<br>segmento<br>hidrofóbico<br>central que<br>precede o<br>domínio<br>estruturado<br>de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var12</b> | <p>PWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE<br/> SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br/> QDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | PD1 SEQ ID NO: 19 (128 aa),<br>ligante de glicina, 4-1BBL SEQ                                | Deleção do<br>10AA do N-ter<br>de PD1 + 12AA                                                                                     | Remoção de<br>segmentos<br>flanqueadore                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                          |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br>PTAHPSPLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM<br>FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG<br>GLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVV<br>AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD<br>LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV<br>HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP<br>AGLPSPRSE (SEQ ID NO: 52)                                                                                                                          | ID NO: 24 (185 aminoácidos)                                                                              | do C-ter de PD1<br>+ 20AA do N-ter<br>de 4-1BBL<br>(mantendo o<br>ligante de Gly)                                               | s maiores<br>(previsto para<br>serem menos<br>estruturados)<br>de ambos os<br>terminais de<br>PD1 (com<br>base em<br>construtos<br>cristalizados),<br>além da<br>remoção dos<br>primeiros 20<br>N-ter AA de 4-<br>1BBL devido<br>aos longos<br>segmentos<br>não<br>estruturados<br>e hidrofóbicos<br>que<br>precedem o<br>domínio<br>estruturado<br>de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var13</b> | PWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSE<br>SFVLNWMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br>QDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG<br>TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br>PTAHPSPLPRPAGQGSGARASPGSAASPRL<br>REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV<br>LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK<br>ELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSV<br>SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA<br>RNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA<br>RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRS<br>E (SEQ ID NO: 53) | PD1 SEQ ID NO: 20 (135<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 25 (199<br>aminoácidos) | Deleção do<br>10AA do N-ter<br>de PD1 + 5AA<br>do C-ter de PD1<br>+ Deleção de 6<br>aminoácidos do<br>N-terminal de 4-<br>1BBL  | Remoção de<br>segmento<br>flanqueador<br>maior<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado)<br>de N-ter e<br>segmento<br>hidrofóbico<br>menor de C-<br>ter de PD1<br>(com base em<br>construtos<br>cristalizados),<br>além de<br>remoção do<br>segmento<br>central<br>hidrofóbico de<br>4-1BBL                                                              |
| <b>DSP105_var14</b> | PWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSE<br>SFVLNWMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br>QDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG<br>TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br>PTAHPSPLPRPAGQGSAAASPRLREGPELSP<br>DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS<br>WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA<br>GVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ<br>PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF<br>QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT<br>QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE (SEQ ID<br>NO: 54)          | PD1 SEQ ID NO: 20 (135<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191<br>aminoácidos) | Deleção do<br>10AA do N-ter<br>de PD1 + 5AA<br>do C-ter de PD1<br>+ Deleção de 14<br>aminoácidos do<br>N-terminal de 4-<br>1BBL | Remoção de<br>segmento<br>flanqueador<br>maior<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado)<br>de N-ter e<br>segmento<br>hidrofóbico<br>menor de C-<br>ter de PD1<br>(com base em<br>construtos                                                                                                                                                             |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                        |                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                        |                                                                                                                    | cristalizados), além de remoção de flaqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>DSP105_var15</b> | <p>PWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE<br/> SFVLNWWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br/> QDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG<br/> TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br/> PTAHPSPSPRPAGQGARGASPGSAASPRLE<br/> GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI<br/> DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL<br/> VVAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL<br/> ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN<br/> SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH<br/> AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE<br/> (SEQ ID NO: 55)</p> | <p>PD1 SEQ ID NO: 20 (135 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 23 (197 aminoácidos)</p> | <p>Deleção do 10AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1 + Deleção de 8 aminoácidos do N-terminal de 4-1BBL</p>    | <p>Remoção de um segmento flaqueador maior (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico menor de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados), além da remoção dos primeiros 8 N-ter AA de 4-1BBL que se prevê serem não estruturados e são o segmento hidrofóbico central que precede o domínio estruturado de 4-1BBL</p> |
| <b>DSP105_var16</b> | <p>PWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSE<br/> SFVLNWWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPG<br/> QDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDG<br/> TYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEV<br/> PTAHPSPSPRPAGQGLREGPELSPDDPAGL<br/> LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG<br/> LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFF<br/> QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG<br/> AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL<br/> SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL<br/> GLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 56)</p>                  | <p>PD1 SEQ ID NO: 20 (135 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 24 (185 aminoácidos)</p> | <p>Deleção do 10AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1 + 20AA do N-ter de 4-1BBL (mantendo o ligante de Gly)</p> | <p>Remoção de um segmento flaqueador maior (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico menor de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados), além da remoção dos primeiros 20 N-ter AA de 4-</p>                                                                                                                         |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                 |                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                 |                                                                                                                                                          | 1BBL devido aos longos segmentos não estruturados e hidrofóbicos que precedem o domínio estruturado de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>DSP105_var17</b> | <p>DSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/> FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br/> RSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/> RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/> RRAEVPTAHPSPSPRPAGQGSAASPRREG<br/> PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID<br/> GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV<br/> VAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA<br/> LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN<br/> AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA<br/> WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE<br/> (SEQ ID NO: 97)</p> | PD1 SEQ ID NO: 75 (140 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191 aminoácidos) | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1 + Mutações de C73 correspondente à SEQ ID NO: 2 para S + Deleção do segmento N-ter de 4-1BBL 14AA   | Remoção de um pequeno segmento hidrofóbico de N-ter de PD1 e um segmento flanqueador maior (previsto para ser menos estruturado) de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados); para S + uma mutação de C para S em PD1 para evitar pontes S-S indesejadas; e remoção de um flanqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var18</b> | <p>WNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSES<br/> FVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQ<br/> DSRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDST<br/> YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTEARRAEV<br/> TAHPSPGSAASPRREGPELSPDDPAGLLDL<br/> RQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG<br/> VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE<br/> LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA<br/> LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG<br/> QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR<br/> VTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 101)</p>                 | PD1 SEQ ID NO: 87 (127 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191 aminoácidos) | Deleção do 11AA do N-ter de PD1 + 12AA do C-ter de PD1 + Mutações de C73 correspondente à SEQ ID NO: 2 para S + Deleção do segmento N-ter de 4-1BBL 14AA | Remoção de um segmento flanqueador maior (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico grande de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados); uma mutação de C para S                                                                                                                                                                |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                        |                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                        |                                                                                                                                                               | em PD1 para evitar pontes S-S indesejadas; e remoção de um flaqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                              |
| <b>DSP105_var19</b> | <p>WNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSES<br/>FVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQ<br/>DSRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT<br/>YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP<br/>TAHPSPSPRPAGQGSAASPRLREGPELSPD<br/>DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW<br/>YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG<br/>YYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL<br/>RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ<br/>GRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ<br/>GATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 103)</p> | <p>PD1 SEQ ID NO: 91 (134 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191 aminoácidos)</p> | <p>Deleção do 11AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1 + Mutação de C73 correspondente à SEQ ID NO: 2 para S + Deleção do segmento N-ter de 4-1BBL 14AA</p> | <p>Remoção de um segmento flaqueador maior (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico pequeno de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados), uma mutação de C para S em PD1 para evitar pontes S-S indesejadas; e remoção de flaqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL</p> |
| <b>DSP105_var20</b> | <p>DSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/>FSNTSEFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPED<br/>RSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/>RRAEVPTAHPSPGSAASPRLREGPELSPDD<br/>PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY<br/>SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV<br/>YYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR<br/>SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG<br/>RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG<br/>ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 105)</p>  | <p>PD1 SEQ ID NO: 83 (133 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191 aminoácidos)</p> | <p>Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 12AA do C-ter de PD1 + Mutação de C73 correspondente à SEQ ID NO: 2 para S + Deleção do segmento N-ter de 4-1BBL 14AA</p> | <p>Remoção de um segmento flaqueador pequeno (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico grande de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados); uma mutação de C para S em PD1 para</p>                                                                                                                              |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                 |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                 |                                                                                                                                                        | evitar pontes S-S indesejadas; e remoção de um flaqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>DSP105_var21</b> | <p>DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/> FSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br/> RSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/> RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/> RRAEVPTAHPSPSPRPAGSAASPRLREGPE<br/> LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP<br/> LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA<br/> KAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL<br/> QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG<br/> FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL<br/> TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ<br/> ID NO: 107)</p>                                 | PD1 SEQ ID NO: 95 (138 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191 aminoácidos) | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 7AA do C-ter de PD1 + Mutações de C73 correspondente à SEQ ID NO: 2 para S + Deleção do segmento N-ter de 4-1BBL 14AA | Remoção de um segmento flaqueador maior (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico pequeno de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados); uma mutação de C para S em PD1 para evitar pontes S-S indesejadas; e remoção de flaqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL |
| <b>DSP105_var22</b> | <p>PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNA<br/> TFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLA<br/> AFPEDRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br/> VVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRA<br/> ELRVTEERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV<br/> GACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP<br/> DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS<br/> WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA<br/> GVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ<br/> PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF<br/> QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT<br/> QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID<br/> NO: 111)</p> | PD1 SEQ ID NO: 73 (156 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 3 (205 aminoácidos)  | Mutações de C73 correspondente a SEQ ID NO: 2 a S                                                                                                      | Uma mutação de C para S em PD1 para evitar pontes S-S indesejadas                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>DSP105_var23</b> | <p>DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br/> FSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br/> RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br/> RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br/> RRAEVPTAHPSPSPRPAGSAASPRLREGPE<br/> LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP</p>                                                                                                                                                                                                                                       | PD1 SEQ ID NO: 93 (138 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191 aminoácidos) | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 7AA do C-ter de PD1. Deleção do segmento N-ter                                                                        | Remoção de um segmento flaqueador maior (previsto para ser menos                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                            |                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA<br>KAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL<br>QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG<br>FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL<br>TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ<br>ID NO: 113)                                                                                                                                                                                               |                                                                                                            | de 4-1BBL<br>14AA                                                                                                      | estruturado)<br>de N-ter e um<br>segmento<br>hidrofóbico<br>pequeno de<br>C-ter de PD1<br>(com base em<br>construtos<br>cristalizados)<br>e remoção de<br>flanqueador<br>(previsto para<br>ser menos<br>estruturado) e<br>segmento<br>hidrofóbico de<br>4-1BBL        |
| <b>DSP105_var24</b> | DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPSPRGREGPELSPDDPAGL<br>LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG<br>LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFF<br>QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG<br>AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL<br>SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL<br>GLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO:133) | PD1 SEQ ID NO: 115 (136<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 123 (184<br>aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do N-ter de PD1<br>+ 9AA do C-ter<br>de PD1.<br>Deleção de<br>21AA do<br>segmento N-ter<br>de 4-1BBL | Encurtamento<br>do ligante<br>relativamente<br>longo (de<br>ambos os<br>lados PD1 C-<br>ter e 41BBL<br>N-ter)<br>mantendo o<br>máximo de<br>resíduos<br>carregados<br>positivos para<br>complementa<br>r o N-ter<br>carregado<br>negativament<br>e de 4-1BBL          |
| <b>DSP105_var25</b> | DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPSPRGPELSPDDPAGLLD<br>LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA<br>GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLE<br>ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA<br>ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA<br>GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF<br>RVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO:135)   | PD1 SEQ ID NO: 115 (136<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 125 (182<br>aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do N-ter de PD1<br>+ 9AA do C-ter<br>de PD1.<br>Deleção de<br>23AA do<br>segmento N-ter<br>de 4-1BBL | Maior<br>encurtamento<br>do ligante<br>relativamente<br>longo (de<br>ambos os<br>lados PD1 C-<br>ter e 41BBL<br>N-ter),<br>mantendo o<br>máximo de<br>resíduos<br>carregados<br>positivos para<br>complementa<br>r o N-ter<br>carregado<br>negativament<br>e de 41BBL |
| <b>DSP105_var26</b> | PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNA<br>TFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLA<br>AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRA<br>ELRVTEARRAEVPTAHPSPSPRPAGQGSAA<br>S<br>PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA                                                                                                                                                                          | PD1 SEQ ID NO: 117 (145<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>4-1BBL SEQ ID NO: 127 (183<br>aminoácidos) | Deleção do 5AA<br>do C-ter de PD1.<br>Deleção de 14<br>AA do segmento<br>N-ter de 4-1BBL<br>e 8 AA do C-ter            | Nenhuma<br>deleção de N-<br>ter de PD1 (o<br>N-ter está no<br>lado de<br>interação de                                                                                                                                                                                 |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                   |                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE<br>DTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGS<br>GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS<br>SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE<br>ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA (SEQ<br>ID NO:137)                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                   | de 4-1BBL                                                                                              | PDL1, portanto, há uma possibilidade de que a deleção nesta área pode afetar a interação de proteínas). Remoção do segmento hidrofóbico de C-ter de PD1 (com base em construtos cristalizados) e remoção de flaqueador (previsto para ser menos estruturado) e segmento hidrofóbico de 4-1BBL e o lado C-ter de seq 41BBL (possível interação deste segmento com o ligante) |
| <b>DSP105_var27</b> | PGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNA<br>TFTCSFSNTSEFVLNWMSPSNQTDKLA<br>AFPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSTYLCAISLAPKAQIKESLRA<br>ELRVTERRAEVPTAHPSPSPRAGREGPEL<br>SPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL<br>SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA<br>AGVYVFFQLELRRVVAGEGSVSLALHL<br>QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG<br>FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL<br>TQGATVLGLFRVTPEIPA (SEQ ID NO:139)                             | PD1 SEQ ID NO: 119 (143 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 129 (176 aminoácidos) | Deleção do 7AA do C-ter de PD1. Deleção de 21 AA do segmento N-ter de 4-1BBL e 8 AA do C-ter de 4-1BBL | Encurtamento do ligante relativamente longo (de ambos os lados PD1 C-ter e 41BBL N-ter) e o lado C-ter de seq 41BBL (possível interação deste segmento com o ligante)                                                                                                                                                                                                       |
| <b>DSP105_var28</b> | DSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSEFVLNWMSPSNQTDKLAAPFED<br>RSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRAR<br>RNDSTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTE<br>RRAEVPTAHPSPSPRAGQACPWAVSGA<br>RASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR<br>QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV<br>SLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLEL<br>RRVVAGEGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL<br>ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG<br>QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR<br>VTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO:141) | PD1 SEQ ID NO: 18 (140 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 3 (205 aminoácidos)    | Deleção do 5AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1                                                   | Remoção de um segmento flaqueador pequeno (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico pequeno de C-ter de PD1 (com base em                                                                                                                                                                                                                     |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                          | construtos cristalizados). Ligante vivo relativamente longo entre o PD1 e 4-1BBL para permitir longa distância entre os domínios PD1 após a trimerização do 4-1BBL                                                                                     |
| <b>DSP105_var29</b> | PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNA<br>TFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLA<br>AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRA<br>ELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV<br>GSGARASPGSAASPRREGPELSPDDPAGL<br>LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG<br>LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFF<br>QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG<br>AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL<br>SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL<br>GLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO:143)                     | PD1 SEQ ID NO: 2 (150 aminoácidos), ligante de glicina, 4-1BBL SEQ ID NO: 25 (109 aminoácidos)                                                                                            | Deleção de 6 AA do segmento N-ter de 4-1BBL                                                                              | Uma longa sequência nativa sem estrutura definida que pode servir como um ligante longo entre o PD1 e 4-1BBL para permitir uma longa distância entre os domínios PD1 após a trimerização do 4-1BBL. Remoção do segmento hidrofóbico central do 4-1BBL. |
| <b>DSP105_var30</b> | PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNA<br>TFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLA<br>AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRA<br>ELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV<br>GGGGSGGGGSACPWAVSGARASPGSAAS<br>PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA<br>QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE<br>DTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGS<br>GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS<br>SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE<br>ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS<br>RSE (SEQ ID NO:145) | PD1 SEQ ID NO: 2 (150 aminoácidos), (GGGGS)x2 (SEQ ID NO: 149) ligante 4-1BBL SEQ ID NO: 3 (205 aminoácidos)                                                                              | WT PD1 e 4-1BBL ligados por (GGGGS)x2                                                                                    | Extensão do ligante entre o PD1 e 4-1BBL para permitir longa distância entre os domínios PD1 após a trimerização do 4-1BBL                                                                                                                             |
| <b>DSP105_var31</b> | DSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCS<br>FSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLA<br>AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRA<br>ELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV<br>GGGGSGGGGSACPWAVSGARASPGSAAS<br>PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVA<br>QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE<br>DTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGS<br>GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS<br>SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE<br>ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS<br>RSE (SEQ ID NO:145)      | PD1 SEQ ID NO: 18 (140 aminoácidos), GGGSGGGG (SEQ ID NO: 122) como um ligante, sc3x41BBL [SEQ ID NO 131 (601 aa): 3 vezes SEQ ID NO: 22] separado por ligante GGGSGGGG (SEQ ID NO: 121)] | Deleção de 5AA do N-ter de PD1 + 5AA do C-ter de PD1. Cadeia única contendo três 4-1BBL com deleção de 14 AA no segmento | Remoção de um segmento flancoador pequeno (previsto para ser menos estruturado) de N-ter e um segmento hidrofóbico                                                                                                                                     |

|                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                          |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | TEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL<br>PSPRSEGGGGSGGGSGGGGSAASPRLRE<br>GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLI<br>DGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL<br>VVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL<br>ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN<br>SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH<br>AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG<br>GGGSGGGSGGGGSAASPRLREGPELSPD<br>DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW<br>YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG<br>VYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL<br>RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ<br>GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ<br>GATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID<br>NO:147) |                                                                                                          | N-ter.                                                                                                                          | pequeno de<br>C-ter de PD1<br>(com base em<br>construtos<br>cristalizados).<br>Evita a<br>necessidade<br>de<br>trimerização<br>combinando<br>três domínios<br>de 4-1BBL<br>(sem o 14 AA<br>do N-ter que<br>se previu ser<br>menos<br>estruturado e<br>hidrofóbico)                                                                                              |
| <b>DSP105_</b><br><b>var32</b> | SAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA<br>QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL<br>SYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAG<br>EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP<br>PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL<br>HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA<br>GLPSRSEGDSPPDRPWNPTFSPALLVTE<br>GDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQT<br>DKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF<br>HMSVVRARRNDSTYLCAISLAPKAQIKES<br>LRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQ<br>(SEQ ID NO: 168)                                                                                                                                    | 4-1BBL SEQ ID NO: 22 (191<br>aminoácidos), ligante de glicina,<br>PD1 SEQ ID NO: 18 (140<br>aminoácidos) | Deleção de<br>14AA do N-ter<br>de 4-1BBL +<br>5AA do N-ter de<br>PD1 + 5AA do<br>C-ter de PD1<br>(mantendo o<br>ligante de Gly) | Remoção dos<br>primeiros 14<br>N-ter AA de 4-<br>1BBL devido<br>aos longos<br>segmentos<br>não<br>estruturados<br>e hidrofóbicos<br>que<br>precedem o<br>domínio<br>estruturado<br>de 4-1BBL; e<br>remoção de<br>pequenos<br>segmentos<br>flanqueadore<br>s hidrofóbico<br>(previsto para<br>serem menos<br>estruturados)<br>de ambos os<br>terminais de<br>PD1 |

## EXEMPLO 2 – FABRICAÇÃO DE VARIANTES DE PD1-

### 4-1BBL

[1264] Para análise funcional comparativa e avaliação da produção, várias proteínas de fusão PD1-4-1BBL foram produzidas, a saber: uma proteína de fusão PD1-4-1BBL aqui referida como “*DSP105*” (SEQ ID NO: 5) e nove variantes de *DSP105* aqui referidas como “*DSP105\_V1*”, “*DSP105\_V2*”, “*DSP105\_V3*”, “*DSP105\_V17*”, “*DSP105\_V18*”, “*DSP105\_V19*”,

“DSP105\_V20”, “DSP105\_V21”, “DSP105\_V22”, “DSP\_V23”, “DSP105\_V24”, “DSP105\_V25”, “DSP105\_V26”, “DSP105\_V27”, “DSP105\_V28”, “DSP105\_V29”, “DSP105\_V30” e “DSP105\_V31” (SEQ ID NO: 12, 14, 16, 97, 101, 103, 105.107, 111 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145 e 147), respectivamente.

[1265] A produção foi efetuada em ExpiCHO, Expi293F ou células CHO-3E7 foram transfectadas por um vetor de expressão pcDNA3.4 ou pTT5 clonado com a sequência de codificação para *DSP105* e suas variantes. As sequências foram clonadas no vetor usando as enzimas de restrição EcoRI e HindIII, com adição de sequência Kozak, peptídeo sinal artificial (MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG, SEQ ID NO: 4) com ou sem 6 His-tag no terminal N ou C e um códon de parada no terminal C. As proteínas foram coletadas do sobrenadante da cultura de células.

[1266] Os sobrenadantes foram purificados por purificação de uma etapa por coluna HisTrap™ FF Crude.

[1267] A produção das proteínas de fusão marcadas foi verificada por SDS-PAGE e análise de Western Blot usando anticorpos específicos contra His tag ou um dos domínios da molécula (isto é, o domínio extracelular de cada PD1 ou 4-1BBL), ver, por exemplo, Figuras 8A-E.

[1268] Por exemplo, a análise de Western Blot de variantes His-tagged-*DSP105\_V17*, *DSP105-V18*, *DSP105\_V19*, *DSP105\_V20* e *DSP105\_V23* separadas em um gel SDS-PAGE sob condições de redução seguido por immunoblotting com um anticorpo anti-PD1 ou anticorpo anti His-tag demonstrou que as variantes foram expressas em células CHO-3E7.

[1269] Opcionalmente, as proteínas de fusão produzidas são ainda purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho para coletar a fração de um trímero purificado. Para tanto, as proteínas são carregadas em coluna Superdex com PBS como fase móvel e a uma vazão de 1ml/min. O pico principal correspondente aos trímeros de proteína é coletado.

[1270] O rendimento é avaliado usando a determinação da concentração de proteína BCA ou Bradford, ou por medição da densidade óptica por Nanodrop, a 280nm, dividido pelo coeficiente de extinção da proteína. A estabilidade das proteínas é avaliada em condições de armazenamento e aceleradas.

### **EXEMPLO 3 – DETERMINAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO DAS VARIANTES DE PD1-4-1BBL**

#### *Materiais*

[1271] DSP105 marcado com his N-terminal (SEQ ID NO: 1) produzido em células Expi293 [referido aqui como “DSP105 (HEK-NH)”] como descrito no Exemplo 2 acima, DSP105 marcado com his N-terminal (SEQ ID NO: 1) produzido em células ExpiCHO [aqui referidas como “DSP105 (CHO-NH)”], variantes DSP105\_V1 marcadas com his N-terminal DSP105\_V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105\_V2 (SEQ ID NO: 15) e DSP105\_V3 (SEQ ID NO: 17) produzido em células ExpiCHO [aqui referido como “DSP105 (CHO-NH)-V1”, “DSP105 (CHO-NH)-V2” e “DSP105 (CHO-NH)-V3)], Variantes DSP105\_V17 marcadas com His N-terminal (SEQ ID NO: 99) e DSP105\_V22 (SEQ ID NO: 109) produzidas em células CHO-3E7 ou ExpiCHO e variantes DSP105 DSP107\_V17 (SEQ ID NO: 97), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido em células CHO-3E7 ou células ExpiCHO, conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1272] Marcador de peso molecular de proteína Spectra BR (Thermo Fisher Scientific, cat# 26634), 4-20% de gel de poliacrilamida (BioRad, cat# 556-8094), e-Stain peds (GenScript, cat# L02011), Tampão de carga de Laemmli (BioRad, cat# 161-0747). Coluna Superdex 200 boost (GE

Healthcare), sistema SEC-MALS: AKTA Explorer (GE) + MiniDawn TREOS + OPTILAB T-reX (WYATT).

### *Métodos*

[1273] Análise SDS-PAGE - Dois µg de proteína ou 35 µl de sobrenadante de cada amostra foram misturados com tampão de carga com ou sem β-mercaptoetanol (condições reduzidas e não reduzidas, respectivamente), aquecidos por 5 minutos a 95 °C e separados em Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida com gradiente de 4-20%. A migração de proteínas no gel é visualizada por coloração com azul Coomassie com e-Stain peds e lavagem com o maquinário e-Stain (GenScript), de acordo com as instruções do fabricante.

[1274] Análise SEC-MALS - As proteínas são carregadas em uma coluna Superdex 200 boost (GE Healthcare) e executadas a uma taxa de fluxo de 0,8 ml/min com 10 mM KPO<sub>4</sub> pH 8,0 + 150 mM NaCl como fase móvel. A detecção é realizada por UV, MALS e RI usando AKTA Explorer (GE) + MiniDawn TREOS + OPTILAB T-reX (WYATT).

### *Resultados*

[1275] Como demonstrado na Figura 7, uma alta proporção de formas de alto peso molecular (HMW, agregados) foi observada em *DSP105* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 1) em condições não redutoras, mas não em condições redutoras. Por outro lado, apenas um nível menor de agregados foi detectado em *DSP105\_V17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), indicando que a agregação de *DSP105* devido à formação incorreta de ligações dissulfeto foi evitada em *DSP105\_V17*. Um baixo nível de agregados foi observado em outras variantes PD1-4-1BBL [a saber, *DSP105\_V18* (SEQ ID NO: 101), *DSP105\_V19* (SEQ ID NO: 103), *DSP105\_V20* (SEQ ID NO: 105) e *DSP105\_V23* (SEQ ID NO: 113)], conforme demonstrado nas Figuras 8A-E.

[1276] Como mostrado nas Figuras 9A-B, quando separado em um SDS-PAGE sob condições não redutoras *DSP105* com cauda

de His N-terminal (WT; SEQ ID NO: 1) variantes de *DSP105* com cauda de His N-terminal *DSP105\_V17* (SEQ ID NO: 99), *DSP105\_V17* (SEQ ID NO: 97), *DSP105\_V20* (SEQ ID NO: 105), *DSP\_V22* (SEQ ID NO: 111), *DSP105\_V23* (SEQ ID NO: 113), *DSP105\_V24* (SEQ ID NO: 133), *DSP105\_V25* (SEQ ID NO: 135), e *DSP105\_V31* (SEQ ID NO: 147), variantes de PD1-4-1BBL foram detectadas com o mesmo peso molecular que sob condições de redução. Bandas adicionais de peso molecular mais alto foram detectadas no *DSP105* marcado com his (WT; SEQ ID NO: 1, designada como “*DSP105WT*” nas Figuras 9A-B), que eram mais fortes sob as condições de não redução em comparação com as condições de redução. Isso pode sugerir a formação de multímeros, provavelmente mediados por pontes S-S. Curiosamente, esta banda principal de “alto peso molecular” que apareceu em *DSP105WT* não reduzido não foi vista em *DSP105\_V22* (SEQ ID NO: 111) contendo a substituição CYS73> Ser, enfatizando que esta banda de alto peso molecular é provavelmente mediada pelo CYS73.

#### **EXEMPLO 4 – AS VARIANTES DE PD1-4-1BBL CONTÊM AMBOS OS DOMÍNIOS**

##### *Materiais*

[1277] *DSP105* (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), *DSP105* (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), *DSP105* (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), *DSP105* (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), *DSP105* (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), *DSP105\_V17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), *DSP105\_V22* marcado com His (SEQ ID NO: 109), *DSP\_V17* (SEQ ID NO: 97), *DSP105\_V18* (SEQ ID NO: 101), *DSP105\_V19* (SEQ ID NO: 103), *DSP105\_V20* (SEQ ID NO: 105), *DSP105\_V21* (SEQ ID NO: 107), *DSP\_V22* (SEQ ID NO: 111), *DSP105\_V23* (SEQ ID NO: 113), *DSP105\_V24* (SEQ ID NO: 133), *DSP105\_V25* (SEQ ID NO: 135), *DSP105\_V26* (SEQ ID NO: 137), *DSP105\_V27* (SEQ ID NO: 139), *DSP105\_V28* (SEQ ID NO: 141), *DSP105\_V29* (SEQ ID NO: 143), *DSP105\_V30* (SEQ ID NO: 145) e *DSP105\_V31* (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1278] Para a análise de Western Blot: marcador de proteína Spectra BR (Thermo Fisher Scientific, cat# 26634), Tampão de carga de Laemmli (BioRad, cat# 161-0747), gel de poliacrilamida 4-20% (BioRad, cat# 556-8094), anti 4-1BBL (BioVision, 5369-100), anti PD1 (Cell Signaling, cat# 86163), anti-His (GenScript, Cat. No. A00186), Conjugado IgG (H + L)-HRP de cabra anti-coelho secundário (R&D, cat# 170-6515), substrato ECL Plus Western Blotting (Pierce, cat# 32132).

[1279] Para o ELISA sanduíche: anticorpo anti 4-1BBL (captura de anticorpo de um par combinado; Abnova# H00008744-AP41), anticorpo biotinilado anti-PD1, proteína estreptavidina, HRP (# 21126, Thermo Scientific), substrato TMB (1-Step™ Solução de substrato Ultra TMB-ELISA, Thermo Scientific #34028).

### *Métodos*

[1280] Análise de Western Blot - As proteínas (50-500 ng por pista) foram tratadas em condições redutoras ou não redutoras (em tampão de carga contendo  $\beta$ -mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos a 95 °C, ou, em tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol sem aquecimento, respectivamente) e separadas em um gel de SDS-PAGE com gradiente de 4 a 20%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF e incubadas com anticorpos primários durante a noite, anti 4-1BBL, anti-PD1 ou anti-His, seguido por 1 hora de incubação com um anticorpo secundário conjugado com HRP. Os sinais foram detectados após o desenvolvimento do ECL.

[1281] ELISA sanduíche - as placas são revestidas com anticorpo de captura anti 4-1BBL (2,5  $\mu$ g/ml em PBS) e bloqueadas em solução de bloqueio (PBS, 1% BSA, 0,005% Tween). As proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, diluídas em série em solução de bloqueio, são aplicadas e incubadas em placas revestidas por 2 horas, seguido de incubação com detecção de anticorpo biotinilado anti-PD1 e subsequente detecção com substrato de estreptavidina-HRP e TMB, de acordo com recomendação do fabricante. As placas são analisadas utilizando um leitor de placas (Thermo Scientific, Multiscan FC) a 450 nm, com referência a 620 nm.

## EXEMPLO 5 – AS VARIANTES DE PD1-4-1BBL LIGAM PDL1 E 4-1BB

### *Análise de ligação da porção PD1 da proteína PD1-4-1BBL a PDL1*

[1282] A ligação do domínio PD1 de PD1-4-1BBL a PDL1 humana foi determinada usando a linha de células DLD1-PDL1 que superexpressam PDL1. As células DLD1-WT serviram como controle negativo. As células foram incubadas com diferentes concentrações das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, seguido por imunocoloração com um anticorpo anti 4-1BBL secundário. A ligação foi analisada por citometria de fluxo.

#### *Materiais*

[1283] DSP105 (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEQ ID NO: 97), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1284] Linhas celulares DLD1-WT e DLD1-PDL1 (Hendriks *et al.* 2016), True stain FCX (Biolegend, cat# 422302), anti 4-1BBL (Biolegend, cat# 311506), isotipo IgG1, k (Biolegend, cat# 400122), anti-PDL1 (Biolegend, cat# 329708), isotipo IgG2b, (Biolegend, cat# 400322).

#### *Métodos*

[1285] As células foram incubadas por 30 minutos em gelo

com diferentes concentrações (0,05-50 µg/ml) das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, seguido por imunomarcação com anticorpos contra 4-1BBL e análise por citometria de fluxo.

#### ***Análise de ligação da fração 4-1BBL da proteína PD1-4-1BBL a 4-1BB***

[1286] A ligação do domínio 4-1BBL de PD1-4-1BBL a 4-1BB humano foi determinada usando a linha de células HT1080-4-1BB que superexpressam 4-1BB. As células HT1080 WT serviram como controle negativo. As células foram incubadas com diferentes diluições das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, seguido por imunocoloração com um anticorpo anti-PD1 secundário. A ligação foi analisada por citometria de fluxo.

#### ***Materiais***

[1287] DSP105 (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEQ ID NO: 97), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1288] Células HT1080 WT e HT1080-4-1BB (Wyzgol *et al.*, 2009), Fixable Viability Dye (BD Biosciences, cat# 562247), True stain FCX (Biolegend, cat# 422302), anti PD1 (Bioledgend cat# 329908), anti 41BB (Bioledgend cat# 309801) isotipo IgG1, K (Bioledgend, cat# 400122).

#### ***Métodos***

[1289] As células foram incubadas por 30 minutos em gelo

com diferentes diluições (1:8-1:1024) das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, seguido por imunocoloração com anticorpos contra PD1 e análise por citometria de fluxo.

### *Resultados*

[1290] Como mostrado na Figura 10A, as células DLD1-PD1 e HT1080-4-1BB expressam os receptores relevantes, PD1 e 41BB, respectivamente. Os ensaios de ligação mostraram que o *DSP105\_V17* marcado com His (SEQ ID NO: 97) se liga a células DLD1-PDL1 e a células HT1080-41BB em um ambiente dependente da dose (Figura 10B). Diferentes diluições do controle sobrenadante (de células não transfectadas) não se ligaram a células HT1080-41BB (Figura 10B). A seguir, os valores GMFI foram usados para criar um gráfico da curva de ligação com um software GraphPad Prism (Figura 10C). Tomados em conjunto, ambos os lados da proteína de fusão *DSP105\_V17* marcada com His (SEQ ID NO: 97), ligam-se às suas contrapartes relevantes sobre-expressas na superfície das células.

### ***Ligação de PD1-4-1BBL a contrapartes PDL1 e 4-1BB humanas, de camundongos e de macacos cynomolgus***

[1291] A ligação das proteínas PD1-4-1BBL às contrapartes PDL1 e 4-1BB é determinada por ensaios de ressonância de plasma de superfície (SPR).

### *Materiais*

[1292] *DSP105* (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), *DSP105* (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), *DSP105* (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), *DSP105* (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), *DSP105* (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), *DSP105\_V17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), *DSP105\_V22* marcado com His (SEQ ID NO: 109), *DSP105\_V17* (SEQ ID NO: 97), *DSP105\_V18* (SEQ ID NO: 101), *DSP105\_V19* (SEQ ID NO: 103), *DSP105\_V20* (SEQ ID NO: 105), *DSP105\_V21* (SEQ ID NO: 107), *DSP\_V22* (SEQ ID NO: 111), *DSP105\_V23* (SEQ ID NO: 113), *DSP105\_V24* (SEQ ID NO: 133), *DSP105\_V25* (SEQ ID NO: 135), *DSP105\_V26* (SEQ ID NO: 137), *DSP105\_V27*

(SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1293] Chip sensor CM5 da série S (GE, cat. # BR100530), kit de captura Ab, hCD47 humano (controle negativo), PDL1 humano, PDL1 de camundongo, cynomolgus PDL1, 4-1BB humano, 4-1BB de camundongo, cynomolgus 4-1BB.

### *Métodos*

[1294] Os ensaios de SPR são realizados usando biossensor Biacore T100 (GE Healthcare). O anticorpo do kit de captura é acoplado a todos os quatro canais de fluxo do chip (Fc1-4), usando o protocolo de acoplamento de amina padrão, conforme recomendado pelo fabricante. A ligação das proteínas PD1-4-1BBL (PDL1 e 4-1BB) ao chip é realizada em HBS-EP + tampão de corrida (HEPES 10 mM pH 7,3, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween20 0,05%): CD47 humano (controle negativo) é carregado no canal de referência Fc1, enquanto Fc2-4 são carregados com as proteínas PDL1 humana, de camundongo e de cynomolgus. Após a regeneração automatizada do chip, o chip é recarregado com o CD47 humano no canal Fc1 e com as proteínas 4-1BB humana, de camundongo e cynomolgus nos canais Fc2-4. Após a ligação das contrapartes, os analitos PD1-4-1BBL são passados por todos os quatro canais. Este processo é repetido iterativamente com várias concentrações de analitos PD1-4-1BBL a uma taxa de fluxo de 50 µl/min. Solução de MgCl<sub>2</sub> 3M é injetada (45 seg a 20 µl/min) no final de cada ciclo, para regenerar a superfície ativa, deslocando as moléculas capturadas. Os parâmetros de ligação são avaliados usando o modelo de ligação cinética 1:1 no software BiaEvaluation v. 3.0.2 (GE Healthcare).

## **EXEMPLO 6 – LIGAÇÃO LATERAL DUPLA - ENSAIO DE POTÊNCIA**

[1295] A ligação de ambos os lados da molécula às suas

contrapartes, ou seja, a ligação de PD1 a PDL1 e a ligação de 4-1BBL a 4-1BB, é testada por um ensaio de potência baseado em ELISA sanduíche. Este ensaio também é usado para comparar as propriedades funcionais dos diferentes lotes de produção.

### *Materiais*

[1296] DSP105 (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEQ ID NO: 97), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima. PDL1 recombinante humana (ACRO Biosystem, A001-214), proteína humana recombinante 4-1BB-Biotina (cat# 41B-H82E3, ACRO Biosystem), Proteína Estreptavidina-HRP (cat# 21126, Thermoscientific), Solução de substrato 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (cat# 34028, Thermoscientific).

### *Métodos*

[1297] PDL1 é ligado à superfície de uma placa de plástico, PD1-4-1BBL é adicionado e pode se ligar ao PDL1 imobilizado. Após a lavagem, o 4-1BB biotinilado é adicionado e pode se ligar ao braço 4-1BBL da molécula. Em seguida, as placas são lavadas e é adicionada estreptavidina HRP. A detecção é efetuada com um substrato TMB de acordo com o protocolo ELISA padrão usando um leitor de placas (Thermo Scientific, Multiscan FC) a 450 nm, com referência a 540 nm.

## **EXEMPLO 7 – ATIVAÇÃO DE 4-1BB PELAS VARIANTES DE PD1-4-1BBL**

[1298] O efeito de ativação do receptor 4-1BB pelas

proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas foi determinado usando células HT1080 ou outra linha celular que está superexpressando o receptor 4-1BB. Especificamente, a linha de células HT1080-4-1BB superexpressa 4-1BB e é conhecida por secretar IL8 após a ligação de 4-1BBL (Wyzgol *et al.*, 2009, *The Journal of Immunology*). Após a ligação de 4-1BBL ao receptor 4-1BB na superfície dessas células, uma via de sinalização é ativada, resultando na secreção de IL8. Para este fim, as células foram incubadas na presença de diferentes concentrações do PD1-4-1BBL produzido com ou sem células que expressam PDL1, e a secreção de IL8 para o meio de cultura foi determinada por ELISA.

### *Materiais*

[1299] DSP105 (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1300] Células HT1080-4-1BB, kit IL-8 ELISA (R&D, cat# D8000C), DMEM (Biological Industries, cat# 01-055-1A), FBS (Rhenium, cat# 10270106), anti 4-1BB (Biolegend, cat# 359810), isotipo IgG1, k (Biolegend, cat# 400122).

### *Métodos*

[1301] Células HT1080-4-1BB (10000 por poço) foram

incubadas por 24 horas em meio com diferentes concentrações das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas. Após a incubação, a concentração de IL8 no sobrenadante foi determinada por um kit IL8 ELISA de acordo com o protocolo do fabricante. As placas foram analisadas usando um leitor de placas (Thermo Scientific, Multiscan FC) a 450 nm, com referência a 540 nm.

### *Resultados*

[1302] Como mostrado na Figura 11, as células HT1080-4-1BB expressam o receptor relevante 4-1BB. Todas as proteínas variantes de DSP105 testadas (DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEQ ID NO: 99) e DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 13) foram capazes de desencadear a sinalização de 4-1BB, conforme determinado pela secreção de IL8 das células HT1080-4-1BB, de maneira dependente da dose em meio contendo FBS (Figura 12).

### **EXEMPLO 8 – O EFEITO DAS VARIANTES DE PD1-4-1BBL NO BLOQUEIO DE LIGAÇÃO DE PDL1**

[1303] A parte PD1 de PD1-4-1BBL é projetada para bloquear a interação de PD1 endógeno expresso em células T com PDL1 expresso em células tumorais. Para este fim, a eficácia das variantes PD1-4-1BBL produzidas como bloqueadores desta interação é avaliada.

### *Materiais*

[1304] DSP105 (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO:

139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO: 143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima.

[1305] PD-1: Par de Ensaio ELISA de Triagem de Inibidor de PDL1 (Acro Biosystems, cat. # EP101), incluindo o seguinte: PDL1 humano recombinante, anticorpo neutralizante anti-hPD1, hPD1 biotinilado.

### *Métodos*

[1306] Placas ELISA são revestidas durante a noite com PDL1 humana recombinante. As placas são lavadas e incubadas por 1 hora com diferentes concentrações das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas ou o anticorpo anti-PD1 de controle positivo. PD1 biotinilado é adicionado seguido por 1 hora adicional de incubação. Após a incubação, a placa é lavada e manchada com Estreptavidina-HRP e substrato TMB de acordo com o protocolo ELISA padrão.

[1307] As placas são analisadas usando um leitor de placas (Thermo Scientific, Multiscan FC) a 450 nm, com referência a 620 nm.

### **EXEMPLO 9 – ATIVAÇÃO DE PBMCs ou CÉLULAS T PELAS VARIANTES DE PD1-4-1BBL**

[1308] A ativação de uma célula T requer dois sinais: ligação do receptor de células T (TCR) com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC)/complexo de peptídeo na célula que apresenta o antígeno (APC) e a reticulação de receptores coestimuladores na célula T com os ligantes correspondentes no APC. 4-1BB é um receptor coestimulador de células T que, após a ligação a 4-1BBL, promove a expansão, sobrevivência, diferenciação e expressão de citocinas de células T CD8+ e CD4+.

[1309] Numerosos métodos são conhecidos na técnica para determinar a ativação de células T, incluindo, mas não se limitando a:

- Expressão de marcadores de ativação na superfície das células T (por exemplo: CD25, CD69, CD62L, CD137, CD107a, PD1 etc.). A

expressão de marcadores de ativação é testada pela coloração das células com anticorpos específicos e análise de citometria de fluxo (FACS).

- Secreção de citocinas inflamatórias (por exemplo: IL2, IL6, IL8, INF gama etc.). A secreção de citocinas inflamatórias é testada por ELISA.

- Proliferação, medida por pré-coloração de células T com CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster) ou outros corantes de proliferação celular e determinação do desvio de células por diluição de CFSE que é determinado por FACS. A proliferação também é determinada em uma máquina Incucyte, tirando fotos com o tempo e analisando as fotos com um software específico.

- Extermínio de uma célula alvo, por exemplo célula cancerosa que é medida por pré-marcação das células cancerosas usando o reagente Calcine-AM e medindo a liberação de Calcine no meio de cultura usando o leitor de placas de luminescência. O extermínio também é determinado por uma máquina Incucyte usando células alvo marcadas e substrato fluorescente sensível a caspase.

[1310] Para este fim, o efeito das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas no aumento de células T humanas ou ativação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) é avaliado.

### *Materiais*

[1311] DSP105 (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), DSP105 (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), DSP105 (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), DSP105 (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), DSP105\_V17 marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), DSP105\_V22 marcado com His (SEQ ID NO: 109), DSP105\_V17 (SEC ID NO: 97), DSP105\_V18 (SEQ ID NO: 101), DSP105\_V19 (SEQ ID NO: 103), DSP105\_V20 (SEQ ID NO: 105), DSP105\_V21 (SEQ ID NO: 107), DSP\_V22 (SEQ ID NO: 111), DSP105\_V23 (SEQ ID NO: 113), DSP105\_V24 (SEQ ID NO: 133), DSP105\_V25 (SEQ ID NO: 135), DSP105\_V26 (SEQ ID NO: 137), DSP105\_V27 (SEQ ID NO: 139), DSP105\_V28 (SEQ ID NO: 141), DSP105\_V29 (SEQ ID NO:

143), DSP105\_V30 (SEQ ID NO: 145) e DSP105\_V31 (SEQ ID NO: 147), produzido conforme descrito no Exemplo 2 acima. Ficoll-Paque (GE Healthcare, cat# 17-1440-03), CD3 anti-humano purificado por folha (BioLegend, cat# BLG-317315), IL-2 humana recombinante (Biolegend, cat# 589106), anti CD27, anti CD25, CD69, CD107a, CD137, anticorpos PD1, Kit de isolamento de células T humanas EasySep Direct (Stemcell, cat# 19661), Dinabeads  $\alpha$ CD3/CD28 (Thermo, cat# Dy-11131D), kit ELISA IFN $\gamma$  (Peprotech, cat# 900-TM27), CFSE.

### *Métodos*

[1312] PBMCs humanos são isolados de sangue periférico de doadores saudáveis usando o método Ficoll-Paque (Grienvic *et al.* 2016 Biopreserv Biobank. 14 (5): 410-415), e células T são ainda isoladas por esferas magnéticas de seleção negativa. Após o isolamento, as células são cultivadas com adição de diferentes concentrações das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, na presença de concentrações subótimas de anti-CD3 (30 ng/ml) ou IL-2 (1000 U/ml) ou anti-CD3 mais IL-2, ou dinabeads  $\alpha$ CD3/CD28 (1:10 grânulos por célula). As células são cultivadas por 1-7 dias com ou sem a presença de células que expressam PDL1 ou em placas revestidas com PDL1. A secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN $\gamma$ , para o meio de cultura é medida por ELISA. A proliferação é determinada pelo Sistema de Análise de Células Vivas IncuCyte® S3 (IncuCyte), ou usando CFSE, de acordo com o protocolo do fabricante. As células são ainda testadas para marcadores de ativação CD25, CD69, CD107a, CD137 (4-1BB), PD1, expressão de superfície em diferentes pontos de tempo, por citometria de fluxo. O extermínio é avaliado pela liberação do Calcein AM ou pela máquina Incucyte de acordo com o protocolo do fabricante.

### **EXEMPLO 10 – O EFEITO ANTI-TUMOR *IN-VIVO* DAS VARIANTES DE PD1-4-1BBL**

[1313] Três modelos diferentes de camundongos *in vivo* são usados para testar a eficácia de PD1-4-1BBL no tratamento do câncer:

1. Camundongos NSG inoculados com células-tronco humanas ou com PBMCs humanos ou com PBMCs humanos imobilizados e com células tumorais humanas. Neste modelo, PD1-4-1BBL interage com PDL1 humano (expresso no tumor e nas células imunes) e com 4-1BB em células T humanas.

2. C57BL/6 - camundongos knock-in 4-1BB humano inoculados com carcinoma do cólon de camundongo MC38 ou outra linha de células cancerosas ou com linha de células cancerosas que superexpressam o PDL1 humano. Neste modelo, o domínio extracelular de 4-1BB de camundongo é substituído por aquele de um 4-1BB humano, de modo que PD1-4-1BBL pode interagir com o 4-1BB humano expresso em células T de camundongo. PD1-4-1BBL interage com camundongo e com PDL1 humano expresso nas células tumorais.

3. Modelos de tumor singênico de camundongo que expressam PDL1 de camundongo. Nestes modelos, PD1-4-1BBL interage com PDL1 de camundongo nas células tumorais.

### *Métodos*

[1314] Em todos os três modelos, os camundongos são inoculados com células tumorais por via intravenosa (IV), intraperitoneal (IP), subcutânea (SC) ou ortotopicamente. Uma vez que o tumor é palpável (~ 80 mm<sup>3</sup>), os camundongos são tratados IV, IP, SC ou ortotopicamente, com diferentes doses e diferentes regimes das proteínas de fusão PD1-4-1BBL produzidas, por exemplo *DSP105* (HEK-NH) (SEQ ID NO: 1), *DSP105* (CHO-NH) (SEQ ID NO: 1), *DSP105* (CHO-NH)-V1 (SEQ ID NO: 13), *DSP105* (CHO-NH)-V2 (SEQ ID NO: 15), *DSP105* (CHO-NH)-V3 (SEQ ID NO: 17), *DSP105\_V17* marcado com His N-terminal (SEQ ID NO: 99), *DSP105\_V22* marcado com His (SEQ ID NO: 109), *DSP105\_V17* (SEQ ID NO: 99), *DSP105\_V18* (SEQ ID NO: 101), *DSP105\_V19* (SEQ ID NO: 103), *DSP105\_V20* (SEQ ID NO: 105), *DSP105\_V21* (SEQ ID NO: 107), *DSP\_V22* (SEQ ID NO: 111), *DSP105\_V23* (SEQ ID NO: 113), *DSP105\_V24* (SEQ ID NO: 133), *DSP105\_V25* (SEQ ID NO: 135), *DSP105\_V26* (SEQ ID NO: 137), *DSP105\_V27* (SEQ ID NO: 139), *DSP105\_V28* (SEQ ID NO: 141), *DSP105\_V29* (SEQ ID NO: 143), *DSP105\_V30* (SEQ ID NO: 145) e *DSP105\_V31* (SEQ ID NO: 147).

[1315] Os camundongos são seguidos para pesos e sinais clínicos. Os tumores são medidos algumas vezes por semana por um compasso; e o volume do tumor é calculado de acordo com a seguinte equação:  $V = \text{comprimento} \times \text{largura}^2 / 2$ . O peso dos camundongos é medido rotineiramente. O crescimento do tumor e a sobrevivência são monitorados durante todo o experimento.

[1316] A infiltração e a subtipagem de células imunes no tumor são testadas pela ressecção do tumor ou drenagem dos gânglios linfáticos, digestão e fenotipagem imunológica usando coloração de anticorpos específicos e análise de citometria de fluxo. Adicionalmente ou alternativamente, a infiltração de células imunes ou grau de necrose de tumores é determinada por ressecção dos tumores, inclusão em parafina e corte para coloração imunohistoquímica com anticorpos específicos.

[1317] No sacrifício, os órgãos dos camundongos são colhidos e incluídos em blocos de parafina para coloração de H&E e IHC.

[1318] Amostras de sangue são retiradas de camundongos em diferentes pontos de tempo, de acordo com procedimentos comuns, para os seguintes testes: análise de PK, medições de citocinas no plasma, perfil FACS de subpopulações de células sanguíneas em circulação, teste de hematologia, teste de química sérica, análise de anticorpo anti-droga (ADA) e análise de anticorpos neutralizantes (NAB).

[1319] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com suas modalidades específicas, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão evidentes para os versados na técnica. Consequentemente, pretende-se abranger todas essas alternativas, modificações e variações que se enquadram no espírito e no amplo escopo das reivindicações anexas.

[1320] Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados em sua totalidade por referência ao relatório descritivo, na mesma extensão como se

cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado aqui por referência. Além disso, a citação ou identificação de qualquer referência neste pedido não deve ser interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível como estado da técnica à presente invenção. Na medida em que os títulos das seções são usados, eles não devem ser interpretados como necessariamente limitantes.

[1321] Além disso, qualquer/quaisquer documento(s) de prioridade deste pedido é/são aqui incorporado(s) por referência em sua(s) totalidade(s).

## **REIVINDICAÇÕES**

**1. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL, caracterizada pelo fato de que** compreende uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2, ou tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117 e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondente à SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondente ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e/ou em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL:

(aa) tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreende um segmento de aminoácido G198-E205 correspondente à SEQ ID NO: 3, tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreende um segmento de aminoácido A1-E23 correspondente à SEQ ID NO: 3 ou tem 184 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 123; e/ou

(bb) compreende três repetições de uma sequência de aminoácidos 4-1BBL;

e em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

**2. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL, caracterizada pelo fato de que** compreende uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos PD1:

(a) tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e/ou

(b) compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondente ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e/ou em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 22-25; e em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

(i) ligar PDL1 e 4-1BB;

(ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou

(iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

**3. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL caracterizada pelo fato de que** compreende uma sequência de aminoácidos PD1 e uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo

que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e/ou em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar PDL1 e 4-1BB;
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

**4. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL, caracterizada pelo fato de que** compreende um ligante (GGGGS)<sub>n</sub> (n = 1-4) entre o referido PD1 e o referido 4-1BBL, em que a referida proteína de fusão é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar PDL1 e 4-1BB;
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

**5. POLIPEPTÍDEO ISOLADO, caracterizado pelo fato de que** compreende uma sequência de aminoácidos PD1, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89, 93 e 115 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2, ou tem 138-145 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18, 117

e 119 e não compreende um segmento de aminoácido F146-V150 correspondente à SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondente ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e em que o referido polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

**6. POLIPEPTÍDEO ISOLADO, *caracterizado pelo fato de que*** compreende uma sequência de aminoácidos PD1, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21, 85, 89 e 93 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e opcionalmente compreende uma modificação de aminoácido de C para S em uma posição correspondente ao aminoácido 73 de SEQ ID NO: 2; e em que o referido polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

**7. POLIPEPTÍDEO ISOLADO, *caracterizado pelo fato de que*** compreende uma sequência de aminoácidos PD1, em que a referida sequência de aminoácidos PD1 tem 123-148 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 18-21 e não compreende nenhum dos segmentos de aminoácidos P1-L5 e F146-V150 correspondentes à SEQ ID NO: 2; e em que o referido polipeptídeo é capaz de ligar PDL1.

**8. POLIPEPTÍDEO ISOLADO, *caracterizado pelo fato de que*** compreende uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25, tem 170-197 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 127 e 129 e não compreende um segmento de aminoácido G198-E205

correspondente à SEQ ID NO: 3, ou tem 170-182 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 80% de identidade com a SEQ ID NO: 125 e não compreende um segmento de aminoácido A1-E23 correspondente à SEQ ID NO: 3; e opcionalmente compreende três repetições da referida sequência de aminoácidos 4-1BBL; e em que o referido polipeptídeo é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar 4-1BB;
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

**9. POLIPEPTÍDEO ISOLADO, *caracterizado pelo fato de que*** compreende uma sequência de aminoácidos 4-1BBL, em que a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL tem 185-202 aminoácidos de comprimento tendo pelo menos 95% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 22-25; e em que o referido polipeptídeo é capaz de pelo menos um de:

- (i) ligar 4-1BB;
- (ii) ativar a referida via de sinalização 4-1BB em uma célula que expressa o referido 4-1BB; e/ou
- (iii) coestimular células imunes que expressam o referido 4-1BB.

**10. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, ou **POLIPEPTÍDEO ISOLADO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 5 a 7, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos PD1 não tem mais do que 140 aminoácidos de comprimento.

**11. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7 e 10,

***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos PD1 tem pelo menos 126 aminoácidos de comprimento.

**12. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 5, 10 ou 11, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos PD1 compreende a referida SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 ou 115.

**13. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, de 4 a 6, 10 ou 11, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos PD1 compreende a SEQ ID NO: 75, 83, 87, 91 ou 95.

**14. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 5, 10 ou 11, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos PD1 consiste na referida SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 85, 89, 93 ou 115.

**15. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, de 4 a 6, 10 ou 11, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos PD1 consiste na SEQ ID NO: 75, 79, 81, 83, 87, 91 ou 95.

**16. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 4 ou de 8 a 15, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL não compreende nenhum dos resíduos de aminoácidos A1-V6 ou A1-G14 correspondentes à SEQ ID NO: 3.

**17. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 4 ou de 8 a 16, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL compreende a referida SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

**18. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4 ou de 8 a 16,

**caracterizado(a) pelo fato de que** a referida sequência de aminoácidos 4-1BBL consiste na referida SEQ ID NO: 22, 23, 24 ou 25.

**19. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 ou de 10 a 18, **caracterizada pelo fato de que** a proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende um ligante entre o referido PD1 e o referido 4-1BBL.

**20. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 8 ou de 10 a 18, **caracterizado(a) pelo fato de que** compreende um ligante entre cada uma das referidas três repetições da referida sequência de aminoácidos 4-1BBL.

**21. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 ou 20, **caracterizado(a) pelo fato de que** o ligante é um ligante de aminoácido único.

**22. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado(a) pelo fato de que** o ligante é glicina.

**23. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizada pelo fato de que** o ligante é um domínio Fc de um anticorpo ou um fragmento do mesmo.

**24. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 ou 20, **caracterizado(a) pelo fato de que** o ligante é um ligante (GGGGS)<sub>n</sub> (n = 1-4).

**25. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4 ou de 10 a 24, **caracterizada pelo fato de que** o rendimento de produção da referida proteína de fusão é pelo menos 1,5 vezes maior do que o rendimento de produção de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção, as referidas condições de produção compreendem a expressão em uma célula de mamífero e cultura a 32-37 °C, 5-10% de CO<sub>2</sub> por 5-13 dias.

**26. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4 ou de 10 a 24, ***caracterizada pelo fato de que*** a quantidade de agregados da referida proteína de fusão é pelo menos 20% menor do que a quantidade de agregados de SEQ ID NO: 5 sob as mesmas condições de produção, os referidos agregados têm pelo menos 300 kDa de peso molecular e as referidas condições de produção compreendem a expressão em uma célula de mamífero e cultura a 32-37 °C, 5-10% de CO<sub>2</sub> por 5-13 dias.

**27. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 19, 25 ou 26, ***caracterizada pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

**28. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8 ou de 10 a 27, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida pelo menos 80% de identidade compreende pelo menos 90% de identidade.

**29. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL** ou polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8 ou de 10 a 27, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida pelo menos 80% de identidade compreende pelo menos 95% de identidade.

**30. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, de 10 a 19 ou de 25 a 29, ***caracterizada pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

**31. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, de 10 a 19 ou de 25 a 29, ***caracterizada pelo fato de que*** a referida sequência de aminoácidos da proteína de fusão PD1-4-1BBL consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 12, 14, 16, 44-56, 97, 101, 103, 105, 107, 111, 113, 133, 135, 137, 139, 141, 143 e 147.

**32. POLINUCLEOTÍDEO**, ***caracterizado pelo fato de que*** codifica a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 31.

**33. CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO**, ***caracterizado pelo fato de que*** compreende o polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 32, e um elemento regulador para direcionar a expressão do referido polinucleotídeo em uma célula hospedeira.

**34. CÉLULA HOSPEDEIRA**, ***caracterizada pelo fato de que*** compreende a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 31 ou o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 32 ou 33.

**35. MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL OU UM POLIPEPTÍDEO**, o método ***caracterizado pelo fato de que*** compreende expressar em uma célula hospedeira o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 32 ou 33.

**36. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 35, ***caracterizado pelo fato de que*** compreende isolar a proteína de fusão ou o polipeptídeo.

**37. MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA DOENÇA** que pode se beneficiar da ativação de células imunes, ***caracterizado pelo fato de que*** compreende administrar a um indivíduo em necessidade do mesmo a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado conforme definidos em

qualquer uma das reivindicações de 1 a 31, o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 32 ou 33, ou a célula hospedeira conforme definida na reivindicação 34.

**38. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 37, ***caracterizado pelo fato de que*** compreende ainda administrar ao referido indivíduo um agente terapêutico para o tratamento da referida doença.

**39. PROTEÍNA DE FUSÃO PD1-4-1BBL OU POLIPEPTÍDEO ISOLADO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 31, polinucleotídeo ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32 ou 33, ou célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 34, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** é para uso no tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes.

**40. COMPOSIÇÃO PARA USO**, de acordo com a reivindicação 39, ***caracterizada pelo fato de que*** compreende ainda um agente terapêutico para o tratamento da referida doença.

**41. ARTIGO DE FABRICAÇÃO, *caracterizado pelo fato de que*** compreende um material de embalagem que acondiciona um agente terapêutico para o tratamento de uma doença que pode se beneficiar da ativação de células imunes; e a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 31, o polinucleotídeo ou o construto de ácido nucleico conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 32 ou 33 ou a célula hospedeira conforme definida na reivindicação 34.

**42. MÉTODO**, composição para uso ou artigo de fabricação, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 41, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** as células da referida doença expressam PDL1.

**43. MÉTODO, COMPOSIÇÃO PARA USO OU ARTIGO DE FABRICAÇÃO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 42, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida doença compreende uma doença hiperproliferativa.

**44. MÉTODO, COMPOSIÇÃO PARA USO OU ARTIGO DE FABRICAÇÃO**, de acordo com a reivindicação 43, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida doença hiperproliferativa compreende câncer.

**45. MÉTODO, COMPOSIÇÃO PARA USO OU ARTIGO DE FABRICAÇÃO**, de acordo com a reivindicação 44, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** o referido câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em linfoma, leucemia e carcinoma.

**46. MÉTODO, COMPOSIÇÃO PARA USO OU ARTIGO DE FABRICAÇÃO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 37 a 42, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** a referida doença compreende uma doença associada à imunossupressão ou imunossupressão induzida por medicamento ou uma infecção.

**47. MÉTODO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES**, o método ***caracterizado pelo fato de que*** compreende a ativação *in vitro* de células imunes na presença da proteína de fusão PD1-4-1BBL ou do polipeptídeo isolado, conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 31, do polinucleotídeo ou do construto de ácido nucleico conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 32 e 33 ou da célula hospedeira conforme definida na reivindicação 34.

**48. MÉTODO**, de acordo com a reivindicação 47, ***caracterizado pelo fato de que*** a referida ativação é na presença de células que expressam PDL1 ou PDL1 exógena.

**49. MÉTODO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 ou 48, ***caracterizado pelo fato de que*** a referida ativação é na presença de um agente anticâncer.

**50. MÉTODO, COMPOSIÇÃO PARA USO OU ARTIGO DE FABRICAÇÃO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38, de 40 a 46 ou 49, ***caracterizado(a) pelo fato de que*** o referido agente terapêutico para o tratamento da referida doença ou o referido agente anticâncer compreende um anticorpo.

**FIGURA 1**

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG**HHHHHH**PGWFLDSPDRPWNPPPTFS  
 PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAF  
 PEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAI  
 SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV  
 GACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF  
 AQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA  
 KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA  
 LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH  
 AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE

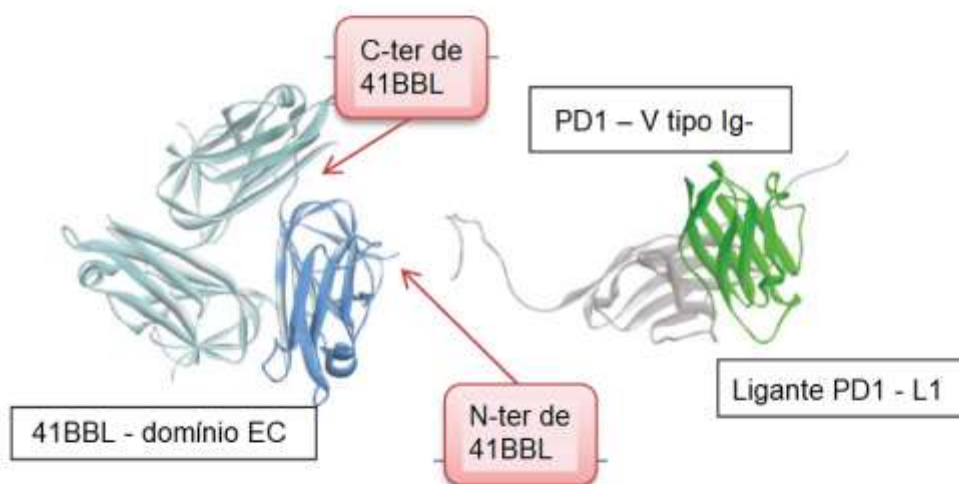
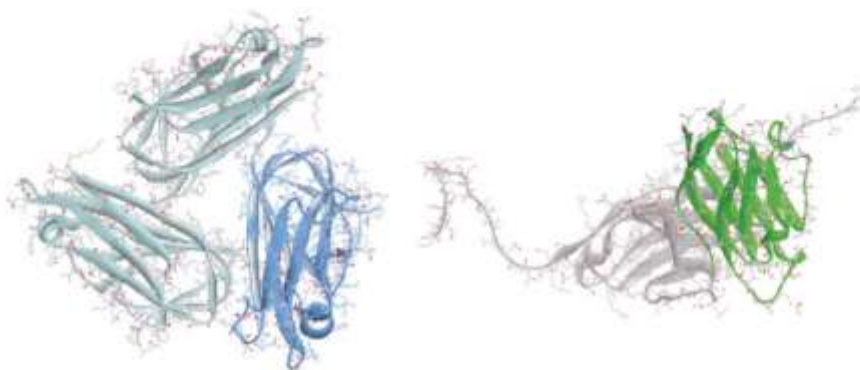
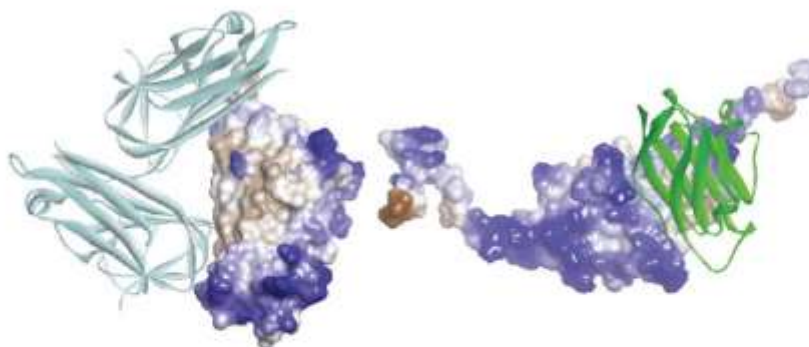
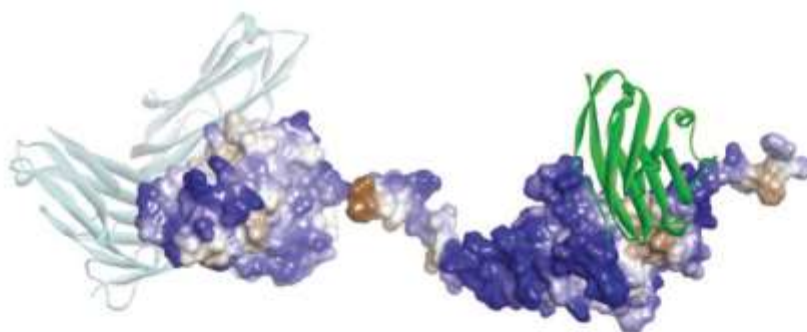
**FIGURA 2A****FIGURA 2B**

**FIGURA 2C****FIGURA 2D****FIGURA 3**

PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFED  
 RSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTEERRAE  
 VPTAHPSPSPRPAGQFQTLVGACPWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDOPAGLLDLRQGMFA  
 QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGS  
 GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR  
 HANQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE

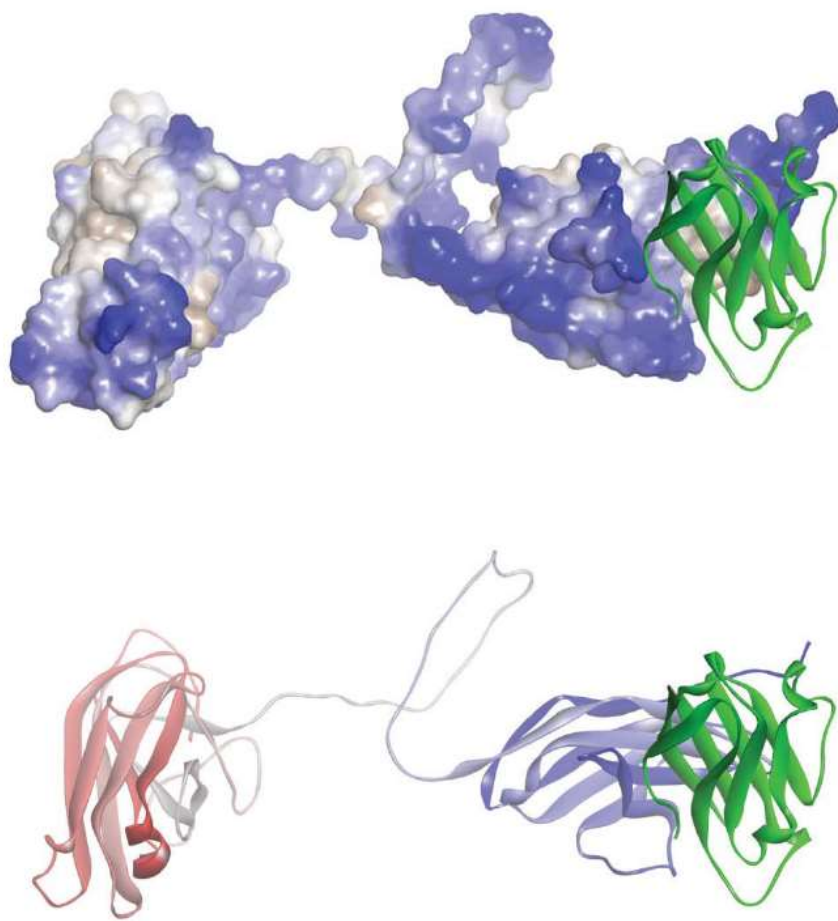
**FIGURA 4**

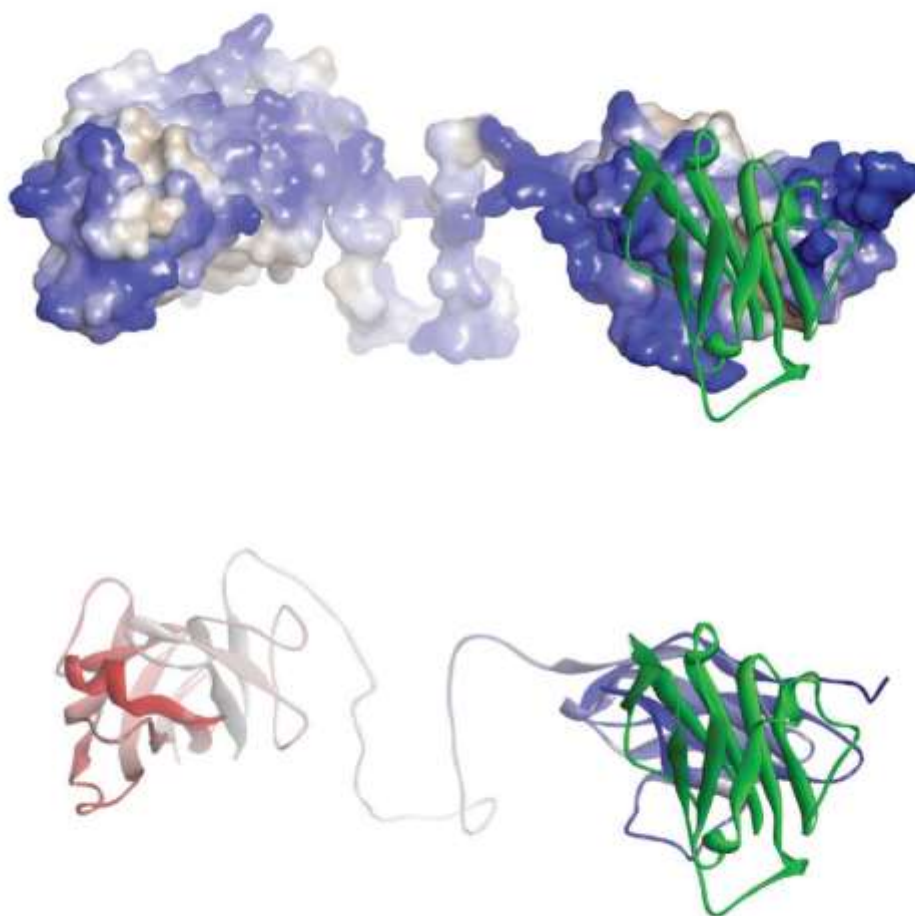
**FIGURA 5**

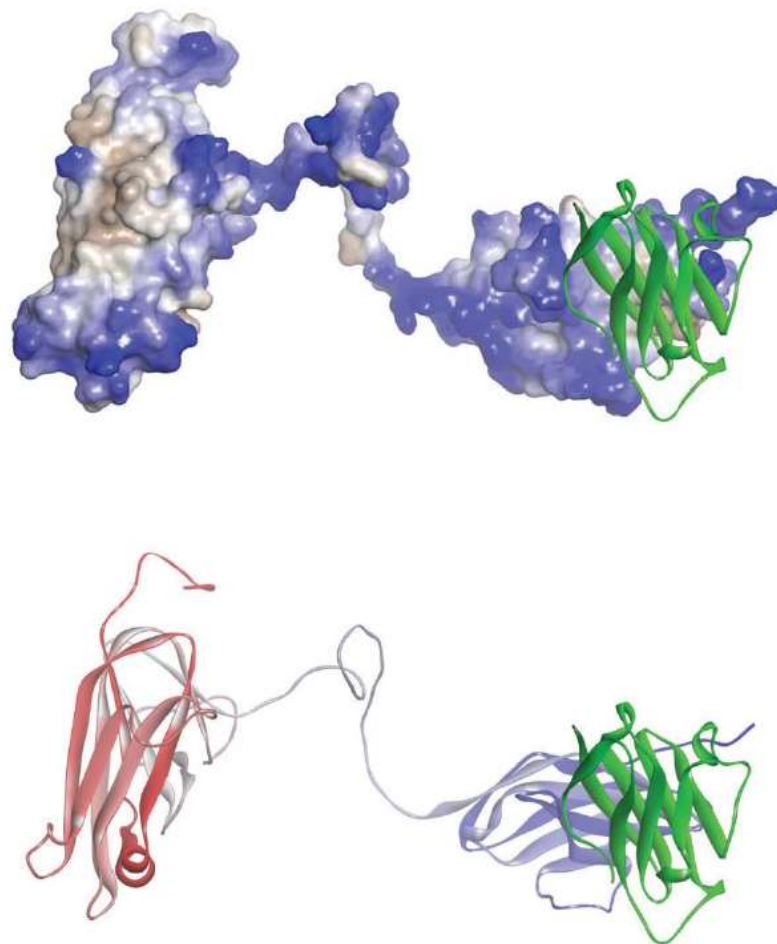
**FIGURA 6**

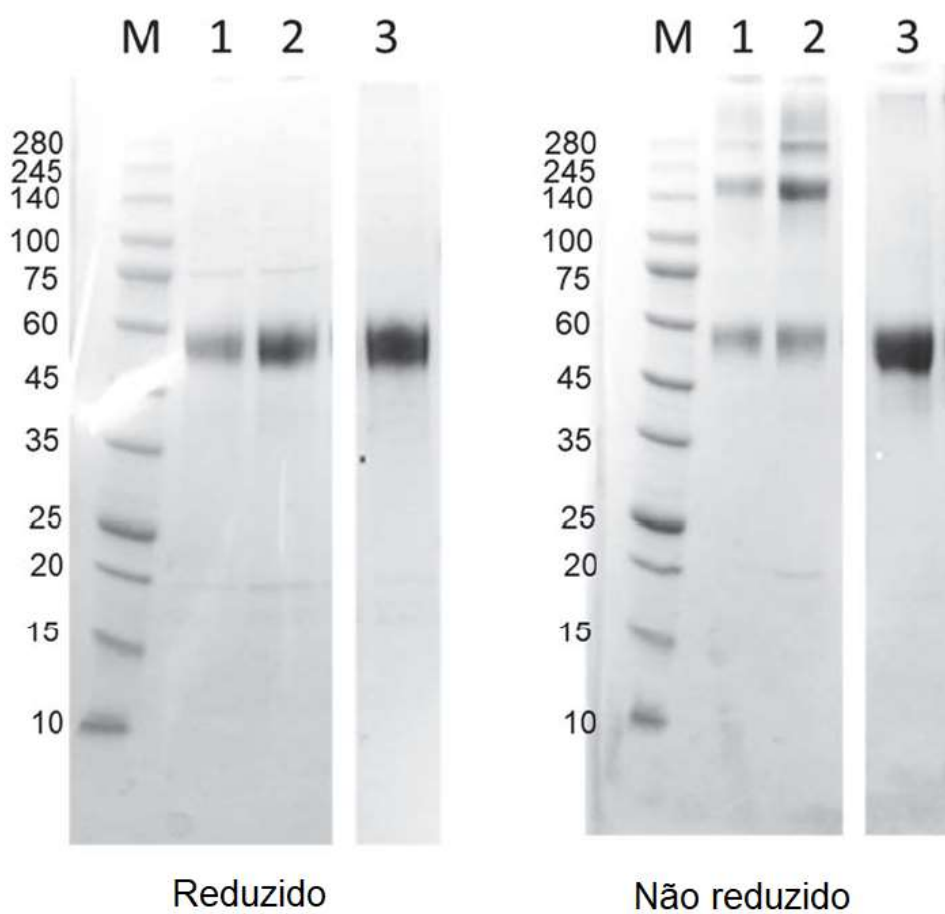
**FIGURA 7**

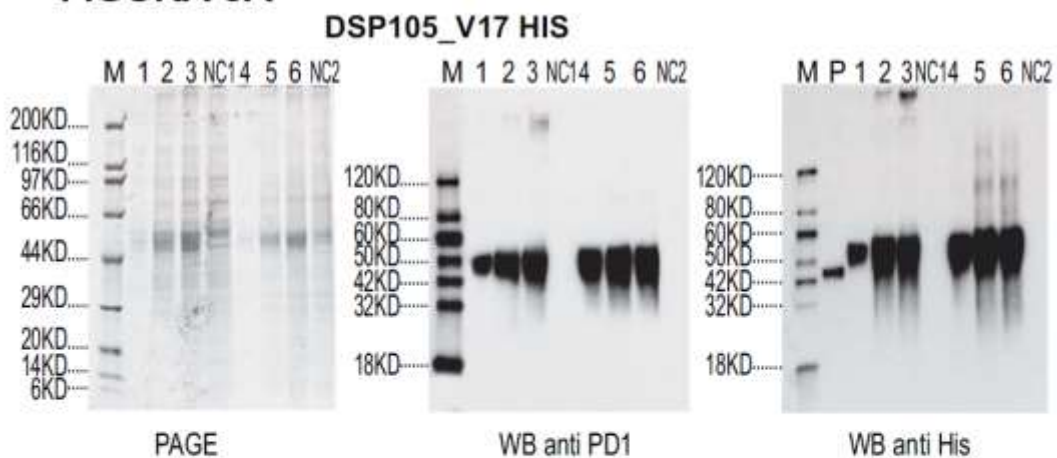
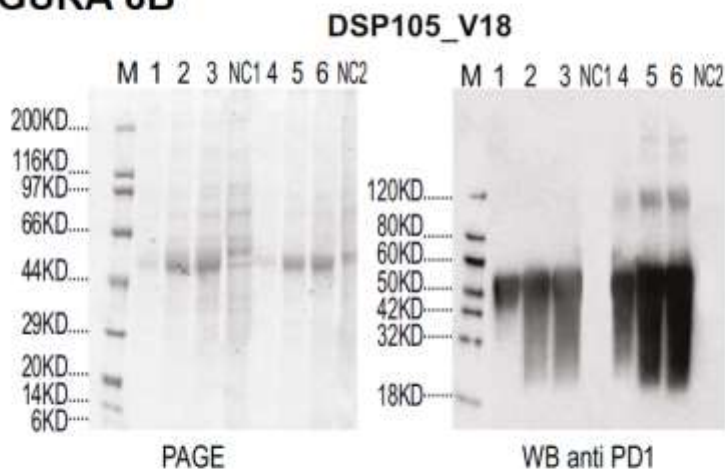
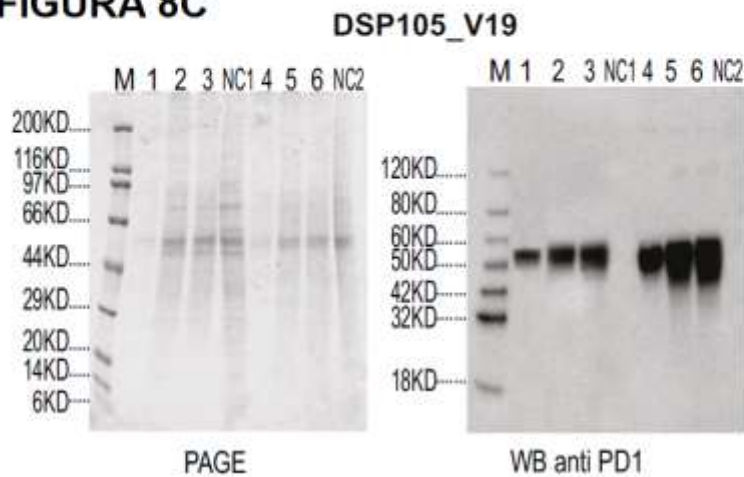
**FIGURA 8A****FIGURA 8B****FIGURA 8C**

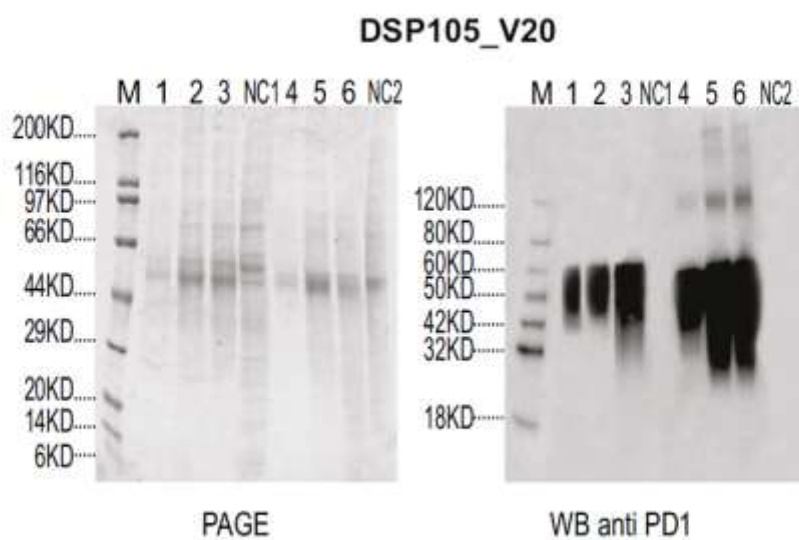
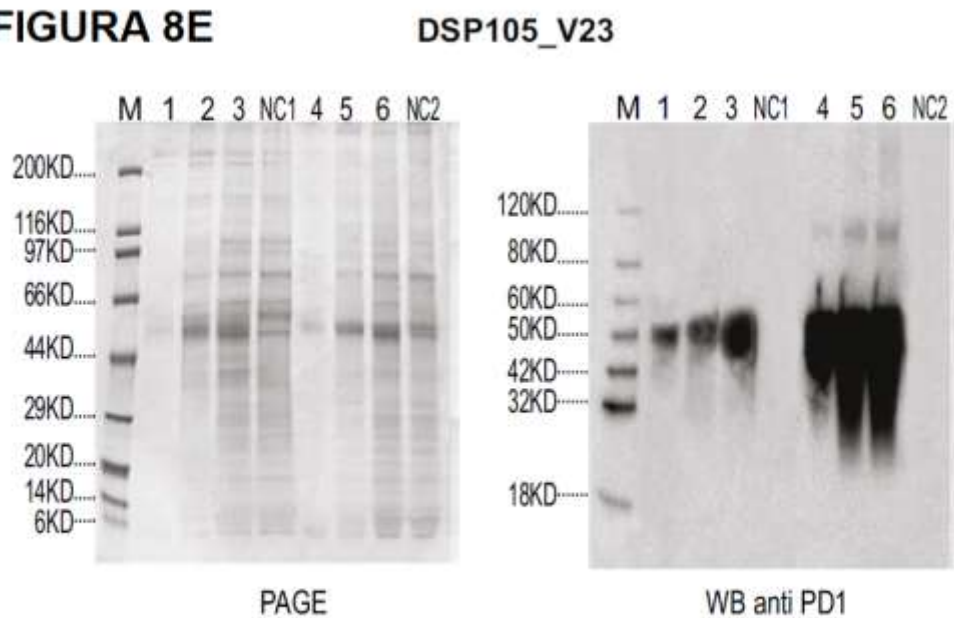
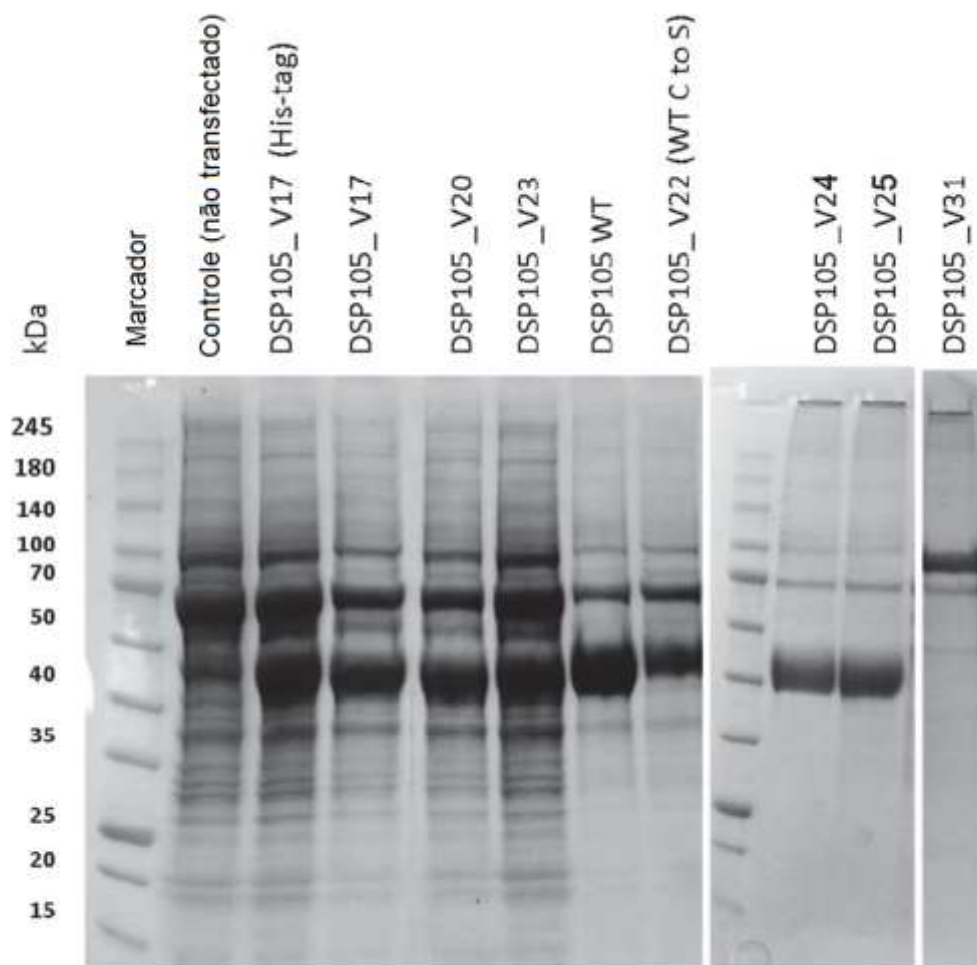
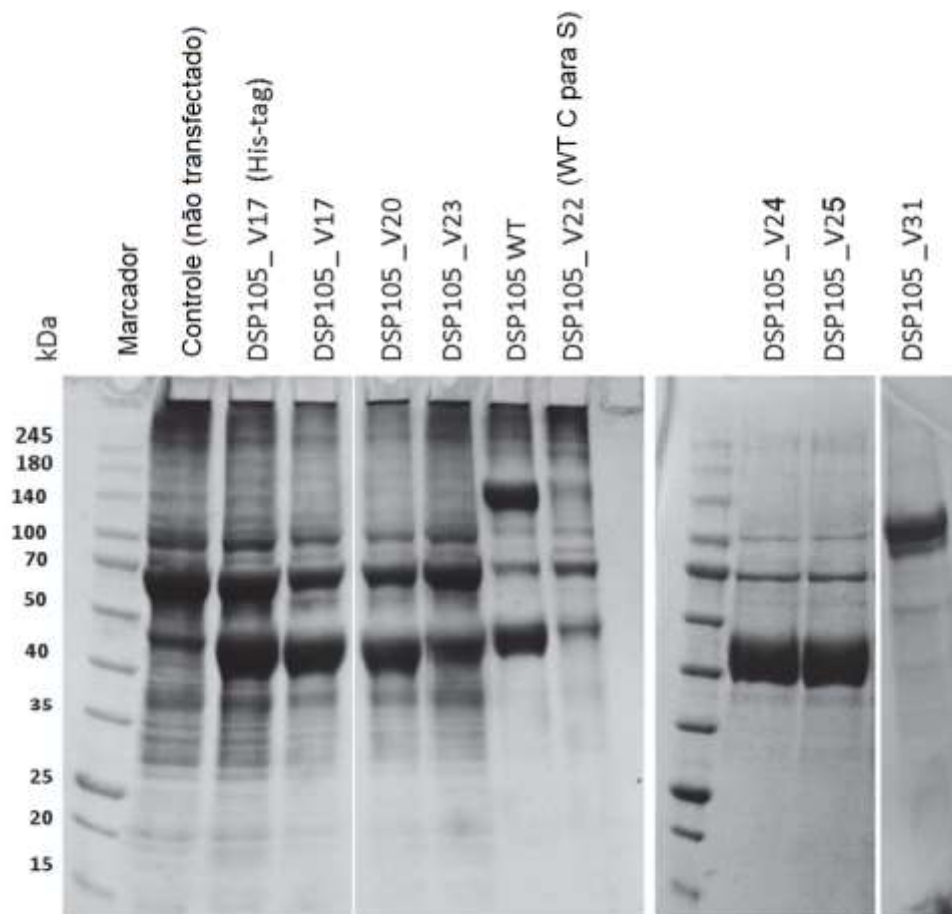
**FIGURA 8D****FIGURA 8E**

**FIGURA 9A**

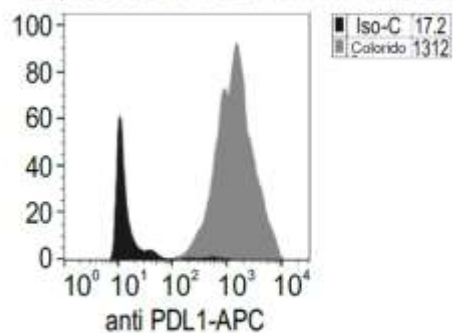
Reduzido

**FIGURA 9B**

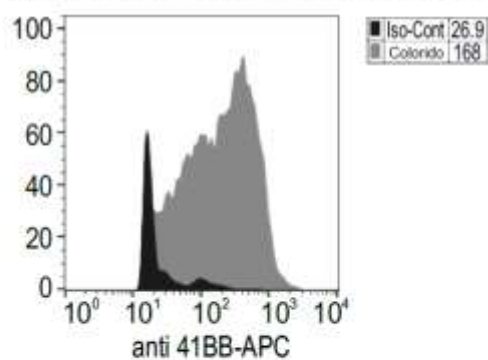
Não Reduzido

**FIGURA 10A**

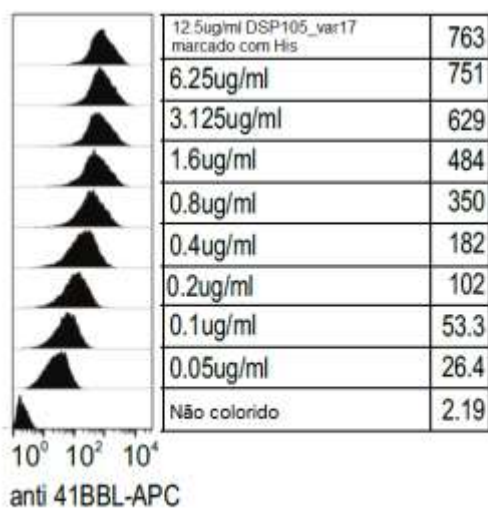
Expressão de PDL1 em células DLD1-PDL1



Expressão de 41BB em células HT1080-41BB

**FIGURA 10B**

Ligação de DSP105\_var17 marcado com His a células DLD1-PDL1



Ligação de DSP105\_var17 marcado com His a células HT1080-41BB

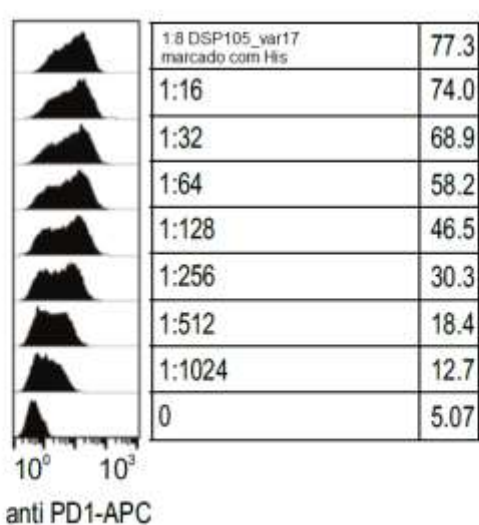
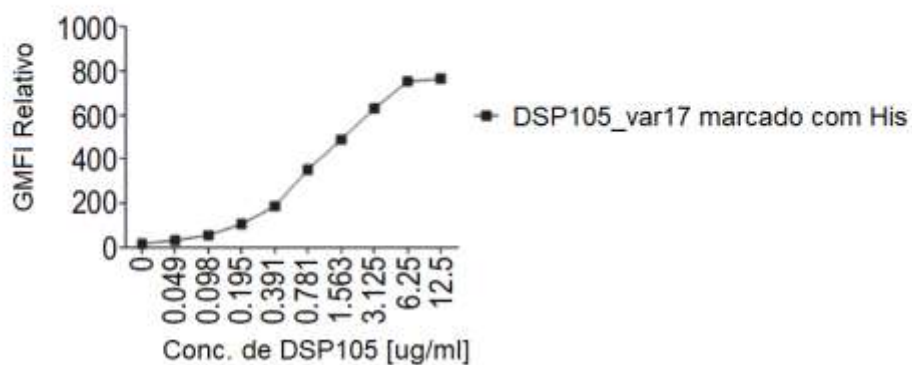
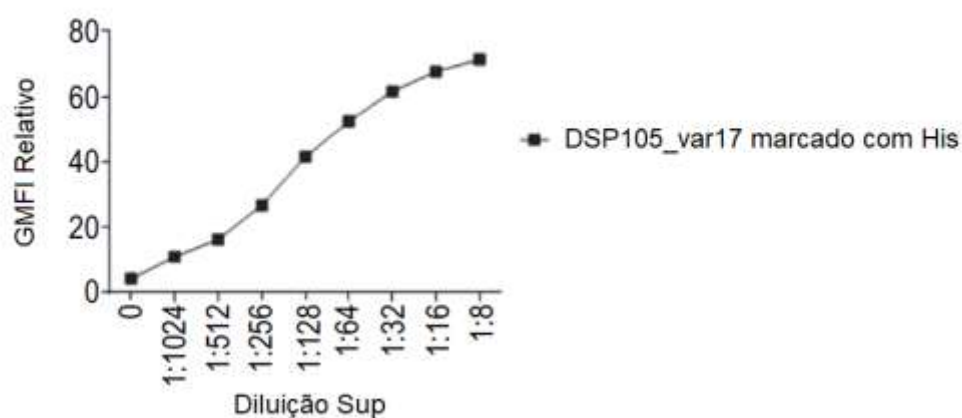


**FIGURA 10C**

Apresentação gráfica da ligação de DSP105\_var17  
marcado com His a células DLD1-PDL1



Apresentação gráfica da ligação de DSP105\_var17  
marcado com His a células HT1080-41BB

**FIGURA 11**

Expressão de 41BB em células HT1080-41BB

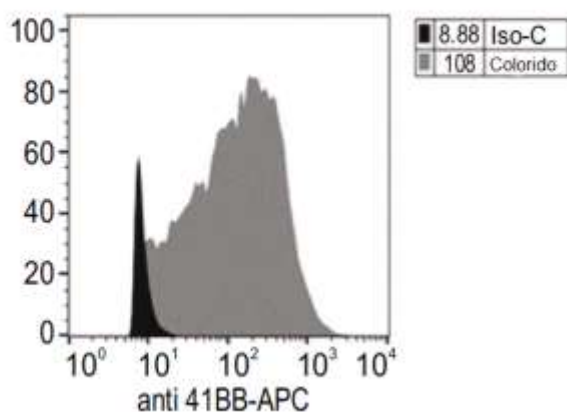


**FIGURA 12**

Ativação de 41BB por Ligação de Variantes de DSP105

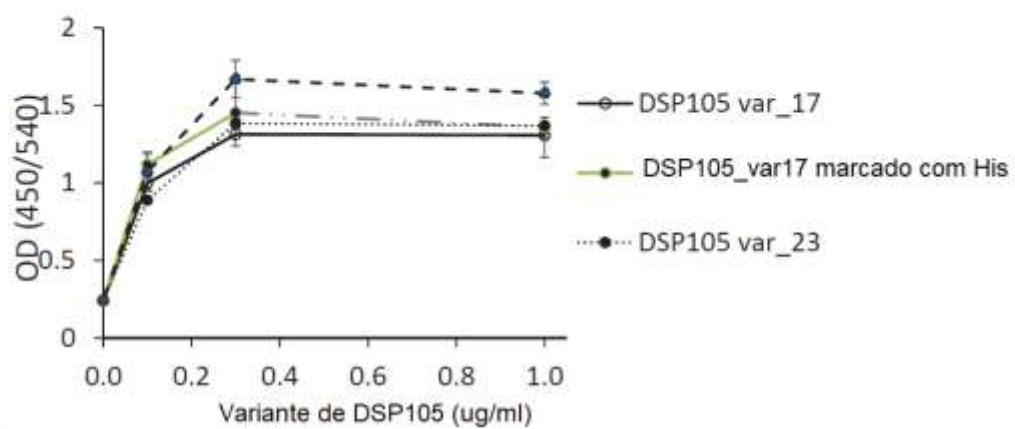
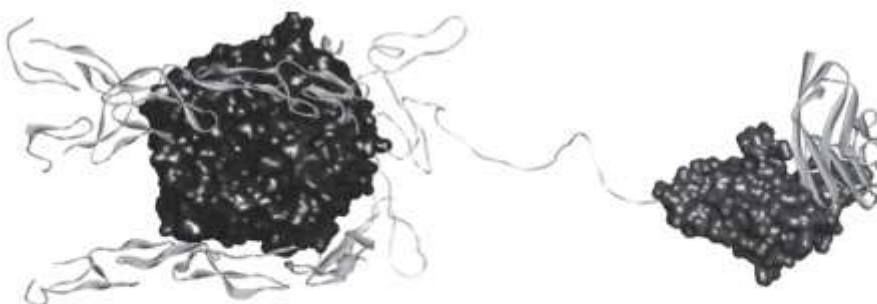
**FIGURA 13A**

**FIGURA 13B****FIGURA 13C****FIGURA 13D**

**RESUMO**

**“PROTEÍNA DE FUSÃO VARIANTE PD1-4-1BBL E MÉTODOS DE USO DA MESMA”**, todos fornecidos na presente invenção; assim como também são fornecidos polipeptídeos isolados que compreendem uma variante de PD1 ou uma variante de 4-1BBL, e polinucleotídeos e construtos de ácido nucleico que codificam a proteína de fusão PD1-4-1BBL ou o polipeptídeo isolado, células hospedeiras que expressam os mesmos e métodos de uso dos mesmos.