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

(21) BR 112020023167-3 A2

(22) Data do Depósito: 14/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 09/02/2021

(54) Título: POLIPEPTÍDEOS DE CITOCINA ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DESTES

(51) Int. Cl.: C07K 14/55; A61K 38/00; C07K 19/00.

(30) Prioridade Unionista: 06/11/2018 US 62/756,504; 06/11/2018 US 62/756,507; 06/11/2018 US 62/756,515; 14/05/2018 US 62/671,225.

(71) Depositante(es): WEREWOLF THERAPEUTICS, INC..

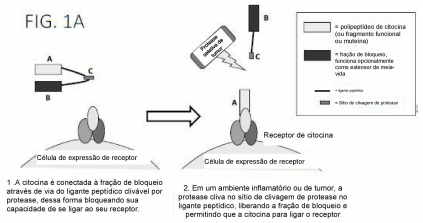
(72) Inventor(es): WILLIAM WINSTON; DANIEL HICKLIN; VINAY BHASKAR; LUKE EVNIN; PATRICK BAEUERLE; JOSE ANDRES SALMERON GARCIA; HEATHER BRODKIN; SHUOYEN JACK LIN; HOLGER WESCHE; CYNTHIA SEIDEL-DUGAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2019032320 de 14/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/222294 de 21/11/2019

(85) Data da Fase Nacional: 12/11/2020

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEOS DE CITOCINA ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DESTES". A divulgação apresenta proteínas de fusão que são variantes condicionalmente ativas de uma citocina de interesse. Em um aspecto, os polipeptídeos de comprimento total da invenção têm atividade de ativação do receptor de citocina reduzida ou mínima, embora contenham um polipeptídeo de citocina funcional. Após a ativação, por exemplo, por clivagem, de um ligante que se une a uma fração de bloqueio, por exemplo, um polipeptídeo de bloqueio estérico, em sequência à citocina ativa, a citocina pode ligar seu receptor e efetuar a sinalização. Normalmente, as proteínas de fusão compreendem ainda um elemento de prolongamento da meia-vida in vivo, que pode ser clivado a partir da citocina no microambiente tumoral.



“POLIPEPTÍDEOS DE CITOCINA ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DESTES”

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 62/671,225, depositado em 14 de maio de 2018, Pedido Provisório dos US No. 62/756,504, apresentado em 6 de novembro de 2018, Pedido Provisório US No. 62/756,515, apresentado em 6 de novembro 2018, e o Pedido Provisório US No. 62/756,507, depositado em 6 de novembro de 2018.Os ensinamentos completos dos pedidos acima são incorporados neste documento por referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequência, que foi submetida eletronicamente no formato ASCII e está incorporada neste documento a título de referência em sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 14 de maio de 2019, é denominada 105365-0020_SL.txt e tem um tamanho de 866.384 bytes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] O desenvolvimento de células linfoides imunocompetentes maduras a partir de precursores menos comprometidos, suas subsequentes respostas imunes dirigidas por antígenos e a supressão dessas e respostas autorreativas indesejadas são altamente dependentes e reguladas por citocinas (incluindo interleucina-2 [IL-2], IL- 4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21) que utilizam receptores na família da cadeia γ comum (γc) (Rochman et al., 2009) e membros da família, incluindo IL-12, 18 e 23. A IL-2 é essencial para o desenvolvimento tímico de células Treg e regula criticamente vários aspectos importantes de células Treg periféricas maduras e células T convencionais ativadas por antígeno. Por causa de sua potente atividade de fator de crescimento de células T in vitro, IL-2 foi extensivamente estudada em parte porque esta atividade ofereceu um meio potencial para aumentar diretamente a imunidade, por exemplo, em pacientes com câncer e AIDS-HIV, ou um alvo para antagonizar respostas indesejadas, por exemplo, rejeição de transplante e doenças

autoimunes. Embora estudos *in vitro* com IL-2 forneçam uma forte justificativa para esses estudos, a função de IL-2 in vivo é claramente muito mais complexa, conforme ilustrado pela primeira vez em camundongos deficientes em IL-2, onde uma síndrome autoimune letal rápida, não falta imunidade, foi observada (Sadlack et al., 1993, 1995). Observações semelhantes foram feitas posteriormente quando os genes que codificam IL-2Rα (Il2ra) e IL-2Rβ (Il2rb) sofreram ablação individual (Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995).

[004] A presente invenção refere-se a citocinas condicionalmente ativas e/ou direcionadas para uso no tratamento de câncer e outras doenças dependentes de regulação imune positiva ou negativa. Por exemplo, a atividade antitumoral de algumas citocinas é bem conhecida e descrita e algumas citocinas já foram utilizadas terapeuticamente em humanos. Citocinas, como interleucina-2 (IL-2) e interferon α (IFNα), mostraram atividade antitumoral positiva em pacientes com diferentes tipos de tumores, como carcinoma metastático renal, leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, mieloma múltiplo e o gostar. Outras citocinas como IFNβ, o Fator de Necrose Tumoral (TNF) α, TNFβ, IL-1, 4, 6, 12, 15 e os CSFs têm mostrado certa atividade antitumoral sobre alguns tipos de tumores e, portanto, são objeto de estudos adicionais.

SUMÁRIO

[005] São fornecidas neste documento proteínas terapêuticas, ácidos nucleicos que codificam as proteínas e composições e métodos de uso das proteínas e ácidos nucleicos para o tratamento de uma doença ou distúrbio, como doença proliferativa, doença tumoral, doença inflamatória, distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, doença do enxerto contra o hospedeiro e semelhantes.

[006] A invenção apresenta proteínas de fusão que são variantes condicionalmente ativas de uma citocina de interesse. Em um aspecto, os polipeptídeos de comprimento total da invenção têm atividade de ativação do receptor de citocina reduzida ou mínima, embora contenham um polipeptídeo de

citocina funcional. Após a ativação, por exemplo, por clivagem de um ligante peptídico que se junta a uma fração de bloqueio, por exemplo, um polipeptídeo bloqueador estérico, em sequência para a citocina ativa, a citocina, por exemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IFNalfa, IFNbeta, IFNgama, TNFalfa, linfotoxina, TGF-beta1, TGFbeta2, TGFbeta3, GM-CSF, CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21 ou fragmento funcional ou muteína de qualquer um dos anterior, pode ligar-se ao seu receptor e efetuar a sinalização. Se desejado, os polipeptídeos de comprimento total podem incluir uma fração de polipeptídeo de bloqueio que também fornece propriedades vantajosas adicionais. Por exemplo, o polipeptídeo de comprimento total pode conter uma fração de polipeptídeo de bloqueio que também prolonga a meia-vida sérica e/ou direciona o polipeptídeo de comprimento total para um sítio desejado de atividade de citocina. Alternativamente, os polipeptídeos de fusão de comprimento total podem conter um elemento de prolongamento da meia-vida sérica e/ou domínio de direcionamento que são distintos da fração de polipeptídeo de bloqueio. Preferencialmente, a proteína de fusão contém pelo menos um elemento ou domínio capaz de prolongar a meia-vida circulante *in vivo*. Preferencialmente, este elemento é removido enzimaticamente na localização corporal desejada (por exemplo, clivagem de protease no microambiente tumoral), restaurando as propriedades farmacocinéticas para a molécula de carga útil (por exemplo, IL2 ou IFNa) substancialmente semelhante à molécula de carga útil de ocorrência natural. As proteínas de fusão podem ser direcionadas a uma célula ou tecido desejado. Conforme descrito neste documento, o direcionamento é realizado por meio da ação de uma fração de polipeptídeo de bloqueio que também se liga a um alvo desejado, ou através de um domínio de direcionamento. O domínio que reconhece um antígeno alvo em um alvo preferido (por exemplo, um antígeno específico de tumor) pode ser anexado à citocina por meio de um ligante peptídico clivável ou não clivável. Se ligado por um ligante peptídico não clivável, o domínio de direcionamento pode auxiliar ainda mais na retenção da citocina no tumor e pode ser considerado um domínio de retenção. O domínio de

direcionamento não precisa necessariamente estar diretamente ligado à molécula de carga útil e pode ser ligado diretamente a outro elemento da proteína de fusão. Isso é especialmente verdadeiro se o domínio de direcionamento for anexado por meio de um ligante peptídico clivável.

[007] Em um aspecto, é fornecido um polipeptídeo de fusão compreendendo um polipeptídeo de citocina, ou fragmento funcional ou muteína do mesmo, e uma fração de bloqueio, por exemplo, um domínio de bloqueio estérico. A fração de bloqueio é fundida ao polipeptídeo de citocina, diretamente ou através de um ligante peptídico, e pode ser separada do polipeptídeo de citocina por clivagem (por exemplo, clivagem mediada por protease) do polipeptídeo de fusão no ou próximo ao sítio de fusão ou ligante peptídico ou na fração de bloqueio. Por exemplo, quando o polipeptídeo de citocina é fundido a uma fração de bloqueio através de um ligante peptídico que contém um sítio de clivagem de protease, o polipeptídeo de citocina é liberado da fração de bloqueio e pode ligar seu receptor, mediante clivagem mediada por protease do ligante peptídico. O ligante peptídico é projetado para ser clivado no sítio da atividade de citocina desejada, por exemplo, no microambiente tumoral, evitando a atividade de citocina fora do alvo e reduzindo a toxicidade geral da terapia com citocina.

[008] A fração de bloqueio também pode funcionar como um elemento de prolongamento da meia-vida sérica. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de fusão compreende ainda um elemento de prolongamento da meia-vida sérica separado. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de fusão compreende ainda um domínio de direcionamento. Em várias modalidades, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica é um polipeptídeo solúvel em água, como polietilenoglicol (PEG) opcionalmente ramificado ou multi-ramificado, albumina sérica humana de comprimento total (HSA) ou um fragmento que preserva a ligação a FcRn, um Fc fragmento, ou um nanobody que se liga a FcRn diretamente ou a albumina de soro humano.

[009] Além dos elementos de prolongamento da meia-vida sérica, as

composições farmacêuticas descritas neste documento preferencialmente compreendem pelo menos um ou mais domínios de direcionamento que se ligam a um ou mais antígenos alvo ou uma ou mais regiões em um único antígeno alvo. É contemplado neste documento que um construto polipeptídico da invenção é clivado, por exemplo, em um microambiente específico da doença ou no sangue de um sujeito no sítio de clivagem da protease e que o(s) domínio(s) de direcionamento se ligarão a um antígeno alvo em uma célula-alvo. Pelo menos um antígeno alvo está envolvido e/ou associado a uma doença, distúrbio ou condição. Antígenos alvo exemplificativos incluem aqueles associados a uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença do enxerto contra o hospedeiro ou uma doença do hospedeiro contra o enxerto.

[0010] Em algumas modalidades, um antígeno alvo é uma molécula de superfície celular, como uma proteína, lipídio ou polissacarídeo. Em algumas modalidades, um antígeno alvo é um em uma célula tumoral, célula infectada por vírus, célula infectada por bactérias, glóbulo vermelho danificado, célula de placa arterial ou célula de tecido fibrótico.

[0011] Os antígenos alvo, em alguns casos, são expressos na superfície de uma célula ou tecido doente, por exemplo, um tumor ou uma célula cancerosa. Os antígenos alvo para tumores incluem, mas não estão limitados a proteína alfa de ativação de fibroblastos (FAPa), glicoproteína de trofoblasto (5T4), transdutor de sinal de cálcio associado a tumor 2 (Trop2), Fibronectina EDB (EDB-FN), domínio de fibronectina EIIIB, CGS-2, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, c-Met, FOLR1, FAP e CEA. As composições farmacêuticas divulgadas neste documento também incluem proteínas que compreendem dois domínios de ligação ao antígeno que se ligam a dois antígenos alvo diferentes conhecidos por serem expressos em uma célula ou tecido doente. Pares exemplares de domínios de ligação ao antígeno incluem, mas não estão limitados a EGFR/CEA, EpCAM/CEA e HER-2/HER-3.

[0012] Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento compreendem independentemente um scFv, um domínio VH, um domínio VL, um domínio não-Ig ou um ligante que se liga especificamente ao antígeno alvo. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento se ligam especificamente a uma molécula de superfície celular. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento se ligam especificamente a um antígeno tumoral. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento se ligam específica e independentemente a um antígeno tumoral selecionado a partir de pelo menos um de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA e FOLR1. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento se ligam específica e independentemente a dois antígenos diferentes, em que pelo menos um dos antígenos é um antígeno tumoral selecionado de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA e FOLR1. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de direcionamento serve como um domínio de retenção e é anexado à citocina por meio de um ligante peptídico não clivável.

[0013] Conforme descrito neste documento, a fração de bloqueio de citocina pode se ligar à citocina e, assim, bloquear a ativação do receptor cognato da citocina.

[0014] Esta divulgação também está relacionada a ácidos nucleicos, por exemplo, DNA, RNA, mRNA, que codificam as proteínas condicionalmente ativas aqui descritas, bem como vetores e células hospedeiras que contêm tais ácidos nucleicos.

[0015] Esta divulgação também se refere a composições farmacêuticas que contêm uma proteína condicionalmente ativa, ácido nucleico que codifica a proteína condicionalmente ativa e vetores e células hospedeiras que contêm tais ácidos nucleicos. Normalmente, a composição farmacêutica contém um ou mais carreadores e/ou excipientes fisiologicamente aceitáveis.

[0016] A divulgação também se refere a métodos terapêuticos que incluem a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína condicionalmente ativa, ácido nucleico que codifica a proteína

condicionalmente ativa, vetor ou células hospedeiras que contêm tal ácido nucleico e composições farmacêuticas de qualquer um dos anteriores. Normalmente, o sujeito tem, ou está em risco de desenvolver, uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, um doença do enxerto contra o hospedeiro ou doença do hospedeiro contra o enxerto.

[0017] A divulgação também se refere ao uso de uma proteína condicionalmente ativa, ácido nucleico que codifica a proteína condicionalmente ativa, vetor ou células hospedeiras que contêm tal ácido nucleico e composições farmacêuticas de qualquer um dos anteriores, para o tratamento de um sujeito em necessidade. Normalmente, o sujeito tem, ou está em risco de desenvolver, uma doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença do enxerto contra o hospedeiro ou doença do hospedeiro contra o enxerto.

[0018] A divulgação também se refere ao uso de uma proteína condicionalmente ativa, ácido nucleico que codifica a proteína condicionalmente ativa, vetor ou células hospedeiras que contêm esse ácido nucleico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença, como uma doença proliferativa, um doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária, uma doença do enxerto contra o hospedeiro ou uma doença do hospedeiro contra o enxerto.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0019] A **FIG. 1a** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que inclui uma fração de bloqueio. A fração de bloqueio pode opcionalmente funcionar como um domínio de prolongamento da meia-vida sérica. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada a uma fração de bloqueio por meio de um ligante peptídico clivável por protease,

bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, o desenho mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral uma protease cliva em um sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor.

[0020] A **FIG. 1b** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease em que a HSA (fração de bloqueio) está diretamente ligada à citocina ou quimiocina de interesse, com um sítio de clivagem de protease entre a HSA e a citocina ou quimiocina de interesse. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada a uma fração de bloqueio por meio de um ligante peptídico clivável por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, a figura mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral, a protease cliva em um sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor.

[0021] A **FIG. 1c** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease em que mais de uma HSA (fração de bloqueio) está diretamente ligada à molécula de interesse. Se desejado, um ou mais dos HSA podem ser ligados à citocina ou quimiocina através de um ligante peptídico, tal como um ligante peptídico que contém um sítio de clivagem de protease. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada a uma fração de bloqueio por meio de um ligante peptídico clivável por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, a figura mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral, a protease cliva em um sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor. A citocina agora tem propriedades pK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo, tem meia-vida curta).

[0022] A **FIG. 1d** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que compreende mais de uma citocina, do mesmo tipo ou de tipos diferentes, com cada uma das quais estando ligada a um domínio de

ligação através de um ligante peptídico clivável por protease. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada a uma fração de bloqueio por meio de um ligante peptídico clivável por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, o desenho mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral uma protease cliva em um sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor.

[0023] A **FIG. 2** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que compreende um polipeptídeo de citocina ou quimiocina, uma fração de bloqueio e um domínio de prolongamento da meia-vida sérica conectados por pelo menos um ligante peptídico clivável por protease. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada a uma fração de bloqueio por meio de ligantes peptídicos cliváveis por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. Também está ligado a um elemento de prolongamento da meia-vida separado, que prolonga a meia-vida sérica. À direita da seta, a figura mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral, uma protease cliva em um sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando assim o elemento de prolongamento da meia-vida sérica e a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor. A citocina agora tem propriedades pK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo, tem meia-vida curta).

[0024] A **FIG. 3** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que compreende um polipeptídeo de citocina ou quimiocina, uma fração de bloqueio e um domínio de direcionamento conectados por pelo menos um ligante peptídico clivável por protease. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada a uma fração de bloqueio e um domínio de direcionamento por meio de um ligante peptídico clivável por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, o desenho mostra que em um microambiente inflamatório ou tumoral uma protease cliva no sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando o

domínio de direcionamento e a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor.

[0025] A **FIG. 4a** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que compreende um polipeptídeo de citocina ou quimiocina, uma fração de bloqueio, um domínio de direcionamento e um domínio de prolongamento da meia-vida sérica conectados por pelo menos um ligante peptídico clivável por protease, em que o polipeptídeo de citocina e o domínio de direcionamento são conectados por um ligante peptídico clivável por protease. À esquerda da seta, a figura mostra que um polipeptídeo de citocina está conectado ao domínio de direcionamento, fração de bloqueio e elemento de prolongamento da meia-vida por meio de peptídeo(s) de ligação clivável(is) por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, a figura mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral, a protease cliva em um sítio de clivagem de protease no peptídeo(s) de ligação, liberando o elemento de prolongamento da meia-vida, o domínio de direcionamento e a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao seu receptor. A citocina agora tem propriedades pK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo, tem meia-vida curta).

[0026] A **FIG. 4b** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que compreende um polipeptídeo de citocina ou quimiocina, uma fração de bloqueio, um domínio de direcionamento e um domínio de prolongamento da meia-vida sérica conectados por pelo menos um ligante peptídico clivável por protease. À esquerda da seta, a figura mostra que uma citocina está conectada ao domínio de direcionamento, uma fração de bloqueio e um elemento de prolongamento da meia-vida por meio de peptídeo(s) de ligação clivável(is) por protease, bloqueando assim sua capacidade de se ligar ao seu receptor. À direita da seta, a figura mostra que em um ambiente inflamatório ou tumoral, a protease cliva em um sítio de clivagem de protease no peptídeo(s) de ligação, liberando o elemento de prolongamento da meia-vida e a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor. A fração

de direcionamento permanece ligada, mantendo a citocina no microambiente tumoral. A citocina agora tem propriedades pK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo, tem meia-vida curta).

[0027] A **FIG. 5** é um esquema que ilustra a estrutura de um domínio variável de uma molécula de imunoglobulina. Os domínios variáveis de ambas as cadeias de imunoglobulina leve e pesada contêm três alças hipervariáveis, ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Os três CDRs de um domínio V (CDR1, CDR2, CDR3) agrupam-se em uma extremidade do barril beta. As CDRs são as alças que conectam as fitas beta B-C, C'-C" e F-G da dobra da imunoglobulina, enquanto as alças inferiores que conectam as fitas beta AB, CO, C" -D e E-F da dobra da imunoglobulina, e a alça superior que conecta as fitas D-E da dobra da imunoglobulina são as alças não CDR.

[0028] A **FIG. 6** é um esquema que ilustra uma citocina ou quimiocina ativada por protease que compreende uma citocina ou polipeptídeo de quimiocina, uma fração de bloqueio que é um domínio de ligação de albumina sérica (por exemplo, um dAb) e um ligante peptídico clivável por protease. No exemplo ilustrado, as alças não CDR em um domínio de ligação de albumina sérica (por exemplo, um sdAb) podem formar um sítio de ligação para a citocina IL-2. Neste exemplo, o sítio de ligação para albumina sérica pode ser formado pelas CDRs do domínio de ligação de albumina sérica.

[0029] As **FIGs. 7a-7h** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteínas de fusão de IL-2 exemplares na linhagem de células linfócitos T citotóxicos dependentes de IL-2 CTLL-2. Cada gráfico mostra os resultados do ensaio de proliferação de IL-2 conforme quantificado pelo ensaio de viabilidade celular baseado em luminescência CellTiter-Glo® (Promega). Cada ensaio de proliferação foi realizado com (FIGs. 7b, 7d, 7f, 7h) ou sem HSA (FIGs. 7a, 7c, 7e, 7g). Cada proteína de fusão compreende um aglutinante anti-HSA, e ambas as versões não clivada e clivada com protease MMP9 da proteína de fusão foram usadas em cada ensaio.

[0030] As **FIGs. 8a-8f** são uma série de gráficos que mostram a

atividade de proteínas de fusão de IL-2 exemplares na linhagem de células linfócitos T citotóxicos dependentes de IL-2 CTLL-2. Cada gráfico mostra os resultados do ensaio de proliferação de IL-2 conforme quantificado pelo ensaio de viabilidade celular baseado em luminescência CellTiter-Glo (Promega). Ambas as versões da proteína de fusão não clivada e clivada pela protease MMP9 foram usadas em cada ensaio.

[0031] As **FIGs. 9a-9z** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteínas de fusão de IL-2 exemplares na linhagem de células linfócitos T citotóxicos dependentes de IL-2 CTLL-2. Cada gráfico mostra os resultados do ensaio de proliferação de IL-2 conforme quantificado pelo ensaio de viabilidade celular baseado em luminescência CellTiter-Glo (Promega). Ambas as versões da proteína de fusão não clivada e clivada pela protease MMP9 foram usadas em cada ensaio.

[0032] A **FIG. 10** mostra os resultados do ensaio de clivagem de proteína. A proteína de fusão ACP16 foi corrida em um gel de SDS-PAGE na forma clivada e não clivada. Como pode ser visto no gel, a clivagem foi completa.

[0033] As **FIGs. 11a-11b** são gráficos que retratam os resultados de um ensaio com repórter de IL-2 HEK-Blue realizados em proteínas de fusão de IL12 p40 humana/p35 murina antes e após a clivagem pela protease. A análise foi realizada com base na quantificação da atividade da Fosfatase Alcalina Secretada (SEAP) usando o reagente QUANTI-Blue® (InvivoGen). Os resultados confirmam que as proteínas de fusão da proteína IL12 estão ativas.

[0034] As **FIGs. 12a-12f** mostram uma série de gráficos que retratam os resultados do ensaio com HEK-blue de quatro proteína de fusão de IL-12, antes e após a clivagem por MMP9. A análise foi realizada com base na quantificação da atividade da Fosfatase Alcalina Secretada (SEAP) usando o reagente QUANTI-Blue (InvivoGen). Os dados mostram maior atividade na IL12 clivada do que na proteína de fusão completa. Os construtos testados foram ACP06 (FIG. 12a), ACP07 (FIG. 12b), ACP08 (FIG. 12c), ACP08 (FIG. 12b), ACP09 (FIG. 12d), ACP10 (FIG. 12e), ACP11 (FIG. 12f).

[0035] A **FIG. 13** mostra os resultados de um ensaio de clivagem de proteína. A proteína de fusão ACP11 foi corrida em um gel de SDS-PAGE na forma clivada e não clivada. Como pode ser visto no gel, a clivagem foi completa.

[0036] A **FIG. 14** é um esquema que representa um exemplo não limitativo de uma proteína de citocina induzível, em que o construto é ativado após a clivagem por protease de um ligante peptídico ligado entre duas subunidades da citocina.

[0037] As **FIGs. 15a-15d** são gráficos que retratam os resultados de um ensaio com HEK-Blue realizado em proteínas de fusão de IL12 p40 humana/p35 murina antes e após a clivagem pela protease. O ensaio foi realizado. Os resultados confirmam que as proteínas de fusão da proteína IL12 estão ativas. Cada ensaio de proliferação foi realizado com HSA ou sem HSA.

[0038] **As FIGs. 16a-16f** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteínas de fusão de IFNγ exemplares em comparação com a atividade do IFNγ controle de camundongo usando um ensaio de sobrevida de células 279 WEHI. Cada ensaio foi realizado com meio contendo HSA (+HSA) ou não contendo HSA (-HSA). Cada proteína de fusão compreende um aglutinante anti-HSA, e ambas as versões não clivada e clivada com protease MMP9 da proteína de fusão foram usadas em cada ensaio.

[0039] As **FIGs. 17a-17f** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteínas de fusão de IFNγ exemplares em comparação com a atividade do IFNγ controle de camundongo usando um ensaio com repórter B16. Cada ensaio foi realizado com meio contendo HSA (+HSA**)** ou não contendo HSA (-HSA**)**. Cada proteína de fusão compreende um aglutinante anti-HSA, e ambas as versões não clivada e clivada com protease MMP9 da proteína de fusão foram usadas em cada ensaio.

[0040] As **FIGs. 18a-18b** mostram os resultados do ensaio de clivagem de proteína, conforme descrito no **Exemplo 2**. Dois construtos, ACP31 (proteína de fusão IFN-a; FIG. 8a) e ACP55 (proteína de fusão IFN-g; FIG. 8b), foram corridos em um gel SDS-PAGE em ambas as formas clivada e não clivada.

Como pode ser visto no gel, a clivagem foi completa.

[0041] As **FIGs. 19a-19b** são uma série de gráficos (19a e 19b) que mostram a atividade de proteínas de fusão de IFNγ exemplares antes e após a clivagem pela protease usando um ensaio com repórter B16. Cada ensaio foi realizado com meio de cultura contendo HSA, e cada proteína de fusão compreende um aglutinante anti-HSA. Ambas as versões da proteína de fusão não clivada e clivada pela protease MMP9 foram usadas em cada ensaio.

[0042] As **FIGs. 20a-20b** são uma série de gráficos (20a e 20b) que mostram a atividade de proteínas de fusão de IFNa exemplares antes e após a clivagem usando um ensaio com repórter B16. Cada ensaio foi realizado com meio contendo HSA, e cada proteína de fusão compreende um aglutinante anti-HSA. Ambas as versões da proteína de fusão não clivada e clivada pela protease MMP9 foram usadas em cada ensaio.

[0043] As **FIGs. 21a-21d** são uma série de gráficos que representam os resultados de estudos de crescimento tumoral usando a linhagem celular MC38. As **FIGs. 21a-c** mostram o efeito das proteínas de fusão IFNγ e IFNγ no crescimento do tumor quando injetadas intraperitonealmente (IP) usando diferentes níveis de dosagem e programas (ug = microgramas, BID = duas vezes ao dia, BIW = duas vezes por semana, QW = semanal). A **FIG. 21d** mostra o efeito da injeção intratumoral (IT) de IFNγ e IL-2 no crescimento do tumor.

[0044] As **FIGs. 22a-22b** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteínas de fusão de IFNγ exemplares (ACP51 e ACP52) clivadas pela protease MMP9 em comparação com a atividade de proteínas de fusão não clivadas usando o ensaio com repórter B16. Cada proteína de fusão compreende um ligante anti-HSA e um domínio de direcionamento de tumor.

[0045] As **FIGs. 23a-23b** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteína de fusão de IFNγ exemplares (ACP53 e ACP54) clivadas pela protease MMP9 em comparação com a atividade de proteínas de fusão não clivadas usando o ensaio com repórter B16. Cada proteína de fusão compreende IFNγ diretamente fundido à albumina.

[0046] As **FIGs. 24a-24d** são gráficos que retratam os resultados de um ensaio com repórter de IL-2 HEK-Blue realizado em proteínas de fusão de IL-2 e IL2 humana recombinante (Rec hIL-2). A análise foi realizada com base na quantificação da atividade da Fosfatase Alcalina Secretada (SEAP) usando o reagente QUANTI-Blue (InvivoGen).

[0047] As **FIGs. 25a e 25b** são dois gráficos que mostram a análise de ACP16 (FIG. 25a) e ACP124 (FIG. 25b) em um ensaio repórter HEKBlue IL-2 na presença de HSA. Os círculos representam a atividade do polipeptídeo não cortado, os quadrados representam a atividade do polipeptídeo cortado. A **FIG. 25c** é um gráfico que mostra os resultados de um ensaio de proliferação CTLL-2. As células CTLL2 (ATCC) foram semeadas em suspensão a uma concentração de 500.000 células/poço em meio de cultura com ou sem albumina de soro humano (HSA) 40mg/ml e estimuladas com uma série de diluições de hIL2 ativável por 72 horas a 37°C e 5% de CO_2. A atividade de ACP16 ativável não clivado e clivado foi testada. A hIL2 ativável clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. A atividade da célula foi avaliada usando um ensaio de viabilidade celular baseado em luminescência CellTiter-Glo (Promega). Os círculos representam a proteína de fusão intacta e os quadrados representam a proteína de fusão clivada por protease.

[0048] As **FIGs. 26a-26c** são uma série de gráficos que mostram a atividade de proteínas de fusão em um ensaio com repórter de IL-2 HEKBlue. A **FIG.** 26a representa a ativação de IL-12/STAT4 em uma comparação de ACP11 (uma proteína de fusão p40 IL12 humana/p35 murina) com ACP04 (controle negativo). A **FIG.** 26b é um gráfico que mostra a análise de ACP91 (uma proteína de fusão de IL-12 quimérica). Os quadrados representam a atividade do polipeptídeo ACP91 não cortado e os triângulos representam a atividade do polipeptídeo cortado (ACP91 + MMP9). Os valores de EC50 para cada um são mostrados na tabela. A **FIG.** 26c é um gráfico que mostra a análise de ACP136 (uma proteína de fusão de IL-12 quimérica). Os quadrados representam a

atividade do polipeptídeo ACP136 não cortado e os triângulos representam a atividade do polipeptídeo cortado (ACP136 + MMP9). Os valores de EC50 para cada um são mostrados na tabela em anexo.

[0049] As **FIGs. 27a-27f** são uma série de gráficos que mostram que polipeptídeos de IFNa1 clivados ACP31 (FIG. 27a), ACP 125 (FIG. 27b), ACP 126 (FIG. 27c) são ativos em um ensaio com repórter HEKBlue. Os valores de EC50 para cada construto de IFNa1 são mostrados na tabela abaixo de cada gráfico.

[0050] As **FIGs. 28a-n** são uma série de gráficos que retratam a atividade de APC56 (FIG. 28a), APC57 (FIG. 8b) APC58 (FIG. 28c), APC59 (FIG. 28d), APC60 (FIG. 28e), APC61 + HSA (FIG. 28f), ACP30 + HSA (FIG. 28g), ACP73 (FIG. 28h), ACP70 + HSA (FIG. 28i), ACP71 (FIG. 28j), ACO 72 (FIG. 28k), ACP 73 (FIG. 28l), ACP74 (FIG. 28m), e ACP75 (FIG. 28n) em um ensaio com repórter de IFNα B16. Cada fusão foi testada quanto à sua atividade quando cortada (quadrados) e não cortada (círculos). A análise de IFNγ murino está incluída em cada gráfico como um comparador.

[0051] As **FIGs. 29a-29b** são dois gráficos que mostram os resultados da análise de ACP31 (proteína de fusão IFNα1 de camundongo) e ACP11 (uma proteína de fusão p40 IL12 humana/p35 murina) em um modelo de xenoenxerto tumoral. A **FIG. 29a** mostra o volume do tumor ao longo do tempo em camundongos tratados com 33 µg ACP31 (círculos), 110 µg ACP31 (triângulos), 330 µg ACP31 (losangos) e como controles 1 µg de IFNa1 de tipo selvagem murino (linha tracejada, quadrados) e 10 µg mIFNa1 (linha tracejada, pequenos círculos). O veículo sozinho é indicado por grandes círculos abertos. Os dados mostram que o volume do tumor diminui ao longo do tempo de uma maneira dependente da dose em camundongos tratados com ACP31. A **FIG. 29b** mostra o volume do tumor ao longo do tempo em camundongos tratados com 17,5µg ACP11 (quadrados), 175µg ACP31 (triângulos), 525µg ACP31 (círculos) e como controles 2µg ACP04 (linha tracejada, triângulos) e 10 µg ACP04 (linha tracejada, losangos). O veículo sozinho é indicado por grandes círculos abertos.

Os dados mostram que o volume do tumor diminui ao longo do tempo de uma maneira dependente da dose em camundongos tratados com ACP11 e ACP04 (uma proteína de fusão p40 IL12 humana/p35 murina).

[0052] A **FIG. 30a-30f** são uma série de diagramas de espaguete que mostram o volume tumoral ao longo do tempo em um modelo de tumor de xenoenxerto de camundongo em camundongos tratados apenas com o veículo (FIG. 30a), 2µg ACP04 (FIG. 30b), 10µg ACP04 (FIG. 30c), 17,5µg ACP11 (FIG. 30d), 175µg ACP11 (FIG. 30e), e 525µgACP11 (FIG. 30f). Cada linha representa um único camundongo.

[0053] As **FIGs. 31a-31c** são três gráficos que mostram os resultados da análise de ACP16 e ACP124 em um modelo de xenoenxerto de tumor. A **FIG. 31a** mostra o volume tumoral ao longo do tempo em camundongos tratados com 4,4µg ACP16 (quadrados), 17µg ACP16 (triângulos), 70µg ACP16 (triângulos virados para baixo), 232µg ACP16 (círculos escuros), e um comparador com 12µg de IL-2 do tipo selvagem (linha tracejada, triângulos) e com 36µg de IL-2 do tipo selvagem (linha tracejada, losangos. O veículo sozinho é indicado por grandes círculos abertos. Os dados mostram o volume tumoral diminuindo ao longo do tempo de uma forma dependente da dose em camundongos tratados com ACP16 em concentrações maiores. A **FIG. 31b** mostra o volume tumoral ao longo do tempo em camundongos tratados com 17µg ACP124 (quadrados), 70µg ACP124 (triângulos), 230µg ACP124 (triângulos virados para baixo), e 700µg ACP124. O veículo sozinho está indicado por grandes círculos abertos. A **FIG. 31c** mostra o volume tumoral ao longo do tempo em camundongos tratados com 17µg ACP16 (triângulos), 70µg ACP16 (círculos), 232µg ACP16 (círculos escuros), e como um comparador 17µg ACP124 (linha tracejada, triângulos) 70µg ACP124 (linha tracejada, losangos), 230µg ACP124 (linha tracejada, losangos). O veículo sozinho é indicado por triângulos escuros para baixo. Os dados mostram que o volume do tumor diminui ao longo do tempo de uma maneira dependente da dose em camundongos tratados com ACP16, mas não com ACP124.

[0054] As **FIGs. 32a-32c** são uma série de diagramas de espaguete que mostram a atividade de proteínas de fusão em um modelo de xenoenxerto de camundongo MC38 correspondente aos dados mostrados na **FIG.** 31. Cada linha nos gráficos é um único camundongo.

[0055] A **FIG. 33** é um gráfico que mostra o volume do tumor ao longo do tempo em um modelo de xenoenxerto de camundongo que mostra o crescimento do tumor em camundongos de controle (círculos abertos) e camundongos tratados com AP16 (quadrados).

[0056] As **FIGs. 34a-34d são** uma série de gráficos de sobrevivência mostrando a sobrevivência de camundongos ao longo do tempo após o tratamento com proteínas de fusão cliváveis. A **FIG. 34a** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 17µg ACP16 (linha escura) e 17µg ACP124 (linha tracejada). A **FIG. 34b** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 70µg ACP16 (linha escura) e 70µg ACP124 (linha tracejada). A **FIG. 34c** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 232µg ACP16 (linha escura) e 230µg ACP124 (linha tracejada). A **FIG. 34d** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 232µg ACP16 (linha escura) e 700µg ACP124 (linha tracejada).

[0057] A **FIG. 35** é uma série de diagramas de espaguete que mostram a atividade de proteínas de fusão em um modelo de xenoenxerto de camundongo MC38. Todos os grupos de camundongos receberam quatro doses no total, exceto para as três doses mais altas de APC132, em que a toxicidade fatal foi detectada após 1 semana/2 doses. São mostrados apenas o veículo (parte superior), 17, 55, 70 e 230 µg ACP16 (linha superior completa), 9, 28, 36 e 119 µg ACP132 (linha inteira do meio) e 13, 42, 54 e 177 µg ACP21 (linha inteira inferior). Cada linha nos gráficos representa um animal individual.

[0058] As **FIGs. 36-41** ilustram as propriedades dos polipeptídeos TriTAC, que servem como proteínas de fusão cliváveis por protease exemplares.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0059] São divulgados neste documento métodos e composições para projetar e usar construtos que compreendem citocinas induzíveis. As citocinas são potentes agonistas imunológicos, o que as leva a serem consideradas agentes terapêuticos promissores para a oncologia. No entanto, as citocinas provaram ter uma janela terapêutica muito estreita. As citocinas têm meia-vida sérica curta e também são consideradas altamente potentes. Consequentemente, a administração terapêutica de citocinas produziu efeitos sistêmicos indesejáveis e toxicidades. Estes foram exacerbados pela necessidade de administrar grandes quantidades de citocina para atingir os níveis desejados de citocina no sítio pretendido de ação da citocina (por exemplo, um tumor). Infelizmente, devido à biologia das citocinas e à incapacidade de direcionar e controlar efetivamente sua atividade, as citocinas não alcançaram as vantagens clínicas esperadas no tratamento de tumores.

[0060] São divulgadas neste documento proteínas de fusão que superam a toxicidade e os problemas de meia-vida curta que limitaram severamente o uso clínico de citocinas em oncologia. As proteínas de fusão contêm polipeptídeos de citocina que possuem atividade agonista do receptor. Mas, no contexto da proteína de fusão, a atividade agonista do receptor de citocina é atenuada e a meia-vida circulante é prolongada. As proteínas de fusão incluem sítios de clivagem de protease, que são clivados por proteases que estão associadas a um sítio desejado de atividade de citocina (por exemplo, um tumor) e são tipicamente enriquecidos ou seletivamente presentes no sítio de atividade desejada. Assim, as proteínas de fusão são preferencialmente (ou seletivamente) e eficientemente clivadas no sítio de atividade desejado para limitar a atividade da citocina substancialmente ao sítio de atividade desejado, tal como o microambiente tumoral. A clivagem de protease no sítio de atividade desejado, tal como em um microambiente tumoral, libera uma forma da citocina da proteína de fusão que é muito mais ativa como um agonista do receptor de citocina do que a proteína de fusão (tipicamente pelo menos cerca de 100X mais ativa do que o proteína de fusão). A forma da citocina que é liberada após a

clivagem das proteases específicas de tumor de fusão libera a atividade total da interleucina no sítio desejado e também a separa do prolongamento da meia-vida da versão não clivada. Nessas modalidades, a interleucina totalmente ativa e livre teria propriedades farmacocinéticas (PK) muito diferentes – uma meia-vida de horas, em vez de semanas. Além disso, a exposição à citocina ativa é limitada ao sítio da atividade desejada da citocina (por exemplo, um sítio inflamatório ou tumor) e a exposição sistêmica à citocina ativa, e toxicidade e efeitos colaterais associados, são reduzidos.

[0061] A menos que definido de outro modo, todos os termos da técnica, notações e outros termos científicos ou terminologia utilizados neste documento são destinados a ter os significados comumente entendidos por aqueles versados na técnica aos quais pertence esta invenção. Em alguns casos, termos com significados comumente compreendidos são definidos neste documento para clareza e/ou para referência pronta, e a inclusão de tais definições neste documento não deve necessariamente ser interpretada como representando uma diferença sobre o que é geralmente entendido na técnica. As técnicas e procedimentos descritos ou referenciados aqui são geralmente bem compreendidos e comumente empregados usando metodologias convencionais por aqueles versados na técnica, tais como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular amplamente utilizadas descritas em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4ª ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Conforme apropriado, os procedimentos que envolvem o uso de kits e reagentes disponíveis no mercado geralmente são realizados de acordo com os protocolos e condições definidos pelo fabricante, a menos que indicado de outra forma.

[0062] "Citocina" é um termo bem conhecido da técnica que se refere a qualquer uma de uma classe de proteínas imunorreguladoras (como interleucina ou interferon) que são secretadas por células, especialmente do sistema imunológico e que são moduladores do sistema imunológico. Os polipeptídeos de citocina que podem ser usados nas proteínas de fusão aqui divulgadas

incluem, mas não estão limitados a fatores de crescimento de transformação, tais como TGF-α e TGF-β (por exemplo, TGFbeta1, TGFbeta2, TGFbeta3); interferons, tais como interferon-α, interferon-β, interferon-γ, interferon-kappa e interferon-ômega; interleucinas, como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL- 11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21 e IL-25; fatores de necrose tumoral, como fator de necrose tumoral alfa e linfotoxina; quimiocinas (por exemplo, quimiocina de motivo C-X-C 10 (CXCL10), CCL19, CCL20, CCL21) e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CS), bem como fragmentos de tais polipeptídeos que ativam os receptores cognatos para a citocina (ou seja, fragmentos funcionais dos anteriores)."Quimiocina" é um termo da técnica que se refere a qualquer um de uma família de pequenas citocinas com a capacidade de induzir quimiotaxia dirigida em células responsivas próximas.

[0063] As citocinas são bem conhecidas por terem meia-vida sérica curta, que frequentemente é de apenas alguns minutos ou horas. Mesmo as formas de citocinas que têm sequências de aminoácidos alteradas com a intenção de prolongar a meia-vida sérica, mas retêm a atividade do agonista do receptor, normalmente também têm meia-vida sérica curta. Conforme usado neste documento, uma "citocina de meia-vida curta" refere-se a uma citocina que tem uma meia-vida substancialmente breve circulando no soro de um sujeito, como uma meia-vida sérica que é inferior a 10, inferior a 15, menos de 30, menos de 60, menos de 90, menos de 120, menos de 240 ou menos de 480 minutos. Conforme usado neste documento, uma citocina de meia-vida curta inclui citocinas que não foram modificadas em sua sequência para atingir uma meia-vida mais longa do que o normal no corpo de um sujeito e polipeptídeos que têm sequências de aminoácidos alteradas destinadas a prolongar a meia-vida sérica vida ainda retém a atividade agonista do receptor. Este último caso não se destina a incluir a adição de domínios de proteínas heterólogas, como um elemento de prolongamento da meia-vida genuíno, como albumina sérica.

[0064] "Sortases" são transpeptidases que modificam proteínas

reconhecendo e clivando um sinal de classificação de terminal carboxila incorporado ou terminalmente ligado a uma proteína ou peptídeo alvo. A Sortase A catalisa a clivagem do motivo LPXTG (onde X é qualquer aminoácido padrão) entre o resíduo Thr e Gly na proteína alvo, com ligação transitória do resíduo Thr ao resíduo Cys do sítio ativo na enzima, formando um intermediário enzima-tioacila. Para completar a transpeptidação e criar o conjugado peptídeo-monômero, uma biomolécula com um grupo nucleofílico N-terminal, tipicamente um motivo de oligoglicina, ataca o intermediário, deslocando a Sortase A e unindo as duas moléculas.

[0065] Conforme usado neste documento, o termo "bloqueador estérico" refere-se a um polipeptídeo ou fração de polipeptídeo que pode ser covalentemente ligado a um polipeptídeo de citocina direta ou indiretamente através de outras frações, tais como ligantes, por exemplo, na forma de um polipeptídeo quimérico (proteína de fusão), mas de outra forma não se liga covalentemente ao polipeptídeo de citocina. Um bloqueador estérico pode se ligar de forma não covalente ao polipeptídeo de citocina, por exemplo, por ligação eletrostática, hidrofóbica, iônica ou de hidrogênio. Um bloqueador estérico normalmente inibe ou bloqueia a atividade da fração de citocina devido à sua proximidade com a fração de citocina e tamanho comparativo. Um bloqueador estérico também pode bloquear em virtude do recrutamento de um grande parceiro de ligação à proteína. Um exemplo disso é um anticorpo que se liga à albumina sérica; enquanto o próprio anticorpo pode ou não ser grande o suficiente para bloquear a ativação ou ligação por conta própria, o recrutamento de albumina permite um bloqueio estérico suficiente.

[0066] Conforme usado e descrito neste documento, um "elemento de prolongamento da meia-vida" é uma parte do polipeptídeo quimérico que aumenta a meia-vida sérica e melhora a pK, por exemplo, alterando seu tamanho (por exemplo, para ficar acima do limite de filtração renal), forma, raio hidrodinâmico, carga ou parâmetros de absorção, biodistribuição, metabolismo e eliminação.

[0067] Conforme usado neste documento, os termos "ativável", "ativar", "induzir" e "indutível" referem-se à capacidade de uma proteína, ou seja, uma citocina, que faz parte de uma proteína de fusão, de se ligar ao seu receptor e efetuar a atividade sobre clivagem de elementos adicionais da proteína de fusão.

[0068] Conforme usado neste documento, "plasmídeos" ou "vetores virais" são agentes que transportam os ácidos nucleicos divulgados para a célula sem degradação e incluem um promotor que produz a expressão da molécula de ácido nucleico e/ou polipeptídeo nas células nas quais é distribuído.

[0069] Conforme usado neste documento, os termos "peptídeo", "polipeptídeo" ou "proteína" são usados de maneira ampla, significando dois ou mais aminoácidos ligados por uma ligação peptídica. Proteína, peptídeo e polipeptídeo também são usados neste documento de maneira intercambiável para se referir a sequências de aminoácidos. Deve-se reconhecer que o termo polipeptídeo não é usado neste documento para sugerir um tamanho ou quantidade específicos de aminoácidos que compreende a molécula e que um peptídeo da invenção pode conter até inúmeros resíduos de aminoácidos ou mais.

[0070] Conforme usado ao longo do documento, "sujeito" pode ser um vertebrado, mais especificamente um mamífero (por exemplo, um humano, cavalo, gato, cachorro, vaca, porco, ovelha, cabra, camundongo, coelho, rato e porquinho-da-índia), aves, répteis, anfíbios, peixes e qualquer outro animal. O termo não denota uma idade ou sexo específico. Assim, sujeitos adultos e recém-nascidos, sejam do sexo masculino ou feminino, devem ser abrangidos.

[0071] Conforme usado neste documento, "paciente" ou "sujeito" pode ser usado alternadamente e pode se referir a um sujeito com uma doença ou distúrbio (por exemplo, câncer). O termo paciente inclui sujeitos humanos e veterinários.

[0072] Conforme usado neste documento, os termos "tratamento", "tratar" ou "tratar" referem-se a um método de redução dos efeitos de uma

doença ou condição ou sintoma da doença ou condição. Assim, no método divulgado, o tratamento pode se referir a pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou redução substancialmente completa na gravidade de uma doença ou condição estabelecida ou sintoma da doença ou condição. Por exemplo, um método para tratar uma doença é considerado um tratamento se houver uma redução de 10% em um ou mais sintomas da doença em um sujeito em comparação com um controle. Assim, a redução pode ser de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, ou qualquer percentual de redução entre 10% e 100% em comparação com os níveis nativos ou de controle. Entende-se que o tratamento não se refere necessariamente à cura ou ablação completa da doença, condição ou sintomas da doença ou condição.

[0073] Conforme usado neste documento, os termos "prevenir", "prevenir" e "prevenção" de uma doença ou distúrbio referem-se a uma ação, por exemplo, a administração do polipeptídeo quimérico ou sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo quimérico, que ocorre antes ou em aproximadamente ao mesmo tempo, um sujeito começa a mostrar um ou mais sintomas da doença ou distúrbio, que inibe ou retarda o início ou a exacerbação de um ou mais sintomas da doença ou distúrbio.

[0074] Conforme usado neste documento, as referências a "diminuir", "reduzir" ou "inibir" incluem uma mudança de pelo menos cerca de 10%, de pelo menos cerca de 20%, de pelo menos cerca de 30%, de pelo menos cerca de 40%, de pelo menos cerca de 50%, de pelo menos cerca de 60%, de pelo menos cerca de 70%, de pelo menos cerca de 80%, de pelo menos cerca de 90% ou mais em comparação com um nível de controle adequado. Esses termos podem incluir, mas não necessariamente incluem a eliminação completa de uma função ou propriedade, como a atividade agonista.

[0075] Um "agonista do receptor de citocina atenuado" é um agonista

do receptor de citocina que diminuiu a atividade agonista do receptor em comparação com o agonista de ocorrência natural do receptor de citocina. Um agonista de citocina atenuado pode ter pelo menos cerca de 10X, pelo menos cerca de 50X, pelo menos cerca de 100X, pelo menos cerca de 250X, pelo menos cerca de 500X, pelo menos cerca de 1000X ou menos atividade agonista em comparação com o agonista de ocorrência natural do receptor. Quando uma proteína de fusão que contém um polipeptídeo de citocina, conforme descrito neste documento, é descrita como "atenuada" ou tendo "atividade atenuada", significa que a proteína de fusão é um agonista do receptor de citocina atenuado.

[0076] Uma "proteína de fusão intacta" é uma proteína de fusão na qual nenhum domínio foi removido, por exemplo, por clivagem de protease. Um domínio pode ser removível por clivagem de protease ou outra atividade enzimática, mas quando a proteína de fusão está "intacta", isso não ocorreu.

[0077] Conforme usado neste documento, "fração" se refere a uma fração de uma molécula que tem uma função distinta dentro dessa molécula, e essa função pode ser realizada por essa fração no contexto de outra molécula. Uma fração pode ser uma entidade química com uma função particular ou uma fração de uma molécula biológica com uma função particular. Por exemplo, uma "fração de bloqueio" dentro de uma proteína de fusão é uma fração da proteína de fusão que é capaz de bloquear a atividade de algum ou de todo o polipeptídeo de fusão. Este pode ser um domínio de proteína, como albumina sérica. O bloqueio pode ser realizado por um bloqueador estérico ou um bloqueador específico. Um bloqueador estérico bloqueia em virtude do tamanho e da posição e não com base na ligação específica; um exemplo é a albumina sérica. Um bloqueador específico bloqueia em virtude de interações específicas com a fração a ser bloqueada. Um bloqueador específico deve ser adaptado para a citocina ou domínio ativo específico; um bloqueador estérico pode ser usado independentemente da carga útil, desde que seja grande o suficiente.

[0078] Em geral, o uso terapêutico de citocinas é fortemente limitado por sua toxicidade sistêmica. O TNF, por exemplo, foi originalmente descoberto

por sua capacidade de induzir a necrose hemorrágica de alguns tumores e por seu efeito citotóxico in vitro em diferentes linhagens tumorais, mas posteriormente demonstrou possuir forte atividade pró-inflamatória, que pode, no caso de condições de superprodução, afetar perigosamente o corpo humano. Como a toxicidade sistêmica é um problema fundamental com o uso de quantidades farmacologicamente ativas de citocinas em humanos, novos derivados e estratégias terapêuticas estão agora em avaliação, com o objetivo de reduzir os efeitos tóxicos dessa classe de efetores biológicos mantendo sua eficácia terapêutica.

[0079] A IL-2 exerce funções estimulantes e reguladoras no sistema imunológico e é, junto com outros membros da família de citocinas da cadeia γ comum (γc), central para a homeostase imunológica. IL-2 medeia sua ação pela ligação aos receptores de IL-2 (IL-2R), consistindo em receptores triméricos feitos de cadeias IL-2Rα (CD25), IL-2Rβ (CD122) e IL-2Rγ (γc, CD132) ou IL-2Rs βγ diméricos (1, 3). Ambas as variantes de IL-2R são capazes de transmitir sinais após a ligação de IL-2. No entanto, os IL-2Rs αβγ triméricos têm uma afinidade cerca de 10-100 vezes maior para IL-2 do que os IL-2Rs βγ diméricos (3), implicando que CD25 confere ligação de alta afinidade de IL-2 ao seu receptor, mas não é crucial para transdução de sinal. Os IL-2Rs triméricos são encontrados em células T ativadas e células T reguladoras CD4+ forkhead box P3 (FoxP3)+ (Treg), que são sensíveis à IL-2 in vitro e in vivo. Por outro lado, células experimentadas com antígeno (memória) CD8+, CD44 de alta memória fenótipo (MP) CD8+ e células natural killer (NK) são dotadas de altos níveis de βγ IL-2Rs diméricos, e essas células também respondem vigorosamente a IL-2 *em vitro* e *in vivo*.

[0080] A expressão do IL-2R de alta afinidade é crítica para permitir que as células T respondam a baixas concentrações de IL-2 que está transitoriamente disponível in vivo. A expressão de IL-2Rα está ausente nas células T naive e de memória, mas é induzida após a ativação do antígeno. IL-2Rβ é expresso constitutivamente por células NK, NKT e células T CD8+ de

memória, mas também é induzido em células T naive após a ativação do antígeno. O γc é regulado com muito menos rigor e é expresso constitutivamente por todas as células linfoides. Uma vez que o IL-2R de alta afinidade é induzido pelo antígeno, a sinalização de IL-2R regula positivamente a expressão de IL-2Rα em parte através da regulação dependente de Stat5 da transcrição de Il2ra (Kim et al., 2001). Este processo representa um mecanismo para manter a expressão do IL-2R de alta afinidade e sustentar a sinalização de IL-2 enquanto permanece uma fonte de IL-2.

[0081] IL-2 é capturado por IL-2Rα através de uma grande superfície de ligação hidrofóbica cercada por uma periferia polar que resulta em uma interação relativamente fraca (Kd 10-8 M) com rápida cinética de ligação on-off. No entanto, o complexo binário IL-2Rα-IL-2 leva a uma mudança conformacional muito pequena em IL-2 que promove associação com IL-2Rβ por meio de uma interação polar distinta entre IL-2 e IL-2Rβ. A afinidade pseudoalta do complexo trimérico IL2/α/β (ou seja, Kd~300 pM) indica claramente que o complexo trimérico é mais estável do que IL2 ligado apenas à cadeia α (Kd = 10 nM) ou à cadeia β sozinho (Kd = 450 nM), conforme mostrado pelos dados de Ciardelli. Em qualquer caso, o trímero IL2/α/β recruta então a cadeia γ para o complexo quaternário capaz de sinalizar, o que é facilitado pelo grande sítio de ligação do composto na cadeia β ligada a IL2 para a cadeia γ.

[0082] Em outras palavras, o complexo ternário IL-2Rα-IL-2Rβ-IL-2 recruta γc através de uma interação fraca com IL-2 e uma interação mais forte com IL-2Rβ para produzir um IL-2R quaternário estável de alta afinidade (Kd 10-11 M que é 10 pM). A formação do complexo quaternário de alta afinidade IL-2-IL-2R leva à transdução de sinal através das tirosina quinases Jak1 e Jak3, que estão associadas a IL-2Rβ e γc, respectivamente (Nelson e Willerford, 1998). O complexo quaternário IL-2-IL-2R é rapidamente internalizado, onde IL-2, IL-2Rβ e γc são rapidamente degradados, mas IL-2Rα é reciclado para a superfície celular (Hémar et al., 1995; Yu e Malek, 2001). Assim, aquelas atividades funcionais que requerem sinalização sustentada de IL-2R requerem uma fonte

contínua de IL-2 para envolver IL-2Rα e formar complexos de sinalização IL-2-IL-2R adicionais.

[0083] A interleucina-15 (IL-15), outro membro da família de citocinas do feixe de 4-alfa-hélice, também surgiu como um imunomodulador para o tratamento do câncer. A IL-15 é inicialmente capturada via IL-15Rα, que é expressa em células dendríticas apresentadoras de antígenos, monócitos e macrófagos. IL-15 exibe ampla atividade e induz a diferenciação e proliferação de células T, B e natural killer (NK) via sinalização através de IL-15/IL-2-R-β (CD122) e da cadeia γ comum (CD132). Também aumenta a atividade citolítica das células T $CD8^+$ e induz células T de memória $CD8^+CD44$ com antígeno de longa duração. A IL-15 estimula a diferenciação e a síntese de imunoglobulinas pelas células B e induz a maturação das células dendríticas. Não estimula as células T reguladoras imunossupressoras (Tregs). Assim, o aumento da atividade da IL-15 seletivamente no microambiente tumoral poderia aumentar a imunidade inata e específica e combater tumores (Waldmann et al., 2012). IL-15 foi inicialmente identificada por sua capacidade de estimular a proliferação de células T de uma maneira semelhante a IL-2 por meio de componentes de receptor comuns (IL-2R/15Rβ-γc) e sinalização por JAK1/JAK3 e STAT3/STAT5. Assim como a IL-2, a IL-15 demonstrou estimular a proliferação de células T CD4-CD8-, CD4+ CD8+, CD4+ e CD8+ ativadas, bem como facilitar a indução de linfócitos T citotóxicos e a geração, proliferação e ativação de Células NK (Waldmann et al., 1999). No entanto, ao contrário da IL-2, que é necessária para manter as células Tregs CD4+CD25+ que expressam a caixa forkhead P3 (FOXP3) e para a retenção dessas células na periferia, a IL-15 tem pouco efeito sobre as Tregs (Berger et al., 2009). Isso é importante porque as Tregs CD4+CD25+ que expressam FOXP3 inibem as células T efetoras, inibindo assim as respostas imunológicas, incluindo aquelas dirigidas contra o tumor. A IL-2 também tem um papel crucial no início da morte celular induzida por ativação (AICD), um processo que leva à eliminação de células T autorreativas, enquanto a IL-15 é um fator anti-apoptótico para células T (Marks-Konczalik et al., 2000).

Foi demonstrado que a IL-15 co-distribuída com vacinas de peptídeo de HIV supera a deficiência de células T CD4+, promovendo a longevidade das células T CD8+ específicas do antígeno e bloqueando a apoptose mediada por TRAIL (Oh et al., 2008). Além disso, a IL-15 promove a manutenção a longo prazo das células T de memória CD8+CD44hi (Kanegane et al., 1996).

[0084] A importância de IL-15 e IL-15Rα para o desenvolvimento de células T e NK é ainda destacada pelo fenótipo de camundongos IL-15Rα$^{-/-}$ e IL-15$^{-/-}$. Camundongos knockout demonstram diminuição do número de células T CD8+ totais e são deficientes em células T CD8+ de fenótipo de memória, células NK, células NK/T e alguns subconjuntos de linfócitos intraepiteliais intestinais, indicando que IL-15 fornece funções homeostáticas positivas essenciais para esses subconjuntos de células (Lodolce et al., 1996; Kennedy et al., 1998). As semelhanças nos fenótipos dessas duas cepas de camundongos knockout sugerem a importância de IL-15Rα na manutenção de sinais de IL-15 fisiologicamente relevantes.

[0085] A IL-15 é apresentada em trans pela cadeia alfa do receptor de IL-15 para o complexo IL-15Rβγc exibido na superfície das células T e células natural killer (NK) (Han et al., 2011). A cadeia de IL-15Ra desempenha um papel de proteína chaperona, estabiliza e aumenta a atividade de IL-15 (Desbois et al., 2016). Foi demonstrado que a IL-15 exógena pode ter um impacto limitado em pacientes com câncer devido a sua dependência de IL-15Ra frequentemente regulada negativamente em pacientes com câncer. Portanto, a proteína de fusão RLI, composta pelo domínio sushi+ de IL15Ra acoplado por meio de um ligante à IL-15, foi sugerida como uma abordagem alternativa para a terapia com IL15 (Bessard et al., 2009). Verificou-se que a administração de complexos solúveis IL-15/IL-15Rα aumentaram muito a meia-vida sérica de IL-15 e a biodisponibilidade in vivo (Stoklasek et al., 2010).

[0086] Além dos efeitos nas células T e NK, a IL-15 também tem vários efeitos em outros componentes do sistema imunológico. A IL-15 protege os neutrófilos da apoptose, modula a fagocitose e estimula a secreção de IL-8 e do

antagonista de IL-1R. Funciona através da ativação de JAK2, p38 e ERK1/2 MAPK, Syk quinase e o fator de transcrição NF-kB (Pelletier et al., 2002). Nos mastócitos, a IL-15 pode atuar como fator de crescimento e inibidor da apoptose. Nessas células, a IL-15 ativa a via JAK2/STAT5 sem a necessidade de ligação γc (Tagaya et al., 1996). A IL-15 também induz a proliferação e diferenciação de linfócitos B e aumenta a secreção de imunoglobulina (Armitage et al., 1995). Também previne a apoptose mediada por Fas e permite a indução de respostas de anticorpos parcialmente independentes do CD4-help (Demerci et al., 2004; Steel et al., 2010). Monócitos, macrófagos e células dendríticas efetivamente transcrevem e traduzem IL-15. Eles também respondem à estimulação de IL-15. Os macrófagos respondem aumentando a fagocitose, induzindo a expressão de IL-8, IL-12 e MCP-1 e secretando IL-6, IL-8 e TNF α (Budagian et al., 2006). As células dendríticas incubadas com IL-15 demonstram maturação com expressão aumentada de CD83, CD86, CD40 e MHC de classe II, também são resistentes à apoptose e mostram secreção aumentada de interferon-γ (Anguille et al., 2009).

[0087] IL-15 também demonstrou ter efeitos em células não hematológicas, incluindo miócitos, adipócitos, células endoteliais e neurais. A IL-15 tem um efeito anabólico no músculo e pode apoiar a diferenciação das células musculares (Quinn et al., 1995). Estimula os miócitos e as fibras musculares a acumularem proteínas contráteis e é capaz de retardar a perda de massa muscular em ratos com caquexia relacionada ao câncer (Figueras et al., 2004). A IL-15 também demonstrou estimular a angiogênese (Angiolillo et al., 1997) e induzir o crescimento e sobrevivência da microglia (Hanisch et al., 1997).

[0088] A interleucina-7 (IL-7), também da família IL-2/IL-15, é uma citocina pleiotrópica bem caracterizada e é expressa por células estromais, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, células de músculo liso e queratinócitos, e após a ativação, por células dendríticas (Alpdogan et al., 2005). Embora tenha sido originalmente descrito como um fator de crescimento e diferenciação para linfócitos B precursores, estudos subsequentes mostraram

que a IL-7 está criticamente envolvida no desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T. A sinalização da interleucina-7 é essencial para a função ideal das células T CD8, homeostase e estabelecimento da memória (Schluns et al., 2000); é necessário para a sobrevivência da maioria dos subconjuntos de células T e sua expressão foi proposta como importante para regular o número de células T.

[0089] A IL-7 se liga a um receptor dimérico, incluindo IL-7Rα e γ_c para formar um complexo ternário que desempenha papéis fundamentais na remodelação da matriz extracelular, desenvolvimento e homeostase de células T e B (Mazzucchelli e Durum, 2007). A IL-7Rα também apresenta reação cruzada para formar um complexo ternário com linfopoietina estromal tímica (TSLP) e seu receptor (TSLPR), e ativa a via de TSLP, resultando em proliferação de células T e dendríticas em humanos e posterior desenvolvimento de células B em camundongos (Leonard, 2002). A regulação rígida das cascatas de sinalização ativadas pelos complexos são, portanto, cruciais para a função celular normal. A subestimulação da via da IL-7 causada por mutações no ectodomínio IL-7Rα inibe o desenvolvimento de células T e B, resultando em pacientes com uma forma de imunodeficiência combinada grave (SCID) (Giliani et al., 2005; Puel et al., 1998).

[0090] A IL-7 tem um papel potencial no aumento da reconstituição imunológica em pacientes com câncer após quimioterapia citotóxica. A terapia com IL-7 aumenta a reconstituição imunológica e pode aumentar até mesmo a função tímica limitada, facilitando a expansão periférica de até mesmo um pequeno número de emigrantes tímicos recentes. Portanto, a terapia com IL-7 pode potencialmente reparar o sistema imunológico de pacientes que foram esgotados pela quimioterapia citotóxica (Capitini et al., 2010).

[0091] A interleucina-12 (IL-12) é um heterodímero ligado por dissulfeto de duas subunidades codificadas separadamente (p35 e p40), que estão ligadas covalentemente para dar origem à chamada molécula heterodimérica bioativa (p70) (Lieschke et al., 1997; Jana et al., 2014). Além de formar heterodímeros

(IL-12 e IL-23), a subunidade p40 também é segregada como um monômero (p40) e um homodímero ($p40_2$). É conhecido na técnica que a síntese do heterodímero como uma única cadeia com um ligante conectando o p35 à subunidade p40 preserva a atividade biológica completa do heterodímero. A IL-12 desempenha um papel crítico na resposta inflamatória inicial à infecção e na geração de células Th1, que favorecem a imunidade mediada por células. Foi descoberto que a superprodução de IL-12 pode ser perigosa para o hospedeiro porque está envolvida na patogênese de uma série de doenças inflamatórias autoimunes (por exemplo, EM, artrite, diabetes tipo 1).

[0092] O receptor de IL-12 (IL-12R) é um complexo heterodimérico que consiste nas cadeias IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 expressas na superfície de células T ativadas e células natural killer (Trinchieri et al., 2003). A cadeia IL-12Rβ1 se liga à subunidade IL-12p40, enquanto IL-12p35 em associação com IL-12Rβ2 confere uma capacidade de sinalização intracelular (Benson et al., 2011). A transdução de sinal através do IL-12R induz a fosforilação da Janus quinase (Jak2) e da tirosina quinase (Tyk2), que fosforilam e ativam o transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) 1, STAT3, STAT4 e STAT5. Os efeitos celulares específicos da IL-12 são devidos principalmente à ativação de STAT4. IL-12 induz e células T e natural killer a produzirem citocinas, em particular interferon (IFN)γ, que medeiam muitas das atividades pró-inflamatórias de IL-12, incluindo diferenciação de células T CD4+ em direção ao fenótipo Th1 (Montepaone et al., 2014).

[0093] As células T reguladoras suprimem ativamente a ativação do sistema imunológico e previnem a autorreatividade patológica e a consequente doença autoimune. O desenvolvimento de drogas e métodos para ativar seletivamente células T reguladoras para o tratamento de doenças autoimunes é o assunto de intensa pesquisa e, até o desenvolvimento da presente invenção, que pode distribuir seletivamente interleucinas ativas no local da inflamação, tem sido amplamente malsucedido. As células T reguladoras (Treg) são uma classe de células T CD4+CD25+ que suprimem a atividade de outras células do sistema

imunológico. Tregs são centrais para a homeostase do sistema imunológico e desempenham um papel importante na manutenção da tolerância a autoantígenos e na modulação da resposta imunológica a antígenos estranhos. Múltiplas doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo diabetes tipo 1 (T1D), lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), mostraram ter uma deficiência no número de células Treg ou na função Treg.

[0094] Consequentemente, há grande interesse no desenvolvimento de terapias que aumentem o número e/ou função das células Tregs. Uma abordagem de tratamento para doenças autoimunes sendo investigadas é o transplante de células Treg autólogas, ex vivo expandidas (Tang, Q., et al, 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med., 3: 1-15). Embora essa abordagem tenha se mostrado promissora no tratamento de modelos animais de doença e em vários testes clínicos em humanos em estágio inicial, ela requer tratamento personalizado com as próprias células T do paciente, é invasiva e tecnicamente complexa. Outra abordagem é o tratamento com baixa dose de Interleucina-2 (IL-2). As células Treg expressam caracteristicamente altos níveis constitutivos do receptor de alta afinidade IL-2, IL2Rαβγ, que é composto pelas subunidades IL2Rα (CD25), IL2Rβ (CD122) e IL2Rγ (CD132), e o crescimento das células Treg mostrou ser dependente em IL-2 (Malek, TR, et al., 2010, Immunity, 33: 153-65).

[0095] Por outro lado, a ativação imune também foi alcançada usando IL-2, e IL-2 recombinante (Proleukin®) foi aprovado para tratar certos tipos de câncer. A IL-2 em alta dose é usada para o tratamento de pacientes com melanoma metastático e carcinoma de células renais metastático com impacto de longo prazo na sobrevida global.

[0096] Ensaios clínicos de tratamento de dose baixa de IL-2 de GVHD crônica (Koreth, J., et al., 2011, N Engl J Med., 365: 2055-66) e pacientes com vasculite autoimune associada ao VHC (Saadoun, D., et al., 2011, N Engl J Med., 365: 2067-77) demonstraram níveis aumentados de Treg e sinais de eficácia

clínica. Novos estudos clínicos investigando a eficácia da IL-2 em várias outras doenças autoimunes e inflamatórias foram iniciados. A justificativa para o uso da chamada dose baixa de IL-2 era explorar a alta afinidade de IL-2 do receptor trimérico de IL-2, que é expresso constitutivamente em Tregs, deixando outras células T que não expressam o receptor de alta afinidade em células inativadas Estado. Aldesleucina (comercializada como Proleukin® por Prometheus Laboratories, San Diego, CA), a forma recombinante de IL-2 usada nesses ensaios, está associada a alta toxicidade. A aldesleucina, em altas doses, é aprovada para o tratamento de melanoma metastático e câncer renal metastático, mas seus efeitos colaterais são tão graves que seu uso só é recomendado em um ambiente hospitalar com acesso a cuidados intensivos (endereço eletrônico: www.proleukin.com/assets/pdf/proleukin.pdf).

[0097] Os ensaios clínicos de IL-2 em doenças autoimunes empregaram doses mais baixas de IL-2 para atingir as células Treg, porque as células Treg respondem a concentrações mais baixas de IL-2 do que muitos outros tipos de células imunes devido à sua expressão de IL2R alfa (Klatzmann D, 2015 Nat Rev Immunol. 15: 283-94). No entanto, mesmo essas doses mais baixas resultaram em problemas de segurança e tolerabilidade, e os tratamentos usados empregaram injeções subcutâneas diárias, cronicamente ou em cursos de tratamento intermitentes de 5 dias. Portanto, há uma necessidade de uma terapia de doença autoimune que potencialize o número e a função das células Treg, que atinja as células Treg mais especificamente do que a IL-2, que seja mais segura e mais tolerável e que seja administrada com menos frequência.

[0098] Uma abordagem que foi sugerida para melhorar o índice terapêutico da terapia baseada em IL-2 para doenças autoimunes é o uso de variantes de IL-2 que são seletivas para células Treg em relação a outras células imunes. Os receptores de IL-2 são expressos em uma variedade de diferentes tipos de células imunes, incluindo células T, células NK, eosinófilos e monócitos, e esse amplo padrão de expressão provavelmente contribui para seu efeito pleiotrópico no sistema imunológico e alta toxicidade sistêmica. Em particular, as

células T efetoras ativadas expressam IL2Rαβγ, assim como as células epiteliais pulmonares. Mas, a ativação de células T efetoras vai diretamente contra o objetivo de modulação negativa e controle de uma resposta imune, e a ativação de células epiteliais pulmonares leva a conhecidos efeitos colaterais limitantes da dose de IL-2, incluindo edema pulmonar. Na verdade, o principal efeito colateral da imunoterapia com IL-2 em alta dose é a síndrome de vazamento vascular (VLS), que leva ao acúmulo de fluido intravascular em órgãos como pulmões e fígado com subsequente edema pulmonar e dano às células hepáticas. Não há tratamento de VLS além da retirada de IL-2. Os regimes de dose baixa de IL-2 foram testados em pacientes para evitar VLS, entretanto, às custas de resultados terapêuticos subótimos.

[0099] De acordo com a literatura, acredita-se que a VLS seja causada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias de células NK ativadas por IL-2. No entanto, há algumas evidências de que o edema pulmonar resulta da ligação direta de IL-2 às células endoteliais pulmonares, que expressaram níveis baixos a intermediários de IL-2Rs αβγ funcionais. E, o edema pulmonar associado à interação de IL-2 com células endoteliais pulmonares foi anulado pelo bloqueio da ligação a CD25 com um anticorpo monoclonal anti-CD25 (mAb), em camundongos hospedeiros deficientes em CD25 ou pelo uso de complexos IL-2/anti-IL-2 mAb (IL-2/mAb) específicos para CD122, evitando assim a VLS.

[00100] O tratamento com citocinas de interleucina diferentes de IL-2 tem sido mais limitado. A IL-15 apresenta atividade estimulante de células imunes semelhante à da IL-2, mas sem os mesmos efeitos inibitórios, tornando-a uma candidata imunoterapêutica promissora. Os ensaios clínicos de IL-15 humana recombinante para o tratamento de melanoma maligno metastático ou câncer de células renais demonstraram mudanças apreciáveis na distribuição, proliferação e ativação de células imunes e sugeriram atividade antitumoral potencial (Conlon et. Al., 2014). A IL-15 está atualmente em ensaios clínicos para tratar várias formas de câncer. No entanto, a terapia com IL-15 é conhecida por estar associada a efeitos indesejáveis e tóxicos, como exacerbar certas

leucemias, doença do enxerto contra hospedeiro, hipotensão, trombocitopenia e lesão hepática. (Mishra A., et al., Cancer Cell, 2012, 22 (5): 645-55; Alpdogan O. et al., Blood, 2005, 105 (2): 866-73; Conlon KC et al., J Clin Oncol, 2015, 33 (1): 74-82.)

[00101] A IL-7 promove o desenvolvimento de linfócitos no timo e mantém a sobrevivência da homeostase das células T naive e de memória na periferia. Além disso, é importante para a organogênese dos linfonodos (LN) e para a manutenção de células T ativadas recrutadas para os órgãos linfoides secundários (SLOs) (Gao et. Al., 2015). Em ensaios clínicos de IL-7, os pacientes que receberam IL-7 mostraram aumentos nas células T CD4+ e CD8+, sem aumento significativo no número de células T reguladoras monitoradas pela expressão de FoxP3 (Sportes et al., 2008). Em ensaios clínicos relatados em 2006, 2008 e 2010, pacientes com diferentes tipos de câncer, como melanoma metastático ou sarcoma, foram injetados por via subcutânea com diferentes doses de IL-7. Pouca toxicidade foi observada, exceto por febres transitórias e eritema leve. Os níveis circulantes de células T CD4+ e CD8+ aumentaram significativamente e o número de Tregs foi reduzido. A diversidade do repertório de TCR aumentou após a terapia com IL-7. No entanto, a atividade antitumoral de IL-7 não foi bem avaliada (Gao et. Al., 2015). Os resultados sugerem que a terapia com IL-7 pode aumentar e ampliar as respostas imunológicas.

[00102] A IL-12 é uma citocina pleiotrópica, cujas ações criam uma interconexão entre a imunidade inata e adaptativa. A IL-12 foi descrita pela primeira vez como um fator secretado por linhas de células B transformadas por EBV induzidas por PMA. Com base em suas ações, a IL-12 foi designada como fator de maturação de linfócitos citotóxicos e fator estimulante de células natural killer. Devido à ligação entre a imunidade inata e adaptativa e ao estímulo potente da produção de IFNγ, uma citocina que coordena os mecanismos naturais de defesa anticâncer, a IL-12 parecia a candidata ideal para a imunoterapia tumoral em humanos. No entanto, os efeitos colaterais graves associados à administração sistêmica de IL-12 em investigações clínicas e o

índice terapêutico muito estreito dessa citocina diminuíram acentuadamente o entusiasmo pelo uso desta citocina em pacientes com câncer (Lasek et. Al., 2014). Abordagens para terapia com IL-12 em que a distribuição da citocina é direcionada ao tumor, o que pode diminuir alguns dos problemas anteriores com terapia com IL-12, estão atualmente em ensaios clínicos para câncer.

[00103] O uso direto da IL-2 como agonista para ligar-se ao IL-2R e modular as respostas imunes terapeuticamente tem sido problemático devido aos seus riscos terapêuticos bem documentados, por exemplo, sua meia-vida sérica curta e alta toxicidade. Esses riscos também limitaram o desenvolvimento terapêutico e o uso de outras citocinas. São necessárias novas formas de citocinas que reduzam esses riscos. São divulgados neste documento composições e métodos compreendendo IL-2 e IL-15 e outras citocinas, fragmentos funcionais e muteínas de citocinas, bem como citocinas condicionalmente ativas projetadas para abordar esses riscos e fornecer a terapêutica imunomoduladora necessária.

[00104] A presente invenção é projetada para abordar as deficiências da terapia direta com IL-2 e terapia usando outras citocinas, por exemplo, usando frações de bloqueio de citocinas, por exemplo, polipeptídeos de bloqueio estérico, polipeptídeos de prolongamento da meia-vida do soro, polipeptídeos de direcionamento, polipeptídeos de ligação, incluindo ligantes peptídicos cliváveis por protease, e combinações dos mesmos. Citocinas, incluindo interleucinas (por exemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 IL-23), interferons (IFNs, incluindo IFNalfa, IFNbeta e IFNgama), fatores de necrose tumoral (por exemplo, TNFalfa, linfotoxina), fatores de crescimento de transformação (por exemplo, TGFbeta1, TGFbeta2, TGFbeta3), quimiocinas (motivo C-X-C quimiocina 10 (CXCL10), CCL19, CCL20, CCL21) e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CS) são altamente potentes quando administrados a pacientes. Conforme usado neste documento, "quimiocina" significa uma família de pequenas citocinas com a capacidade de induzir quimiotaxia dirigida em células responsivas próximas. As citocinas podem fornecer terapia poderosa, mas são

acompanhadas por efeitos indesejáveis que são difíceis de controlar clinicamente e que limitaram o uso clínico de citocinas. Esta divulgação se refere a novas formas de citocinas que podem ser usadas em pacientes com efeitos indesejados reduzidos ou eliminados. Em particular, esta divulgação se refere a composições farmacêuticas, incluindo polipeptídeos quiméricos (proteínas de fusão), ácidos nucleicos que codificam proteínas de fusão e formulações farmacêuticas das anteriores que contêm citocinas ou fragmentos ativos ou muteínas de citocinas que têm atividade de ativação de receptor de citocina diminuída em comparação com o correspondente citocina. No entanto, sob condições selecionadas ou em um ambiente biológico selecionado, os polipeptídeos quiméricos ativam seus receptores cognatos, muitas vezes com a mesma ou maior potência que a citocina de ocorrência natural correspondente. Conforme descrito neste documento, isso é tipicamente alcançado usando uma fração de bloqueio de citocina que bloqueia ou inibe a função de ativação do receptor da citocina, fragmento ativo ou muteína da mesma sob condições gerais, mas não sob condições selecionadas, tais como aquelas presentes no local desejado de atividade da citocina (por exemplo, um sítio inflamatório ou um tumor).

[00105] Os polipeptídeos quiméricos e ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos quiméricos podem ser feitos usando qualquer método adequado. Por exemplo, ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo quimérico podem ser feitos usando técnicas de DNA recombinante, química sintética ou combinações dessas técnicas e expressos em um sistema de expressão adequado, como em células CHO. Polipeptídeos quiméricos podem ser produzidos de forma semelhante, por exemplo, por expressão de um ácido nucleico adequado, usando técnicas químicas sintéticas ou semissintéticas e semelhantes. Em algumas modalidades, a fração de bloqueio pode ser anexada ao polipeptídeo de citocina por meio de conjugação mediada por sortase. "Sortases" são transpeptidases que modificam proteínas reconhecendo e clivando um sinal de classificação de terminal carboxila incorporado ou

terminalmente ligado a uma proteína ou peptídeo alvo. Sortase A catalisa a clivagem do motivo LPXTG (SEQ ID No: 193) (onde X é qualquer aminoácido padrão) entre o resíduo Thr e Gly na proteína alvo, com ligação transitória do resíduo Thr ao resíduo Cys do local ativo na enzima, formando um intermediário enzima-tioacila. Para completar a transpeptidação e criar o conjugado peptídeo-monômero, uma biomolécula com um grupo nucleofílico N-terminal, tipicamente um motivo de oligoglicina, ataca o intermediário, deslocando a Sortase A e unindo as duas moléculas.

[00106] Para formar a proteína de fusão da fração de bloqueio de citocina, o polipeptídeo de citocina é primeiro marcado no terminal N com uma sequência de poliglicina ou, alternativamente, com no terminal C com um motivo LPXTG (SEQ ID NO: 193). A fração de bloqueio ou outro elemento tem respectivos peptídeos anexados que servem como sítios aceitadores para os polipeptídeos marcados. Para a conjugação com domínios que transportam um peptídeo aceitador LPXTG (SEQ ID NO: 193) ligado através de seu terminal N, o polipeptídeo será marcado com um trecho de poliglicina N-terminal. Para a conjugação com o domínio que transporta um peptídeo poliglicina ligado através do seu terminal C, o polipeptídeo será marcado no seu terminal C com uma sequência de reconhecimento de sortase LPXTG (SEQ ID NO: 193). Reconhecendo as sequências de poliglicina e LPXTG (SEQ ID NO: 193), a sortase formará uma ligação peptídica entre o polímero-peptídeo e os polipeptídeos marcados. A reação sortase cliva os resíduos de glicina como intermediários e ocorre em temperatura ambiente.

[00107] Uma variedade de mecanismos pode ser explorada para remover ou reduzir a inibição causada pela fração de bloqueio. Por exemplo, as composições farmacêuticas podem incluir uma fração de citocina e uma fração de bloqueio, por exemplo, uma fração de bloqueio estérico, com um ligante clivável por protease compreendendo um sítio de clivagem de protease localizado entre a citocina e a fração de bloqueio de citocina ou dentro da fração de bloqueio de citocina. Quando o sítio de clivagem da protease é clivado, a

fração de bloqueio pode se dissociar da citocina e a citocina pode então ativar o receptor de citocina. Uma fração de citocina também pode ser bloqueada por uma fração de bloqueio específica, como um anticorpo, que se liga a um epítopo encontrado na citocina relevante.

[00108] Qualquer ligante peptídico adequado pode ser usado. Por exemplo, o ligante peptídico pode compreender glicina-glicina, um motivo de reconhecimento de sortase ou um motivo de reconhecimento de sortase e uma sequência de peptídeos $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO: 195) ou $(Gly_3Ser)_n$, (SEQ ID NO.: 196) em que n é 1, 2, 3, 4 ou 5. Normalmente, o motivo de reconhecimento de sortase compreende uma sequência de peptídeos LPXTG (SEQ ID NO: 193), em que X é qualquer aminoácido. Em algumas modalidades, a ligação covalente é entre um resíduo de lisina reativo ligado ao terminal C do polipeptídeo de citocina e um ácido aspártico reativo ligado ao terminal N do bloqueador ou outro domínio. Em algumas modalidades, a ligação covalente é entre um resíduo de ácido aspártico reativo ligado ao terminal N do polipeptídeo de citocina e um resíduo de lisina reativo ligado ao terminal C de tal bloqueador ou outro domínio.

[00109] Por conseguinte, conforme descrito em detalhes neste documento, as frações de bloqueio de citocina usadas podem ser bloqueadores estéricos. Conforme usado neste documento, um "bloqueador estérico" refere-se a um polipeptídeo ou fração de polipeptídeo que pode ser covalentemente ligado a um polipeptídeo de citocina direta ou indiretamente através de outras frações, tais como ligantes peptídicos, por exemplo, na forma de um polipeptídeo quimérico (proteína de fusão), mas, do contrário, não se liga covalentemente ao polipeptídeo de citocina. Um bloqueador estérico pode se ligar de forma não covalente ao polipeptídeo de citocina, por exemplo, por ligação eletrostática, hidrofóbica, iônica ou de hidrogênio. Um bloqueador estérico normalmente inibe ou bloqueia a atividade da fração de citocina devido à sua proximidade com a fração de citocina e tamanho comparativo. A inibição estérica da fração de citocina pode ser removida separando espacialmente a fração de citocina do bloqueador estérico, tal como clivando enzimaticamente uma proteína de fusão

que contém um bloqueador estérico e um polipeptídeo de citocina em um sítio entre o bloqueador estérico e o polipeptídeo de citocina.

[00110] Conforme descrito em mais detalhes neste documento, a função de bloqueio pode ser combinada com ou devido à presença de componentes funcionais adicionais na composição farmacêutica, como um domínio de direcionamento, um elemento de prolongamento da meia-vida sérica e polipeptídeos de ligação cliváveis por protease. Por exemplo, um polipeptídeo que prolonga a meia-vida sérica também pode ser um bloqueador estérico.

[00111] No interesse de apresentar uma divulgação concisa do escopo completo da invenção, aspectos da invenção são descritos em detalhes usando a citocina IL-2 como uma citocina exemplificativa. No entanto, a invenção e esta divulgação não estão limitadas a IL-2. Será claro para um versado na técnica que esta divulgação, incluindo os métodos, polipeptídeos e ácidos nucleicos divulgados, descreve e permite de forma adequada o uso de outras citocinas, fragmentos e muteínas, como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 IL-23, IFNalfa, IFNbeta, IFNgama, TNFalfa, linfotoxina, TGF-beta1, TGFbeta2, TGFbeta3, GM-CSF, CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21 e funcional fragmentos ou muteínas de qualquer um dos anteriores.

[00112] Vários elementos asseguram a entrega e a atividade de IL-2 preferencialmente no local da atividade de IL-2 desejada e limitam severamente a exposição sistêmica à interleucina por meio de uma estratégia de bloqueio e/ou direcionamento preferencialmente ligada a uma estratégia de prolongamento da meia-vida sérica. Nessa estratégia de prolongamento da meia-vida sérica, a versão bloqueada da interleucina circula por períodos prolongados (preferencialmente 1-2 ou mais semanas), mas a versão ativada tem a meia-vida sérica típica da interleucina.

[00113] Em comparação com uma versão prolongada de meia-vida sérica, a meia-vida sérica de IL-2 administrada por via intravenosa é de apenas ~10 minutos devido à distribuição no espaço extracelular do corpo total, que é grande, ~15 L em um adulto de tamanho médio. Posteriormente, a IL-2 é

metabolizada pelos rins com meia-vida de ~2,5 horas. (Smith, K. "Interleukin 2 immunotherapy." *Therapeutic Immunology* 240 (2001)). Por outras medições, IL-2 tem uma meia-vida plasmática muito curta de 85 minutos para administração intravenosa e 3,3 horas para administração subcutânea (Kirchner, GI, et al., 1998, Br J Clin Pharmacol. 46: 5-10). Em algumas modalidades desta invenção, o elemento de prolongamento da meia-vida está ligado à interleucina por meio de um ligante peptídico que é clivado no sítio de ação (por exemplo, por proteases específicas de inflamação ou tumor), liberando a atividade total da interleucina no sítio desejado e também separando-o do prolongamento da meia-vida da versão não clivada. Em tais modalidades, a interleucina totalmente ativa e livre teria propriedades farmacocinéticas (pK) muito diferentes - uma meia-vida de horas em vez de semanas. Além disso, a exposição à citocina ativa é limitada ao sítio da atividade desejada da citocina (por exemplo, um sítio inflamatório ou tumor) e a exposição sistêmica à citocina ativa e a toxicidade associada e os efeitos colaterais são reduzidos.

[00114] Outras citocinas previstas nesta invenção têm farmacologia semelhante (por exemplo, IL-15 conforme relatado por Blood 2011 117: 4787-4795; doi: doi.org/10.1182/blood-2010-10-311456) à IL-2 e, consequentemente, os projetos desta invenção aborda as deficiências de usar esses agentes diretamente e fornece polipeptídeos quiméricos que podem ter meia-vida prolongada e/ou ser direcionados a um sítio de atividade desejada (por exemplo, um sítio de inflamação ou um tumor).

[00115] Se desejado, IL-2 pode ser projetada para ligar o complexo IL-2R geralmente ou uma das três subunidades IL-2R especificamente com uma afinidade que difere daquela da IL-2 de tipo selvagem correspondente, por exemplo, para ativar seletivamente Tregs ou Teff. Por exemplo, os polipeptídeos da IL-2 que se diz terem maior afinidade para a forma trimérica do receptor da IL-2 em relação à forma beta/gama dimérica do receptor da IL-2 em comparação com a IL-2 de tipo selvagem podem ter uma sequência de aminoácidos que inclui um dos seguintes conjuntos de mutações em relação à SEQ ID NO: 1 (uma

proteína IL-2 madura compreendendo os aminoácidos 21-153 de IL-2 humana com o Nº de Acesso Uniprot P60568-1): (a) K64R, V69A e Q74P; (b) V69A, Q74P e T101A; (c) V69A, Q74P e I128T; (d) N30D, V69A, Q74P e F103S; (e) K49E, V69A, A73V e K76E; (f) V69A, Q74P, T101A e T133N; (g) N30S, V69A, Q74P e 1128A; (h) V69A, Q74P, N88D e S99P; (i) N30S, V69A, Q74P e 1128T; (j) K9T, Q11R, K35R, V69A e Q74P; (k) A1T, M46L, K49R, E61D, V69A e H79R; (l) K48E, E68D, N71T, N90H, F103S e 1114V; (m) S4P, T10A, Q11R, V69A, Q74P, N88D e T133A; (n) E15K, N30S Y31H, K35R, K48E, V69A, Q74P e 192T; (o) N30S, E68D, V69A, N71A, Q74P, S75P, K76R e N90H; (p) N30S, Y31C, T37A, V69A, A73V, Q74P, H79R e I128T; (q) N26D, N29S, N30S, K54R, E67G, V69A, Q74P e I92T; (r) K8R, Q13R, N26D, N30T, K35R, T37R, V69A, Q74P e I92T; e (s) N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D e I89V. Esta abordagem também pode ser aplicada para preparar muteínas de outras citocinas, incluindo interleucinas (por exemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23), interferons (IFNs, incluindo IFNalfa, IFNbeta e IFNgama), fatores de necrose tumoral (por exemplo, TNFalfa, linfotoxina), fatores de crescimento transformadores (por exemplo, TGFbeta1, TGFbeta2, TGFbeta3) e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CS). Por exemplo, podem ser preparadas muteínas que possuem a afinidade de ligação desejada para um receptor cognato.

[00116] Como observado acima, qualquer um dos polipeptídeos mutantes de IL-2 divulgados neste documento pode incluir as sequências descritas; eles também podem ser limitados às sequências descritas e de outra forma idênticas à SEQ ID NO: 1. Além disso, qualquer um dos polipeptídeos mutantes de IL-2 divulgados neste documento pode incluir opcionalmente uma substituição do resíduo de cisteína na posição 125 por outro resíduo (por exemplo, serina) e/ou pode incluir opcionalmente uma deleção do resíduo de alanina na posição 1 de SEQ ID NO: 1.

[00117] Outra abordagem para melhorar o índice terapêutico de uma terapia baseada em IL-2 é otimizar a farmacocinética da molécula para ativar ao

máximo as células Treg. Os primeiros estudos da ação de IL-2 demonstraram que a estimulação de IL-2 da proliferação de células T humanas *in vitro* exigiu um mínimo de 5-6 horas de exposição a concentrações eficazes de IL-2 (Cantrell, DA, et. Al., 1984, Science, 224: 1312-1316). Quando administrada a pacientes humanos, a IL-2 tem uma meia-vida plasmática muito curta de 85 minutos para administração intravenosa e 3,3 horas para administração subcutânea (Kirchner, GI, et al., 1998, Br J Clin Pharmacol. 46: 5-10). Devido à sua meia-vida curta, manter a IL-2 circulante no nível ou acima do necessário para estimular a proliferação de células T pela duração necessária exige altas doses que resultam em níveis de pico de IL-2 significativamente acima do EC50 para células Treg ou exigirá administração. Estes altos níveis de pico de IL-2 podem ativar os receptores IL2Rβγ e ter outros efeitos indesejados ou indesejados, por exemplo VLS, como observado acima. Um análogo de IL-2 ou uma proteína multifuncional com IL-2 ligada a um domínio que permite a ligação ao receptor FcRn, com uma meia-vida circulante mais longa do que IL-2, pode atingir uma concentração da droga alvo por um período de tempo especificado em uma dose mais baixa do que IL-2 e com níveis de pico mais baixos. Tal análogo de IL-2 irá, portanto, requerer doses mais baixas ou administração menos frequente do que IL-2 para estimular efetivamente as células Treg. A administração subcutânea menos frequente de uma droga de IL-2 também será mais tolerável para os pacientes. Um tratamento com essas características se traduzirá clinicamente em eficácia farmacológica melhorada, toxicidade reduzida e adesão melhorada do paciente à terapia. Alternativamente, a IL-2 ou muteínas de IL-2 (neste documento, "IL-2*") podem ser direcionados seletivamente para o sítio de ação pretendido (por exemplo, sítios de inflamação ou um tumor). Este direcionamento pode ser alcançado por uma de várias estratégias, incluindo a adição de domínios ao agente administrado que compreende bloqueadores da IL-2 (ou muteínas) que são clivados ou por domínios de direcionamento ou uma combinação dos dois.

[00118] Em algumas modalidades, os agonistas parciais de IL-2* podem

ser adaptados para se ligarem com maior ou menor afinidade, dependendo do alvo desejado; por exemplo, uma IL-2* pode ser projetada para se ligar com afinidade aumentada a uma das subunidades do receptor e não às outras. Esses tipos de agonistas parciais, ao contrário dos agonistas completos ou antagonistas completos, oferecem a capacidade de ajustar as propriedades de sinalização a uma amplitude que elicia as propriedades funcionais desejadas, embora não atenda aos limites para propriedades indesejadas. Dadas as atividades diferenciais dos agonistas parciais, um repertório de variantes de IL-2 pode ser projetado para exibir um grau ainda mais fino de atividades de sinalização distintas, variando de quase total a agonismo parcial a antagonismo completo.

[00119] Em algumas modalidades, a IL-2* alterou a afinidade para IL-2Rα. Em algumas modalidades, a IL-2* tem uma afinidade maior para IL-2Rα do que a IL-2 de tipo selvagem. Em outras modalidades, a IL-2* alterou a afinidade para IL-2Rβ. Em uma modalidade, a IL-2* aumentou a afinidade de ligação para IL-2Rβ, por exemplo, o terminal N de IL-2Rβ, que elimina o requisito funcional para IL-2Rα. Em outra modalidade, é gerada uma IL-2* que tem afinidade de ligação aumentada para IL-2Rβ, mas que exibiu ligação diminuída a IL-2Rγ e, portanto, é heterodimerização e sinalização de IL-2Rβγ defeituosa.

[00120] As frações de bloqueio, descritas em mais detalhes abaixo, também podem ser usadas para favorecer a ligação ou ativação de um ou mais receptores. Em uma modalidade, as frações de bloqueio são adicionadas de modo que a ligação ou ativação de IL-2Rβγ seja bloqueada, mas a ligação ou ativação de IL-2Rα não seja alterada. Em outra modalidade, as frações de bloqueio são adicionadas de modo que a ligação ou ativação de IL-2Rα seja diminuída. Em outra modalidade, as frações de bloqueio são adicionadas de modo que a ligação e/ou ativação de todos os três receptores seja inibida. Este bloqueio pode ser aliviado pela remoção das frações de bloqueio em um ambiente particular, por exemplo, por clivagem proteolítica de um ligante que liga uma ou mais frações de bloqueio à citocina.

[00121] Uma abordagem semelhante pode ser aplicada para melhorar outras citocinas, particularmente para uso como agentes imunoestimulantes, por exemplo, para o tratamento de câncer. Por exemplo, neste aspecto, a farmacocinética e/ou farmacodinâmica da citocina (por exemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 IL-23, IFNalfa, IFNbeta e IFNgama, TNFalfa, linfotoxina, TGFbeta1, TGFbeta2, TGFbeta3 GM-CSF, CXCL10, CCL19, CCL20 e CCL21 podem ser adaptados para ativar ao máximo as células efetoras (por exemplo, células T de efeito, células NK) e/ou células promotoras da resposta imune citotóxica (por exemplo, induzir a maturação de células dendríticas) em um sítio de atividade desejada, como em um tumor, mas preferencialmente de forma não sistêmica.

[00122] Assim, são fornecidas neste documento composições farmacêuticas compreendendo pelo menos um polipeptídeo de citocina, como interleucinas (por exemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23), interferons (IFNs, incluindo IFNalfa, IFNbeta e IFNgama), fatores de necrose tumoral (por exemplo, TNFalfa, linfotoxina), fatores de crescimento transformadores (por exemplo, TGFbeta1, TGFbeta2, TGFbeta3), quimiocinas (por exemplo, CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21) e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CS) ou um fragmento funcional ou muteína de qualquer um dos anteriores. O polipeptídeo normalmente também inclui pelo menos uma sequência de aminoácidos de ligante peptídico, em que a sequência de aminoácidos é, em certas modalidades, capaz de ser clivada por uma protease endógena. Em uma modalidade, o ligante peptídico compreende uma sequência de aminoácidos compreendendo HSSKLQ (SEQ ID NO: 25), GPLGVRG (SEQ ID NO: 197), IPVSLRSG (SEQ ID NO: 198), VPLSLYSG (SEQ ID NO. 199) ou SGESPAYYTA (SEQ ID NO. 200). Em outras modalidades, o polipeptídeo quimérico contém ainda uma fração de bloqueio, por exemplo, uma fração de polipeptídeo de bloqueio estérico, capaz de bloquear a atividade do polipeptídeo de interleucina. A fração de bloqueio, por exemplo, pode compreender um domínio de ligação de albumina de soro humano (HSA) ou um polietilenoglicol

(PEG) opcionalmente ramificado ou multi-ramificado. Alternativamente, a composição farmacêutica compreende um primeiro polipeptídeo de citocina ou um fragmento do mesmo e fração de bloqueio, por exemplo, uma fração de polipeptídeo de bloqueio estérico, em que a fração de bloqueio bloqueia a atividade do polipeptídeo de citocina no receptor de citocina, e em que a fração de bloqueio em certas modalidades compreende um domínio clivável por protease. Em algumas modalidades, o bloqueio e a redução da atividade da citocina são alcançados simplesmente anexando domínios adicionais com ligantes peptídicos muito curtos ao terminal N ou C do domínio de interleucina. Em tais modalidades, prevê-se que o bloqueio seja aliviado pela digestão da protease da fração de bloqueio ou do ligante peptídico curto que amarra o bloqueador à interleucina. Uma vez que o domínio é cortado ou liberado, ele não será mais capaz de bloquear a atividade das citocinas.

[00123] A composição farmacêutica, por exemplo, polipeptídeo quimérico pode compreender duas ou mais citocinas, que podem ser o mesmo polipeptídeo de citocina ou polipeptídeos de citocina diferentes. Por exemplo, os dois ou mais tipos diferentes de citocinas têm funções complementares. Em alguns exemplos, uma primeira citocina é IL-2 e uma segunda citocina é IL-12. Em algumas modalidades, cada um dos dois ou mais tipos diferentes de polipeptídeos de citocina tem atividades que modulam a atividade dos outros polipeptídeos de citocina. Em alguns exemplos de polipeptídeos quiméricos que contêm dois polipeptídeos de citocina, um primeiro polipeptídeo de citocina é ativador de células T e um segundo polipeptídeo de citocina é não ativador de células T. Em alguns exemplos de polipeptídeos quiméricos que contêm dois polipeptídeos de citocina, uma primeira citocina é um quimioatraente, por exemplo, CXCL10, e uma segunda citocina é um ativador de células imunes.

[00124] De preferência, os polipeptídeos de citocina (incluindo fragmentos funcionais) que estão incluídos nas proteínas de fusão divulgadas neste documento não são mutados ou modificados para alterar as propriedades da citocina de ocorrência natural, incluindo afinidade de ligação ao receptor e

especificidade ou meia-vida sérica. No entanto, alterações na sequência de aminoácidos de citocinas de ocorrência natural (incluindo tipo selvagem) são aceitáveis para facilitar a clonagem e para atingir os níveis de expressão desejados, por exemplo.

Fração de Bloqueio

[00125] A fração de bloqueio pode ser qualquer fração que iniba a capacidade da citocina de se ligar e/ou ativar seu receptor. A fração de bloqueio pode inibir a capacidade da citocina de se ligar e/ou ativar seu receptor, bloqueando estericamente e/ou por ligação não covalente à citocina. Exemplos de frações de bloqueio adequadas incluem as completes ou um fragmento de ligação à citocina ou muteína do receptor cognato da citocina. Anticorpos e fragmentos destas, incluindo um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um fragmento variável de cadeia única (scFv), anticorpo de domínio único, tal como um domínio variável de cadeia pesada (VH), um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de nanobody tipo camelídeo (VHH), um dAb e similares, que se ligam à citocina também podem ser usados. Outros domínios de ligação de antígeno adequados que se ligam à citocina também podem ser usados, incluindo proteínas diferentes de imunoglobulinas que imitam a ligação e/ou estrutura do anticorpo, tais como anticalinas, afilinas, moléculas de affibody, affimers, afitinas, alphabodies, avimers, DARPins, fynomers, peptídeos de domínio kunitz, monobodies, e domínios de ligação baseados em outras proteínas estruturadas modificadas, tais como estruturas de SpA, GroEL, fibronectina, lipocallina e CTLA4. Outros exemplos de polipeptídeos de bloqueio adequados incluem polipeptídeos que inibem estericamente ou bloqueiam a ligação da citocina ao seu receptor cognato. Vantajosamente, essas frações também podem funcionar como elementos de prolongamento da meia-vida. Por exemplo, um peptídeo que é modificado por conjugação com um polímero solúvel em água, tal como PEG, pode inibir estericamente ou prevenir a ligação da citocina ao seu receptor. Polipeptídeos, ou fragmentos dos mesmos, que têm

meia-vida sérica longa também podem ser usados, tais como albumina sérica (albumina sérica humana), imunoglobulina Fc, transferrina e semelhantes, bem como fragmentos e muteínas de tais polipeptídeos. Os anticorpos e os domínios de ligação ao antígeno que se ligam a, por exemplo, uma proteína com uma meia-vida sérica longa, como HSA, imunoglobulina ou transferrina, ou a um receptor que é reciclado para a membrana plasmática, como FcRn ou receptor de transferrina, podem também inibem a citocina, particularmente quando ligada ao seu antígeno. Exemplos de tais polipeptídeos de ligação ao antígeno incluem um fragmento variável de cadeia única (scFv), anticorpo de domínio único, como um domínio variável de cadeia pesada (VH), um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de nanobody do tipo camelídeo (VHH), um dAb e semelhantes. Outro domínio de ligação ao antígeno adequado que se liga à citocina também pode ser usado, incluindo proteínas não imunoglobulinas que mimetizam a ligação e/ou estrutura de anticorpos, tais como, anticalinas, afilinas, moléculas de affibody, affimers, afitinas, alphabodies, avimers, DARPins, fynomers, peptídeos de domínio kunitz, monobodies e domínios de ligação com base em outras proteínas estruturadas manipuladas, como estruturas de SpA, GroEL, fibronectina, lipocalina e CTLA4.

[00126] Em exemplos ilustrativos, quando IL-2 é a citocina no polipeptídeo quimérico, a fração de bloqueio pode ser a de comprimento total ou um fragmento ou muteína da cadeia alfa do receptor de IL-2 (IL-2Rα) ou beta (IL-2Rβ) ou cadeia gama do receptor de IL-2 (IL-2Rγ), um anticorpo de domínio único anti-IL-2 (dAb) ou scFv, um Fab, um anticorpo anti-CD25 ou fragmento do mesmo e anti-HAS dAb ou scFv, e semelhantes.

Aspectos adicionais da invenção

1. Uma proteína de fusão compreendendo uma fração de citocina que está operacionalmente ligada a uma fração de ligação, a fração de ligação compreendendo uma alça não CDR e um ligante peptídico clivável, em que a fração de ligação é capaz de mascarar a ligação da citocina ao seu receptor e/ou ativação do receptor pela citocina.

2. A proteína de fusão do aspecto 1, em que a fração de ligação é um peptídeo natural, um peptídeo sintético, uma proteína estruturada modificada ou uma proteína sérica em grupo manipulada.

3. A proteína de fusão do aspecto 1 ou 2, em que a proteína estruturada modificada compreende um sdAb, um scFv, um Fab, um VHH, um domínio de fibronectina tipo III, proteína estruturada do tipo imunoglobulina, DARPin, peptídeo de nó de cistina, lipocalina, proteína estruturada de feixe de três hélices, módulo de ligação à albumina relacionado à proteína G ou uma proteína estruturada de aptâmeros de DNA ou RNA.

4. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 1-2, em que a fração de ligação é capaz de se ligar a uma proteína sérica em grupo.

5. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 1-3, em que a alça não CDR é de um domínio variável, um domínio constante, um domínio de conjunto C1, um domínio de conjunto C2, um domínio I ou quaisquer combinações dos mesmos.

6. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 1-4, em que a fração de ligação compreende ainda regiões determinantes de complementaridade (CDRs).

7. A proteína de fusão do aspecto 5, em que a fração de ligação é capaz de se ligar à proteína sérica em grupo.

8. A proteína de fusão do aspecto 6, em que a proteína sérica em grupo é uma proteína que prolonga a meia-vida.

9. A proteína de fusão do aspecto 6 ou 7, em que a proteína sérica em grupo é albumina, transferrina, Fator XIII ou Fibrinogênio.

10. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos5-8, que a alça CDR fornece o sítio de ligação específico para a proteína sérica em grupo ou a cadeia leve de imunoglobulina, ou quaisquer combinações das mesmas.

11. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 1-9, em que o ligante peptídico clivável compreende um sítio de clivagem.

12. A proteína de fusão do aspecto 10, em que o sítio de clivagem é

reconhecido por uma protease.

13. A proteína de fusão do aspecto 11, em que a fração de ligação está ligada à citocina.

14. A proteína de fusão do aspecto 11 ou 11, em que a fração de ligação está ligada covalentemente à citocina.

15. A proteína de fusão do aspecto 11, 11 ou 14, em que a fração de ligação é capaz de mascarar a ligação da citocina ao seu alvo por meio de interações intermoleculares específicas entre a fração de ligação e a citocina.

16. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 11-14, em que a alça não CDR fornece um sítio de ligação específico para a ligação da fração à citocina.

17. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 11-15, em que após a clivagem do ligante peptídico clivável, a fração de ligação é separada da citocina e a citocina se liga ao seu alvo.

18. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 1-16, em que a citocina se liga a um receptor de citocina.

19. A proteína de fusão do aspecto 17, em que o receptor de citocina compreende um receptor de citocina de tipo I, um receptor de IL de tipo I, um receptor de IL de tipo II, um receptor de quimiocina ou um receptor de superfamília de receptores de necrose tumoral.

20. A proteína de fusão de qualquer um dos aspectos 1-18, em que o ligante peptídico clivável compreende um sítio de clivagem.

21. A proteína de fusão do aspecto 20, em que o sítio de clivagem é reconhecido por uma protease.

22. A proteína de fusão do aspecto 21, em que o sítio de clivagem da protease é reconhecido por uma serina protease, uma cisteína protease, uma aspartato protease, uma treonina protease, uma protease de ácido glutâmico, uma metaloproteinase, uma gelatinase ou uma asparagina peptídeo liase.

23. A proteína de fusão do aspecto 21, em que o sítio de clivagem da protease é reconhecido por uma Catepsina B, uma Catepsina C, uma Catepsina

D, uma Catepsina E, uma Catepsina K, uma Catepsina L, uma calicreína, um hK1, um hK10, um hK15, uma plasmina, uma colagenase, uma colagenase Tipo IV, uma estromelisina, um Fator Xa, uma protease do tipo quimiotripsina, uma protease do tipo tripsina, uma protease do tipo elastase, uma protease do tipo subtilisina, uma actinidina, uma bromelaína, uma calpaína, uma caspase, uma caspase-3, uma Mir1-CP, uma papaína, uma protease de HIV-1, uma protease de HSV, uma protease de CMV, uma quimosina, uma renina, uma pepsina, uma matriptase, uma legumaína, uma plasmepsina, uma nepentsina, uma metaloexopeptidase, uma metaloendopeptidase, uma metaloprotease de matriz (MMP), uma MMP1, uma MMP2, uma MMP3, uma MMP8, uma MMP9, uma MMP10, uma MMP11, uma MMP12, uma MMP13, uma MMP14, uma ADAM10, uma ADAM17, um ADAM12, um ativador de uroquinase plasminogênio (uPA), uma enteroquinase, um alvo específico da próstata (PSA, hK3), uma enzima de conversão de interleucina-1β, uma trombina, um FAP (FAP-α), uma dipeptidil peptidase, ou dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26), uma protease de serina transmembrana tipo II (TTSP), uma elastase de neutrófilos, uma catepsina G, uma proteinase 3, uma serina protease de neutrófilos 4, uma quimase de mastócitos, uma triptase de mastócitos, uma dipeptidil peptidase e uma dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26).

24. Uma proteína de ligação condicionalmente ativa compreendendo uma fração de ligação (M) que compreende uma alça não CDR, uma citocina e um ligante peptídico clivável (L), em que a alça não CDR é capaz de se ligar à citocina e em que a fração de ligação é capaz de inibir a ligação da citocina ao seu receptor e/ou inibir a ativação do receptor pela citocina.

25. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 24, em que a fração de ligação é capaz de se ligar a uma proteína que prolonga a meia-vida.

26. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 24 ou 25, em que a fração de ligação é um peptídeo natural, um peptídeo sintético, uma proteína estruturada modificada ou uma proteína sérica em grupo manipulada.

27. A proteína de fusão do aspecto 26, em que a proteína estruturada

modificada compreende um sdAb, um scFv, um Fab, um VHH, um domínio de fibronectina tipo III, proteína estruturada do tipo imunoglobulina, DARPin, peptídeo de nó de cistina, lipocalina, proteína estruturada de feixe de três hélices, módulo de ligação à albumina relacionado à proteína G ou uma proteína estruturada de aptâmeros de DNA ou RNA.

28. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 24-27, em que a alça não CDR é de um domínio variável, um domínio constante, um domínio de conjunto C1, um domínio de conjunto C2, um domínio I ou quaisquer combinações dos mesmos.

29. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 24-28, em que a fração de ligação compreende ainda regiões determinantes de complementaridade (CDRs).

30. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 24-29, em que a fração de ligação compreende um sítio de ligação específico para uma proteína sérica em grupo.

31. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 30, em que a proteína sérica em grupo é albumina, transferrina, Fator XIII ou Fibrinogênio.

32. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 29-31, em que as CDRs fornecem o sítio de ligação específico para a proteína sérica em grupo ou a cadeia leve de imunoglobulina, ou quaisquer combinações das mesmas.

33. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 29-32, em que a fração de ligação é capaz de mascarar a ligação da citocina ao seu alvo por meio de interações intermoleculares específicas entre a fração de ligação e a citocina.

34. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 29-33, em que a alça não CDR fornece um sítio de ligação específico para a ligação da fração de ligação à citocina.

35. A proteína de ligação condicionalmente ativa de qualquer um dos aspectos 24-34, em que a citocina se liga a um receptor de citocina.

36. A proteína de fusão do aspecto 35, em que o receptor de citocina compreende um receptor de citocina de tipo I, um receptor de IL de tipo I, um receptor de IL de tipo II, um receptor de quimiocina ou um receptor de superfamília de receptores de necrose tumoral.

37. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 24-36, em que o ligante peptídico clivável compreende um sítio de clivagem.

38. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 37, em que o sítio de clivagem é reconhecido por uma protease.

39. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 38, em que o sítio de clivagem da protease é reconhecido por uma serina protease, uma cisteína protease, uma aspartato protease, uma treonina protease, uma protease de ácido glutâmico, uma metaloproteinase, uma gelatinase ou uma asparagina peptídeo liase.

40. A proteína de fusão do aspecto 38, em que o sítio de clivagem da protease é reconhecido por uma Catepsina B, uma Catepsina C, uma Catepsina D, uma Catepsina E, uma Catepsina K, uma Catepsina L, uma calicreína, um hK1, um hK10, um hK15, uma plasmina, uma colagenase, uma colagenase Tipo IV, uma estromelisina, um Fator Xa, uma protease do tipo quimiotripsina, uma protease do tipo tripsina, uma protease do tipo elastase, uma protease do tipo subtilisina, uma actinidina, uma bromelaína, uma calpaína, uma caspase, uma caspase-3, uma Mir1-CP, uma papaína, uma protease de HIV-1, uma protease de HSV, uma protease de CMV, uma quimosina, uma renina, uma pepsina, uma matriptase, uma legumaína, uma plasmepsina, uma nepentsina, uma metaloexopeptidase, uma metaloendopeptidase, uma metaloprotease de matriz (MMP), uma MMP1, uma MMP2, uma MMP3, uma MMP8, uma MMP9, uma MMP10, uma MMP11, uma MMP12, uma MMP13, uma MMP14, uma ADAM10, uma ADAM17, um ADAM12, um ativador de uroquinase plasminogênio (uPA), uma enteroquinase, um alvo específico da próstata (PSA, hK3), uma enzima de conversão de interleucina-1β, uma trombina, um FAP (FAP-α), uma dipeptidil peptidase, ou dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26), uma protease de serina

transmembrana tipo II (TTSP), uma elastase de neutrófilos, uma catepsina G, uma proteinase 3, uma serina protease de neutrófilos 4, uma quimase de mastócitos, uma triptase de mastócitos, uma dipeptidil peptidase e uma dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26).

41. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 24, compreendendo ainda um domínio de prolongamento da meia-vida ligado à fração de ligação, em que o domínio de prolongamento da meia-vida fornece à proteína de ligação um interruptor de segurança e em que, após a clivagem do ligante peptídico, a proteína de ligação é ativada por separação da fração de ligação e o domínio de prolongamento da meia-vida da citocina, e a proteína de ligação é assim separada do interruptor de segurança.

42. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 41, em que a clivagem do ligante peptídico ocorre em um microambiente tumoral.

43. Uma proteína de ligação condicionalmente ativa, compreendendo uma fração de ligação que se liga a uma citocina por meio de uma alça não CDR dentro da fração de ligação, em que a fração de ligação está ainda ligada a um domínio de prolongamento da meia-vida e compreende um ligante peptídico clivável, em que a proteína de ligação tem uma meia-vida prolongada antes de sua ativação por clivagem do ligante peptídico, e em que, após a ativação, a fração de ligação e o domínio de prolongamento da meia-vida são separados da citocina, e em que a proteína de ligação, em seu estado ativado, não tem um meia-vida prolongada.

44. A proteína de ligação condicionalmente ativa do aspecto 43, em que a clivagem do ligante peptídico ocorre em um microambiente tumoral.

Elementos de prolongamento da meia-vida in vivo

[00127] Preferencialmente, os polipeptídeos quiméricos compreendem um elemento de prolongamento da meia-vida in vivo. O aumento da meia-vida in vivo de moléculas terapêuticas com meia-vida naturalmente curta permite um regime de dosagem mais aceitável e administrável sem sacrificar a eficácia. Conforme usado neste documento, um "elemento de prolongamento de meia-

vida" é uma parte do polipeptídeo quimérico que aumenta a meia-vida in vivo e melhora a pK, por exemplo, alterando seu tamanho (por exemplo, para fica acima do limite de filtração renal), forma, raio hidrodinâmico, carga ou parâmetros de absorção, biodistribuição, metabolismo e eliminação. Uma forma exemplificativa de melhorar a pK de um polipeptídeo é pela expressão de um elemento na cadeia polipeptídica que se liga a receptores que são reciclados para a membrana plasmática das células em vez de degradados nos lisossomas, como o receptor FcRn em células endoteliais e transferrina receptor. Três tipos de proteínas, por exemplo, IgGs, HSA (ou fragmentos) e transferrina humanas, persistem por muito mais tempo no soro humano do que seria previsto apenas por seu tamanho, que é uma função de sua capacidade de se ligar a receptores que são reciclados em vez do que degradados no lisossoma. Essas proteínas, ou fragmentos delas que retêm a ligação de FcRn, são rotineiramente ligadas a outros polipeptídeos para prolongar sua meia-vida sérica. Em uma modalidade, o elemento de prolongamento de meia-vida é um domínio de ligação de albumina de soro humano (HSA). A HSA (SEQ ID NO: 2) também pode ser diretamente ligada às composições farmacêuticas ou ligada por meio de um ligante peptídico curto. Fragmentos de HSA também podem ser usados. A HSA e seus fragmentos podem funcionar como uma fração de bloqueio e um elemento de prolongamento da meia-vida. Os fragmentos de IgGs e Fc humanos também podem realizar uma função semelhante.

[00128] O elemento de prolongamento da meia-vida sérica também pode ser um polipeptídeo de ligação ao antígeno que se liga a uma proteína com uma meia-vida sérica longa, como albumina sérica, transferrina e semelhantes. Exemplos desses polipeptídeos incluem anticorpos e seus fragmentos, incluindo um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um fragmento variável de cadeia única (scFv), um anticorpo de domínio único, tal como um domínio variável de cadeia pesada (VH), um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de nanobody tipo camelídeo (VHH), um dAb e similares. Outros domínios de ligação

de antígeno adequados incluem proteínas diferentes de imunoglobulinas que imitam a ligação e/ou estrutura do anticorpo, tais como anticalinas, afilinas, moléculas de affibody, affimers, afitinas, alphabodies, avimers, DARPins, fynomers, peptídeos de domínio kunitz, monobodies, e domínios de ligação baseados em outras proteínas estruturadas modificadas, tais como estruturas de SpA, GroEL, fibronectina, lipocallina e CTLA4. Outros exemplos de polipeptídeos de ligação ao antígeno incluem um ligante para um receptor desejado, uma fração de ligação ao ligante de um receptor, uma lectina e peptídeos que se ligam a ou se associam a um ou mais antígenos alvo.

[00129] Alguns elementos de prolongamento da meia-vida sérica preferenciais são polipeptídeos que compreendem regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e, opcionalmente, alças não CDR. Vantajosamente, tais elementos de prolongamento da meia-vida sérica podem prolongar a meia-vida sérica da citocina e também funcionar como inibidores da citocina (por exemplo, via bloqueio estérico, interação não covalente ou combinação dos mesmos) e/ou como domínios de direcionamento. Em alguns casos, os elementos de prolongamento da meia-vida sérica são domínios derivados de uma molécula de imunoglobulina (molécula de Ig) ou proteínas estruturadas modificadas que mimetizam a estrutura e/ou atividade de ligação de anticorpos. A Ig pode ser de qualquer classe ou subclasse (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, etc). Uma cadeia polipeptídica de uma molécula de Ig dobra-se em uma série de fitas beta paralelas ligadas por alças. Na região variável, três das alças constituem as "regiões determinantes de complementaridade" (CDRs) que determinam a especificidade de ligação ao antígeno da molécula. Uma molécula de IgG compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfeto ou um fragmento de ligação ao antígeno das mesmas. Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (abreviada neste documento como VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é composta de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve compreende uma região variável

de cadeia leve (abreviada neste documento como VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é composta de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que são hipervariáveis em sequência e/ou estão envolvidas no reconhecimento de antígeno e/ou geralmente formam alças estruturalmente definidas, intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões framework (FR). Cada VH e VL é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir do amino-terminal para o carboxi-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em algumas modalidades desta divulgação, pelo menos algumas ou todas as sequências de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 e FR4 fazem parte da "alça não CDR" das frações de ligação descritas neste documento. Conforme mostrado na **Fig. 5,** um domínio variável de uma molécula de imunoglobulina tem várias fitas beta que ficam dispostas em duas folhas. Os domínios variáveis de ambas as cadeias de imunoglobulina leve e pesada contêm três alças hipervariáveis, ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Os três CDRs de um domínio V (CDR1, CDR2, CDR3) agrupam-se em uma extremidade do barril beta. As CDRs são as alças que conectam as fitas beta B-C, C'-C" e F-G da dobra da imunoglobulina, enquanto as alças inferiores que conectam as fitas beta AB, CC', C" -D e E-F da dobra da imunoglobulina, e a alça superior que conecta as fitas D-E da dobra da imunoglobulina são as alças não CDR. Em algumas modalidades desta divulgação, pelo menos alguns resíduos de aminoácidos de um domínio constante, CH1, CH2 ou CH3, fazem parte da "alça não CDR" das frações de ligação descritas neste documento. As alças não CDR compreendem, em algumas modalidades, uma ou mais das alças AB, CD, EF e DE de um domínio de conjunto C1 de uma Ig ou uma molécula do tipo Ig; as alças AB, CC', EF, FG, BC e EC' de um domínio de conjunto C2 de uma Ig ou uma molécula do tipo Ig; as alças DE, BD, GF, A(A1A2)B e EF do domínio I (Intermediário) definido de uma Ig ou molécula do tipo Ig.

[00130] Dentro do domínio variável, acredita-se que as CDRs sejam responsáveis pelo reconhecimento e ligação do antígeno, enquanto os resíduos de FR são considerados uma estrutura para as CDRs. No entanto, em certos casos, alguns dos resíduos de FR desempenham um papel importante no reconhecimento e ligação do antígeno. Os resíduos da região estrutural que afetam a ligação de Ag são divididos em duas categorias. Os primeiros são resíduos de FR que contatam o antígeno, portanto, fazem parte do sítio de ligação, e alguns desses resíduos estão próximos em sequência às CDRs. Outros resíduos são aqueles que estão longe das CDRs na sequência, mas estão próximos a elas na estrutura 3-D da molécula, *por exemplo*, uma alça na cadeia pesada. O domínio de prolongamento da meia-vida sérica (por exemplo, um domínio que compreende CDRs) pode compreender pelo menos uma alça não CDR. Em algumas modalidades, uma alça não CDR fornece um sítio de ligação para ligação a uma citocina, proteína sérica em grupo ou outro antígeno alvo.

[00131] O elemento de prolongamento da meia-vida sérica, além de ou, em alternativa, conter CDRs, compreende uma alça não CDR. Em algumas modalidades, a alça não CDR é modificada para gerar um sítio de ligação ao antígeno específico para um antígeno alvo desejado, como uma proteína sérica em massa, como albumina, ou para a fração de citocina ou outro antígeno de direcionamento. É contemplado que várias técnicas podem ser usadas para modificar a alça não CDR, por exemplo, mutagênese dirigida ao sítio, mutagênese aleatória, inserção de pelo menos um aminoácido que é estranho à sequência de aminoácidos da alça não CDR, substituição de aminoácidos. Um peptídeo de antígeno é inserido em uma alça não CDR, em alguns exemplos. Em alguns exemplos, um peptídeo antigênico é substituído pela alça não CDR. A modificação, para gerar um sítio de ligação ao antígeno, ocorre, em alguns casos, em apenas uma alça não CDR. Em outros casos, mais de uma alça não CDR é modificada. Por exemplo, a modificação ocorre em qualquer uma das alças não CDR mostradas na **Fig. 5***, isto é*, AB, CC', C" D, EF e D-E. Em alguns

casos, a modificação ocorre na alça DE. Em outros casos, as modificações ocorrem em todos as quatro alças AB, CC', C" –D, E-F.

[00132] Em alguns exemplos, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica tem especificidade de ligação dupla e contém CDRs que se ligam especificamente a proteínas séricas em grupo, como albumina sérica, e alças não CDR que se ligam e bloqueiam especificamente o domínio de citocina. Em outros exemplos, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica contém CDRs que se ligam especificamente a um antígeno alvo, como o domínio de citocina ou outro antígeno alvo, e alças não CDR que se ligam especificamente a uma proteína sérica em grupo, como a albumina sérica. Preferencialmente, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica inibe a ligação do domínio de citocina ao receptor de citocina cognato, por exemplo, via oclusão estérica, via interações intermoleculares específicas ou uma combinação de ambas.

[00133] Em algumas modalidades, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica se liga de forma não covalente diretamente à citocina e inibe sua atividade.

[00134] Em certos exemplos, a fração de ligação se liga a uma citocina por meio de uma ou mais dentre as alças AB, CC', C" D e E-F e se liga a uma proteína sérica em grupo, como albumina, por meio de uma ou mais dentre as alças BC, C'C" e FG. Em certos exemplos, a fração de ligação se liga a uma proteína sérica em grupo, tal como albumina, através de sua alça AB, CC', C" D ou EF e se liga a uma citocina por meio de sua alça BC, C'C" ou FG. Em certos exemplos, a fração de ligação se liga a uma proteína sérica em grupo, tal como albumina, por meio de sua alça AB, CC', C" D e EF e está ligada a uma citocina por meio de sua alça BC, C'C" e FG. Em certos exemplos, a fração de ligação se liga a uma proteína sérica em grupo, como a albumina, através de uma ou mais dentre as alças AB, CC', C" D e E-F e se liga a uma citocina, através de uma ou mais dentre as alças BC, C'C" e FG.

[00135] As frações de ligação são quaisquer tipos de polipeptídeos. Por exemplo, em certos casos, as frações de ligação são peptídeos naturais,

peptídeos sintéticos ou proteínas estruturadas de fibronectina ou proteínas séricas manipuladas. A proteína sérica em grupo compreende, por exemplo, albumina, fibrinogênio ou uma globulina. Em algumas modalidades, as frações de ligação são proteínas estruturadas modificadas. As proteínas estruturadas modificadas compreendem, por exemplo, sdAb, um scFv, um Fab, um VHH, um domínio de fibronectina tipo III, uma proteína estruturada do tipo imunoglobulina (como sugerido em Halaby et al., 1999. Prot Eng 12(7): 563-571), DARPin, peptídeo de nó de cistina, lipocalina, proteína estruturada de feixe de três hélices, módulo de ligação de albumina relacionado à proteína G ou proteína estruturada de aptâmeros de DNA ou RNA.

[00136] Em alguns casos, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica se liga ao domínio de citocina por meio de suas alças não CDR e o domínio de citocina é ainda conectado a um domínio de direcionamento conforme descrito neste documento. Em alguns casos, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica compreende um sítio de ligação para uma proteína sérica em grupo. Em algumas modalidades, as CDRs fornecem o sítio de ligação para a proteína sérica em grupo. A proteína sérica em grupo é, em alguns exemplos, uma globulina, albumina, transferrina, IgG1, IgG2, IgG4, IgG3, monômero de IgA, Fator XIII, Fibrinogênio, IgE ou IgM pentamérica. Em algumas modalidades, a CDR forma um sítio de ligação para uma cadeia leve de imunoglobulina, como uma cadeia leve livre de Igκ ou uma cadeia leve livre de Igλ.

[00137] Uma proteína condicionalmente ativa exemplificativa é mostrada na **Fig. 6.** No exemplo ilustrado, as alças não CDR em um domínio de ligação de albumina sérica (por exemplo, um dAb) podem formar um sítio de ligação para a citocina IL-2. Neste exemplo, o sítio de ligação para albumina sérica pode ser formado pelas CDRs do domínio de ligação de albumina sérica.

[00138] O elemento de prolongamento da meia-vida sérica pode ser qualquer tipo de domínio de ligação, incluindo, mas não se limitando a, domínios de um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo

recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, a fração de ligação é um fragmento variável de cadeia única (scFv), anticorpo de domínio único, como um domínio variável de cadeia pesada (VH), um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável (VHH) de nanobody derivado de camelídeo. Em outras modalidades, as frações de ligação são domínios de ligação não-Ig, ou seja, miméticos de anticorpo, tais como anticalinas, afilinas, moléculas de affibody, affimers, afitinas, alphabodies, avimers, DARPins, fynomers, peptídeos de domínio kunitz e monobodies.

[00139] Em outras modalidades, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica pode ser um polímero solúvel em água ou um peptídeo que é conjugado a um polímero solúvel em água, como PEG. “PEG”, “polietilenoglicol” e “poli (etilenoglicol)”, conforme usados neste documento, são intercambiáveis e abrangem qualquer poli(óxido de etileno) não peptídico solúvel em água. O termo “PEG” também significa um polímero que contém uma maioria, ou seja, maior que 50%, subunidades de repetição —OCH_2CH_2—. Com relação a formas específicas, o PEG pode assumir qualquer número de uma variedade de pesos moleculares, bem como estruturas ou geometrias, como "ramificado", "linear", "bifurcado", "multifuncional" e semelhantes, a serem descritos em maiores detalhes abaixo. O PEG não está limitado a uma estrutura particular e pode ser linear (por exemplo, uma extremidade limitada, por exemplo, PEG alcoxi ou um PEG bifuncional), ramificado ou de multi-ramificado (por exemplo, PEG bifurcado ou PEG ligado a um núcleo de poliol), um arquitetura dendrítica (ou em forma de estrela), cada uma com ou sem uma ou mais ligações degradáveis. Além disso, a estrutura interna do PEG pode ser organizada em qualquer número de padrões de repetição diferentes e pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em homopolímero, copolímero alternado, copolímero aleatório, copolímero em bloco, tripolímero alternado, tripolímero aleatório e tripolímero em bloco. Os PEGs podem ser conjugados a polipeptídeos e peptídeos por meio de qualquer método adequado. Normalmente, um derivado de PEG reativo, tal como N-hidroxisuccinamidil éster PEG, é feito reagir com um peptídeo ou polipeptídeo

que inclui aminoácidos com uma cadeia lateral que contém uma amina, sulfidrila, ácido carboxílico ou grupo funcional hidroxila, tal como cisteína, lisina, asparagina, glutamina, teonina, tirosina, serina, ácido aspártico e ácido glutâmico.

Domínios de direcionamento e retenção

[00140] Para certas aplicações, pode ser desejável maximizar a quantidade de tempo que o construto fica presente em sua localização desejada no corpo. Isto pode ser conseguido incluindo um domínio adicional no polipeptídeo quimérico (proteína de fusão) para influenciar seus movimentos dentro do corpo. Por exemplo, os ácidos nucleicos quiméricos podem codificar um domínio que direciona o polipeptídeo para um sítio no corpo, por exemplo, células tumorais ou um sítio de inflamação; este domínio é denominado um "domínio de direcionamento" e/ou codifica um domínio que retém o polipeptídeo em um sítio no corpo, por exemplo, células tumorais ou um sítio de inflamação; este domínio é denominado “domínio de retenção”. Em algumas modalidades, um domínio pode funcionar como um domínio de direcionamento e de retenção. Em algumas modalidades, o domínio de direcionamento e/ou domínio de retenção são específicos para um ambiente rico em protease. Em algumas modalidades, o domínio de direcionamento codificado e/ou domínio de retenção são específicos para células T reguladoras (Tregs), por exemplo, direcionando os receptores CCR4 ou CD39. Outros domínios de direcionamento e/ou retenção adequados compreendem aqueles que têm um ligante cognato que é superexpresso em tecidos inflamados, por exemplo, o receptor de IL-1 ou o receptor de IL-6. Em outras modalidades, os domínios de direcionamento e/ou retenção adequados compreendem aqueles que têm um ligante cognato que é superexpresso no tecido tumoral, por exemplo, Epcam, CEA ou mesotelina. Em algumas modalidades, o domínio de direcionamento está ligado à interleucina por meio de um ligante peptídico que é clivado no sítio de ação (por exemplo, por inflamação ou proteases específicas do câncer), liberando a atividade total da interleucina no sítio desejado. Em algumas modalidades, o domínio de

direcionamento e/ou retenção está ligado à interleucina por meio de um ligante peptídico que não é clivado no sítio de ação (por exemplo, por inflamação ou proteases específicas do câncer), fazendo com que a citocina permaneça no sítio desejado.

[00141] Os antígenos escolhidos, em alguns casos, são expressos na superfície de uma célula ou tecido doente, por exemplo, um tumor ou uma célula cancerígena. Antígenos úteis para o direcionamento e retenção de tumores incluem, mas não estão limitados a EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, c-Met, FOLR1 e CEA. As composições farmacêuticas divulgadas neste documento também incluem proteínas que compreendem dois domínios de direcionamento e/ou retenção que se ligam a dois antígenos alvo diferentes conhecidos por serem expressos em uma célula ou tecido doente. Pares exemplares de domínios de ligação ao antígeno incluem, mas não estão limitados a EGFR/CEA, EpCAM/CEA e HER-2/HER-3.

[00142] Domínios de direcionamento e/ou de retenção adequados incluem domínios de ligação de antígeno, tais como anticorpos e seus fragmentos, incluindo um anticorpo policlonal, um anticorpo recombinante, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um fragmento variável de cadeia única (scFv), um anticorpo de domínio único, tal como um domínio variável de cadeia pesada (VH), um domínio variável de cadeia leve (VL) e um domínio variável de nanobody tipo camelídeo (VHH), um dAb e similares. Outros domínios de ligação de antígeno adequados incluem proteínas diferentes de imunoglobulinas que imitam a ligação e/ou estrutura do anticorpo, tais como anticalinas, afilinas, moléculas de affibody, affimers, afitinas, alphabodies, avimers, DARPins, fynomers, peptídeos de domínio kunitz, monobodies, e domínios de ligação baseados em outras proteínas estruturadas modificadas, tais como estruturas de SpA, GroEL, fibronectina, lipocallina e CTLA4. Outros exemplos de polipeptídeos de ligação ao antígeno incluem um ligante para um receptor desejado, uma fração de ligação ao ligante de um receptor, uma lectina e peptídeos que se ligam a ou se associam a um ou mais antígenos alvo.

[00143] Em algumas modalidades, os domínios de direcionamento e/ou retenção se ligam especificamente a uma molécula da superfície celular. Em algumas modalidades, os domínios de direcionamento e/ou retenção se ligam especificamente a um antígeno tumoral. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento se ligam específica e independentemente a um antígeno tumoral selecionado a partir de pelo menos um dentre proteína de ativação de fibroblastos alfa (FAPa), glicoproteína de trofoblasto (5T4), transdutor de sinal de cálcio associado a tumor 2 (Trop2), Fibronectina EDB (EDB -FN), domínio EIIIB de fibronectina, CGS-2, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA e FOLR1. Em algumas modalidades, os polipeptídeos de direcionamento se ligam específica e independentemente a dois antígenos diferentes, em que pelo menos um dos antígenos é um antígeno tumoral selecionado de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA e FOLR1.

[00144] O antígeno de direcionamento e/ou retenção pode ser um antígeno tumoral expresso em uma célula tumoral. Os antígenos tumorais são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, c-Met, FOLR1, PSMA, CD38, BCMA e CEA. 5T4, AFP, B7-H3, Caderina-6, CAIX, CD117, CD123, CD138, CD166, CD19, CD20, CD205, CD22, CD30, CD33, CD352, CD37, CD44, CD52, CD56, CD70, CD71, CD74, CD79b, DLL3, EphA2, FAP, FGFR2, FGFR3, GPC3, gpA33, FLT-3, gpNMB, HPV-16 E6, HPV-16 E7, ITGA2, ITGA3, SLC39A6, MAGE, mesotelina, Muc1, Muc16, NaPi2b, Nectina 4, P-caderina, NY-ESO-1, PRLR, PSCA, PTK7, ROR1, SLC44A4, SLTRK5, SLTRK6, STEAP1, TIM1, Trop2, WT1.

[00145] O antígeno de direcionamento e/ou retenção pode ser uma proteína de ponto de controle imunológico. Exemplos de proteínas de checkpoint imunológico incluem, mas não estão limitados a CD27, CD137, 2B4, TIGIT, CD155, ICOS, HVEM, CD40L, LIGHT, TIM-1, OX40, DNAM-1, PD-L1, PD1, PD-L2, CTLA -4, CD8, CD40, CEACAM1, CD48, CD70, A2AR, CD39, CD73, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDO1, IDO2, TDO, KIR, LAG-3, TIM-3 ou VISTA.

[00146] O antígeno de direcionamento e/ou retenção pode ser uma

molécula de superfície celular, como uma proteína, lipídio ou polissacarídeo. Em algumas modalidades, um antígeno de direcionamento e/ou retenção está em uma célula tumoral, célula infectada por vírus, célula infectada por bactérias, glóbulo vermelho danificado, célula de placa arterial, inflamada ou célula de tecido fibrótico. O antígeno de direcionamento e/ou retenção pode compreender um modulador de resposta imune. Exemplos de modulador de resposta imune incluem, mas não estão limitados a fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), GITRL, CD3 ou GITR.

[00147] O antígeno de direcionamento e/ou retenção pode ser um receptor de citocina. Exemplos de receptores de citocina incluem, mas não estão limitados a receptores de citocina Tipo I, tais como receptor GM-CSF, receptor G-CSF, receptores IL Tipo I, receptor Epo, receptor LIF, receptor CNTF, receptor TPO; Receptores de citocinas do tipo II, tais como receptor de IFN-alfa (IFNAR1, IFNAR2), receptor de IFB-beta, receptor de IFN-gama (IFNGR1, IFNGR2), receptores de IL do tipo II; receptores de quimiocinas, tais como receptores de quimiocinas CC, receptores de quimiocinas CXC, receptores de quimiocinas CX3C, receptores de quimiocinas XC; receptores da superfamília de receptores de necrose tumoral, tais como TNFRSF5/CD40, TNFRSF8/CD30, TNFRSF7/CD27, TNFRSF1A/TNFR1/CD120a, TNFRSF1B/TNFR2/CD120b; Receptores TGF-beta, tais como receptor TGF-beta 1, receptor TGF-beta 2; Receptores da superfamília Ig, como os receptores IL-1, CSF-1R, PDGFR (PDGFRA, PDGFRB), SCFR.

Ligantes peptídicos

[00148] Como afirmado acima, as composições farmacêuticas compreendem uma ou mais sequências de ligantes peptídicos. Uma sequência de ligantes peptídicos serve para fornecer flexibilidade entre polipeptídeos, de modo que, por exemplo, a fração de bloqueio seja capaz de inibir a atividade do

polipeptídeo de citocina. A sequência de ligantes peptídicos pode estar localizada entre qualquer ou todos os polipeptídeos de citocina, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica e/ou a fração de bloqueio. Conforme descrito neste documento, pelo menos um dos ligantes peptídicos é clivável por protease e contém um (um ou mais) sítio de clivagem para uma (uma ou mais) protease desejada. Preferencialmente, a protease desejada é enriquecida ou expressa seletivamente no sítio desejado de atividade da citocina (por exemplo, o microambiente tumoral). Assim, a proteína de fusão é preferencialmente ou seletivamente clivada no sítio da atividade de citocina desejada.

[00149] Os ligantes peptídicos adequados podem ser de comprimentos diferentes, tais como de 1 aminoácido (por exemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluindo 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, ou 7 aminoácidos a 8 aminoácidos e podem ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ou 60 aminoácidos.

[00150] A orientação dos componentes da composição farmacêutica é em grande parte uma questão de escolha de projeto e é reconhecido que múltiplas orientações são possíveis e todas se destinam a ser abrangidas por esta divulgação. Por exemplo, uma fração de bloqueio pode estar localizada no terminal C ou no terminal N de um polipeptídeo de citocina.

[00151] Proteases conhecidas por estarem associadas a células ou tecidos doentes incluem, mas não estão limitadas a serina proteases, cisteína proteases, aspartato proteases, treonina proteases, ácido glutâmico proteases, metaloproteases, asparagina peptídeo liases, proteases séricas, catepsinas, Catepsina B, Catepsina C, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina K, Catepsina L, calicreínas, hKl, hK10, hK15, plasmina, colagenase, colagenase Tipo IV, estromelisina, Fator Xa, protease do tipo quimiotripsina, protease do tipo tripsina, protease do tipo elastase, protease do tipo subtilisina, actinidaína, bromelaína,

calpaína, caspases, caspase-3, Mirl-CP, papaína, protease de HIV-1, protease de HSV, protease de CMV, quimosina, renina, pepsina, matriptase, legumaína, plasmepsina, nepentesina, metalo-exopeptidases, metalo-endopeptidases, metaloproteases de matriz (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP11, MMP14, ativador de uroquinase plasminogênio (uPA), enteroquinase, antígeno específico da próstata (PSA, hK3), enzima de conversão de interleucina-1β, trombina, FAP (FAP-a), dipeptidil peptidase, meprinas, granzimas e dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26). Proteases capazes de clivar sequências de aminoácidos codificadas pelas sequências de ácido nucleico quiméricas fornecidas neste documento podem, por exemplo, ser selecionadas do grupo que consiste em um antígeno específico da próstata (PSA), uma metaloproteinase de matriz (MMP), uma desintegrina A e uma metaloproteinase (ADAM), um ativador de plasminogênio, uma catepsina, uma caspase, uma protease de superfície de célula tumoral e uma elastase. A MMP pode ser, por exemplo, uma metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) ou metaloproteinase de matriz 9 (MMP9).

[00152] Proteases úteis nos métodos divulgados neste documento são apresentadas na Tabela 1, e proteases exemplares e seus sítios de clivagem são apresentados na Tabela 1a:

Tabela 1. Proteases relevantes para inflamação e câncer

Protease	**Especificidade**	**Outros Aspectos**
Secretado por células T killer:		
Granzima B (grB)	Cliva após resíduos de Asp (asp-ase)	Tipo de serina protease; fortemente implicado na indução de apoptose de células alvo dependente de perforina
Granzima A (grA)	semelhante à tripsina, cliva após resíduos básicos	Tipo de serina protease;

Granzima H (grH)	Especificidade do substrato desconhecida	Tipo de serina protease; *Outras granzimas também são secretadas por células T killer, mas nem todas estão presentes em humanos*
Caspase-8	Cliva após resíduos de Asp	Tipo de cisteína protease; desempenha um papel essencial na expansão celular induzida por TCR - papel molecular exato incerto
Tecido linfoide associado à mucosa (MALT1)	Cliva após resíduos de arginina	Tipo de cisteína protease; provavelmente atua como uma proteína estruturada e uma enzima proteoliticamente ativa na via de sinalização dependente de CBM
Triptase	Alvos: angiotensina I, fibrinogênio, pró-uroquinase, TGFβ; preferencialmente cliva proteínas após resíduos de lisina ou arginina	Tipo de serina protease específica de mastócitos; semelhante à tripsina; resistente à inibição por inibidores da protease macromoleculares expressos em mamíferos devido a sua estrutura tetramérica, com todos os sítios voltados para o poro central estreito; *também associado à inflamação*
Associado à inflamação:		
Trombina	Alvos: FGF-2, HB-EGF,	Tipo de serina protease; modula a atividade de fatores de

	osteopontina, PDGF, VEGF	crescimento vascular, quimiocinas e proteínas extracelulares; fortalece a proliferação induzida por VEGF; induz a migração celular; fator angiogênico; regula a hemostasia
Quimase	Exibem especificidade semelhante à quimiotripsina, clivando proteínas após resíduos de aminoácidos aromáticos	Tipo de serina protease específica de mastócitos
Carboxipeptidase A (MC-CPA)	Cliva resíduos de aminoácidos da extremidade C-terminal de peptídeos e proteínas	Tipo de metaloproteinase dependente de zinco
Calicreínas	Alvos: alto peso molecular quininogênio, pró-uroquinase	Tipo de serina protease; modulam a resposta de relaxamento; contribuem para a resposta inflamatória; degradação de fibrina
Elastase	Alvos: E-caderina, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-6, IL8, $p38^{MAPK}$, TNFα, VE-caderina	Tipo de serina protease serina de neutrófilos; degrada os componentes de ECM; regula a resposta inflamatória; ativa a sinalização pró-apoptótica

Catepsina G	Alvos: EGF, ENA-78, IL-8, MCP-1, MMP-2, MT1-MMP, PAI-1, RANTES, TGFβ, TNFα	Tipo de serina protease; degrada os componentes de ECM; quimioatrativo de leucócitos; regula a resposta inflamatória; promove a apoptose
PR-3	Alvos: ENA-78, IL-8, IL-18, JNK, $p38^{MAPK}$, TNFα	Tipo de serina protease; promove resposta inflamatória; ativa a sinalização pró-apoptótica
Granzima M (grM)	Cliva após Met e outros resíduos hidrofóbicos longos e não ramificados	Tipo de serina protease; expresso apenas em células NK
Calpaínas	Clivam entre Arg e Gly	Família de cisteína proteases; dependente de cálcio; a ativação está envolvida no processo de inúmeras doenças associadas à inflamação

Tabela 1a: Proteases Exemplares e Sequências de Reconhecimento de Protease

Protease	Sequência do Domínio de Clivagem	SEQ ID NO:
MMP7	**KRALGLPG**	**3**
MMP7	**$(DE)_8$RPLALWRS$(DR)_8$**	**4**
MMP9	**PR(S/T)(L/I)(S/T)**	**5**
MMP9	**LEATA**	**6**
MMP11	**GGAANLVRGG**	**7**
MMP14	**SGRIGFLRTA**	**8**
MMP	**PLGLAG**	**9**
MMP	**PLGLAX**	**10**

MMP	**PLGC(me)AG**	**11**
MMP	**ESPAYYTA**	**12**
MMP	**RLQLKL**	**13**
MMP	**RLQLKAC**	**14**
MMP2, MMP9, MMP14	**EP(Cit)G(Hof)YL**	**15**
Ativador da plasminogênio uroquinase (uPA)	**SGRSA**	**16**
Ativador da plasminogênio uroquinase (uPA)	**DAFK**	**17**
Ativador da plasminogênio uroquinase (uPA)	**GGGRR**	**18**
Enzima lisossômica	**GFLG**	**19**
Enzima lisossômica	**ALAL**	**20**
Enzima lisossômica	**FK**	**21**
Catepsina B	**NLL**	**22**
Catepsina D	**PIC(Et)FF**	**23**
Catepsina K	**GGPRGLPG**	**24**
Antígeno Específico da Próstata	**HSSKLQ**	**25**
Antígeno Específico da Próstata	**HSSKLQL**	**26**
Antígeno Específico da Próstata	**HSSKLQEDA**	**27**
Protease de vírus Herpes Simplex	**LVLASSSFGY**	**28**
Protease do HIV	**GVSQNYPIVG**	**29**
Protease do CMV	**GVVQASCRLA**	**30**
Trombina	**F(Pip)RS**	**31**
Trombina	**DPRSFL**	**32**
Trombina	**PPRSFL**	**33**
Caspase-3	**DEVD**	**34**
Caspase-3	**DEVDP**	**35**

Caspase-3	**KGSGDVEG**	**36**
Enzima conversora de interleucina 1β	**GWEHDG**	**37**
Enteroquinase	**EDDDDKA**	**38**
FAP	**KQEQNPGST**	**39**
Calicreína 2	**GKAFRR**	**40**
Plasmina	**DAFK**	**41**
Plasmina	**DVLK**	**42**
Plasmina	**DAFK**	**43**
TOP	**ALLLALL**	**44**

[00153] São fornecidas neste documento composições farmacêuticas que compreendem sequências polipeptídicas. Tal como acontece com todos os peptídeos, polipeptídeos e proteínas, incluindo seus fragmentos, entende-se que podem ocorrer modificações adicionais na sequência de aminoácidos dos polipeptídeos quiméricos (variantes de sequências de aminoácidos) que não alteram a natureza ou função dos peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Essas modificações incluem substituições conservativas de aminoácidos e são discutidas em mais detalhes abaixo.

[00154] As composições fornecidas neste documento têm uma função desejada. As composições são constituídas por pelo menos um polipeptídeo de citocina, como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFNa ou IFNg, ou uma quimiocina, como CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21, uma fração de bloqueio, por exemplo, um polipeptídeo de bloqueio estérico e um elemento de prolongamento da meia-vida sérica opcional e um polipeptídeo de direcionamento opcional, com um ou mais ligantes peptídicos conectando cada polipeptídeo na composição. O primeiro polipeptídeo, por exemplo, uma muteína de IL-2, é fornecido para ser um agente ativo. A fração de bloqueio é fornecida para bloquear a atividade da interleucina. O polipeptídeo ligante, por exemplo, um polipeptídeo clivável por

protease, é fornecido para ser clivado por uma protease que é especificamente expressa no alvo pretendido do agente ativo. Opcionalmente, a fração de bloqueio bloqueia a atividade do primeiro polipeptídeo através da ligação do polipeptídeo de interleucina. Em algumas modalidades, a fração de bloqueio, por exemplo, um peptídeo de bloqueio estérico, está ligada à interleucina por meio de um ligante peptídico clivável por protease que é clivado no sítio de ação (por exemplo, por proteases específicas de inflamação ou de tumores), liberando a atividade total da citocina no sítio desejado.

[00155] O sítio de clivagem de protease pode ser um sítio de clivagem de protease de ocorrência natural ou um sítio de clivagem de protease modificado artificialmente. O sítio de clivagem de protease modificado artificialmente pode ser clivado por mais de uma protease específica para o ambiente desejado no qual a clivagem ocorrerá, por exemplo, um tumor. O sítio de clivagem da protease pode ser clivável por pelo menos uma protease, pelo menos duas proteases, pelo menos três proteases ou pelo menos quatro proteases.

[00156] Em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende glicina-glicina, um motivo de reconhecimento de sortase, ou um motivo de reconhecimento de sortase e uma sequência peptídica $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO.: 195) ou $(Gly_3Ser)_n$, (SEQ ID NO.: 196), em que n é 1, 2, 3, 4 ou 5. Em uma modalidade, o motivo de reconhecimento de sortase compreende uma sequência peptídica LPXTG (SEQ ID NO.: 193), onde X é um aminoácido. Em uma modalidade, a ligação covalente é entre um resíduo de lisina reativo ligado ao terminal C do polipeptídeo de citocina e um ácido aspártico reativo ligado ao terminal N da fração de bloqueio ou outra fração. Em uma modalidade, a ligação covalente é entre um resíduo de ácido aspártico reativo ligado ao terminal N do polipeptídeo de citocina e um resíduo de lisina reativo ligado ao terminal C da fração de bloqueio ou outra fração.

Clivagem e indutibilidade

[00157] Conforme descrito neste documento, a atividade do polipeptídeo

de citocina no contexto da proteína de fusão é atenuada e a clivagem pela protease no sítio de atividade desejado, como em um microambiente tumoral, libera uma forma da citocina a partir da proteína de fusão que é muito mais ativa como um agonista do receptor de citocina do que a proteína de fusão. Por exemplo, a atividade de ativação do receptor de citocina (agonista) do polipeptídeo de fusão pode ser de pelo menos cerca de 10X, pelo menos cerca de 50X, pelo menos cerca de 100X, pelo menos cerca de 250X, pelo menos cerca de 500X, ou pelo menos cerca de 1000x menor que a atividade de ativação do receptor de citocina do polipeptídeo de citocina como uma entidade molecular separada. O polipeptídeo de citocina que faz parte da proteína de fusão existe como uma entidade molecular separada quando contém um aminoácido que é substancialmente idêntico ao polipeptídeo de citocina e não inclui substancialmente aminoácidos adicionais e não está associado (por ligações covalentes ou não covalentes) a outras moléculas. Se necessário, um polipeptídeo de citocina como uma entidade molecular separada pode incluir algumas sequências de aminoácidos adicionais, como um marcador ou sequência curta para auxiliar na expressão e/ou purificação.

[00158] Em outros exemplos, a atividade de ativação do receptor de citocina (agonista) do polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca de 10X, pelo menos cerca de 50X, pelo menos cerca de 100X, pelo menos cerca de 250X, pelo menos cerca de 500X, ou cerca de 1000x menor que a atividade de ativação do receptor de citocina do polipeptídeo que contém o polipeptídeo de citocina que é produzido pela clivagem do ligante peptídico clivável pela protease na proteína de fusão. Em outras palavras, a atividade de ativação do receptor de citocina (agonista) do polipeptídeo que contém o polipeptídeo de citocina que é produzido pela clivagem do ligante peptídico clivável por protease na proteína de fusão é de pelo menos cerca de 10X, pelo menos cerca de 50X, pelo menos cerca de 100X, pelo menos cerca de250X, pelo menos cerca de 500X, ou pelo menos cerca de 1000x maior que a atividade de ativação do receptor de citocina da proteína de fusão.

Substituições de polipeptídeo

[00159] Os polipeptídeos descritos neste documento podem incluir componentes (por exemplo, a citocina, a fração de bloqueio) que têm a mesma sequência de aminoácidos da proteína de ocorrência natural correspondente (por exemplo, IL-2, IL-15, HSA) ou podem ter uma sequência de aminoácidos que difere da proteína de ocorrência natural, desde que a função desejada seja mantida. Entende-se que uma maneira de definir quaisquer modificações e derivados conhecidos ou aqueles que possam surgir das proteínas divulgadas, e ácidos nucleicos que as codificam, é através da definição das variantes de sequência em termos de identidade para sequências de referência conhecidas específicas. São divulgados, especificamente, polipeptídeos e ácidos nucleicos que têm pelo menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por cento de identidade com os polipeptídeos quiméricos fornecidos neste documento. Por exemplo, são fornecidos polipeptídeos ou ácidos nucleicos que têm pelo menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por cento de identidade com a sequência de qualquer um dos ácidos nucleicos ou polipeptídeos descritos neste documento. Os versados na técnica compreendem facilmente como determinar a identidade de dois polipeptídeos ou dois ácidos nucleicos. Por exemplo, a identidade pode ser calculada após o alinhamento das duas sequências para que a identidade esteja em seu nível mais alto.

[00160] Outra maneira de calcular a identidade pode ser realizada por algoritmos publicados. O alinhamento ideal de sequências para a comparação pode ser realizado pelo algoritmo de identidade local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de identidade de Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pela pesquisa pelo método de similaridade de Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA em Wisconsin Genetics Software Package, Genetics

Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) ou por inspeção.

[00161] Os mesmos tipos de identidade podem ser obtidos para ácidos nucleicos, por exemplo, pelos algoritmos divulgados em Zuker, Science 244: 48-52 (1989); Jaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706-7710 (1989); Jaeger et al., Methods Enzymol. 183: 281-306 (1989), que são incorporados neste documento por referência para pelo menos o material relacionado ao alinhamento de ácido nucleico. Entende-se que qualquer um dos métodos pode normalmente ser usado e que, em certos casos, os resultados desses vários métodos podem diferir, mas o versado na técnica entende que se a identidade for encontrada com pelo menos um desses métodos, as sequências seriam consideradas como tendo a identidade declarada, e ser divulgada neste documento.

[00162] As modificações de proteínas incluem modificações na sequência de aminoácidos. As modificações na sequência de aminoácidos podem surgir naturalmente como variações alélicas (por exemplo, devido ao polimorfismo genético), podem surgir devido à influência ambiental (por exemplo, por exposição à luz ultravioleta) ou podem ser produzidas por intervenção humana (por exemplo, por mutagênese de clonagem Sequências de DNA), tais como ponto induzido, deleção, inserção e mutantes de substituição. Essas modificações podem resultar em mudanças na sequência de aminoácidos, fornecer mutações silenciosas, modificar um sítio de restrição ou fornecer outras mutações específicas. As modificações da sequência de aminoácidos normalmente se encontram em uma ou mais das três classes: modificações substitucionais, de inserção ou deleção. As inserções incluem fusões de terminal amino e/ou carboxila, bem como inserções intrassequenciais de resíduos de aminoácidos únicos ou múltiplos. As inserções normalmente serão inserções menores do que aquelas de fusões de terminal amino ou carboxila, por exemplo, na ordem de um a quatro resíduos. As deleções são caracterizadas pela remoção de um ou mais resíduos de aminoácidos da sequência de proteína. Normalmente, não mais do que cerca de 2 a 6 resíduos são deletados em

qualquer sítio dentro da molécula de proteína. As substituições de aminoácidos são normalmente de resíduos únicos, mas podem ocorrer em vários sítios diferentes ao mesmo tempo; as inserções serão normalmente da ordem de cerca de 1 a 10 resíduos de aminoácidos; e as deleções variarão de cerca de 1 a 30 resíduos. Deleções ou inserções são feitas preferencialmente em pares adjacentes, isto é, uma deleção de 2 resíduos ou inserção de 2 resíduos. Substituições, deleções, inserções ou qualquer combinação destas podem ser combinadas para chegar a um construto final. As mutações não devem colocar a sequência fora do quadro de leitura e, preferencialmente, não criarão regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA secundária. Modificações de substituição são aquelas em que pelo menos um resíduo foi removido e um resíduo diferente foi inserido em seu lugar. Essas substituições geralmente são feitas de acordo com a Tabela 2 a seguir e são referidas como substituições conservativas.

Tabela 2. Substituições de aminoácidos exemplificativas

Aminoácido	**Substituições exemplificativas**
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, Met, Ile
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val, Met
Leu	Ile, Val, Met

Lys	Arg, Gln, Met, Ile
Met	Leu, Ile, Val
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Met, Cys
Thr	Ser, Met, Val
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met

[00163] As modificações, incluindo as substituições de aminoácidos específicas, são feitas por métodos conhecidos. Por exemplo, as modificações são feitas por mutagênese específica do sítio de nucleotídeos no DNA que codifica o polipeptídeo, produzindo assim o DNA que codifica a modificação e, em seguida, expressando o DNA em cultura de células recombinantes. As técnicas para fazer mutações de substituição em sítios predeterminados no DNA com uma sequência conhecida são bem conhecidas, por exemplo, a mutagênese do primer M13 e a mutagênese por PCR.

[00164] As modificações podem ser selecionadas para otimizar a ligação. Por exemplo, as técnicas de maturação de afinidade podem ser usadas para alterar a ligação do scFv pela introdução de mutações aleatórias dentro das regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Essas mutações aleatórias podem ser introduzidas usando uma variedade de técnicas, incluindo radiação, mutagênicos químicos ou PCR propensa a erros. Múltiplas rodadas de mutação e seleção podem ser realizadas usando, por exemplo, exibição de fagos.

[00165] A divulgação também se refere aos ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos quiméricos descritos neste documento e ao uso de tais ácidos nucleicos para produzir os polipeptídeos quiméricos e para fins terapêuticos. Por exemplo, a invenção inclui moléculas de DNA e RNA (por

exemplo, mRNA, RNA autorreplicante) que codificam um polipeptídeo quimérico e para o uso terapêutico de tais moléculas de DNA e RNA.

Composições Exemplificativas

[00166] Proteínas de fusão exemplificativas da invenção combinam os elementos descritos acima em uma variedade de orientações. As orientações descritas nesta seção são exemplos e não devem ser consideradas limitantes.

[00167] Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma citocina, uma fração de bloqueio e um elemento de prolongamento da meia-vida. Em algumas modalidades, a citocina é posicionada entre o elemento de prolongamento da meia-vida e a fração de bloqueio. Em algumas modalidades, a citocina é do terminal N para a fração de bloqueio e o elemento de prolongamento da meia-vida. Em algumas dessas modalidades, a citocina é proximal à fração de bloqueio; em algumas de tais modalidades, a citocina é proximal ao elemento de prolongamento da meia-vida. Pelo menos um ligante peptídico clivável por protease deve ser incluído em todas as modalidades, de modo que a citocina possa ser ativa após a clivagem. Em algumas modalidades, a citocina é do terminal C para a fração de bloqueio e o elemento de prolongamento da meia-vida. Elementos adicionais podem ser ligados uns aos outros por um ligante peptídico clivável, um ligante peptídico não clivável ou por fusão direta.

[00168] Em algumas modalidades, os domínios de bloqueio usados são capazes de prolongar a meia-vida e a citocina é posicionada entre dois desses domínios de bloqueio. Em algumas modalidades, a citocina é posicionada entre dois domínios de bloqueio, um dos quais é capaz de prolongar a meia-vida.

[00169] Em algumas modalidades, duas citocinas estão incluídas no mesmo construto. Em algumas modalidades, as citocinas são conectadas a dois domínios de bloqueio cada (três no total em uma molécula), com um domínio de bloqueio entre os dois domínios de citocina. Em algumas modalidades, um ou mais domínios de prolongamento da meia-vida adicionais podem ser incluídos para otimizar as propriedades farmacocinéticas. Em alguns casos, é benéfico

incluir duas da mesma citocina para facilitar a dimerização. Um exemplo de citocina que funciona como dímero é o IFNγ.

[00170] Em algumas modalidades, três citocinas estão incluídas no mesmo construto. Em algumas modalidades, a terceira citocina pode funcionar para bloquear as outras duas no lugar de um domínio de bloqueio entre as duas citocinas.

[00171] Os elementos de prolongamento da meia-vida preferenciais para uso nas proteínas de fusão são albumina sérica humana (HSA), um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, scFV, dAb) que se liga à albumina sérica, uma IgG humana ou humanizada, ou um fragmento de qualquer um dos anteriores. Em algumas modalidades preferenciais, a fração de bloqueio é albumina sérica humana (HSA), ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga à albumina sérica, um anticorpo que se liga à citocina e evita a ativação da ligação ou ativação do receptor de citocina, outra citocina ou um fragmento de qualquer um dos anteriores. Em modalidades preferenciais compreendendo um domínio de direcionamento adicional, o domínio de direcionamento é um anticorpo que se liga a uma proteína da superfície celular que é enriquecida na superfície de células cancerosas, como EpCAM, FOLR1 e Fibronectina.

Métodos de Tratamento e Composições Farmacêuticas

[00172] Além disso, são fornecidos métodos de tratamento de um sujeito com ou em risco de desenvolver uma doença ou distúrbio, como doença proliferativa, uma doença tumoral, uma doença inflamatória, um distúrbio imunológico, uma doença autoimune, uma doença infecciosa, uma doença viral, uma reação alérgica, uma reação parasitária ou doença do enxerto contra o hospedeiro. Os métodos de administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão, conforme divulgado neste documento, que é tipicamente administrada como uma composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente selecionar um sujeito com ou em risco de desenvolver tal doença ou distúrbio. A

composição farmacêutica compreende preferencialmente uma citocina bloqueada, fragmento ou muteína desta que é ativada em um sítio de inflamação ou um tumor. Em uma modalidade, o polipeptídeo quimérico compreende um polipeptídeo de citocina, fragmento ou muteína deste e um elemento de prolongamento da meia-vida sérico. Em outra modalidade, o polipeptídeo quimérico compreende um polipeptídeo de citocina, fragmento ou muteína deste e uma fração de bloqueio, por exemplo, um polipeptídeo de bloqueio estérico, em que o polipeptídeo de bloqueio estérico é capaz de bloquear estericamente a atividade do polipeptídeo de citocina, fragmento ou muteína deste. Em outra modalidade, o polipeptídeo quimérico compreende um polipeptídeo de citocina, fragmento ou muteína deste, uma fração de bloqueio e um elemento de extensão de meia-vida sérico.

[00173] A inflamação é parte da resposta biológica complexa dos tecidos do corpo a estímulos prejudiciais, como patógenos, células danificadas ou irritantes, e é uma resposta protetora que envolve células imunes, vasos sanguíneos e mediadores moleculares. A função da inflamação é eliminar a causa inicial da lesão celular, limpar as células necróticas e os tecidos danificados pelo insulto original e o processo inflamatório e iniciar o reparo do tecido. A inflamação pode ocorrer por infecção, como sintoma ou doença, por exemplo, câncer, aterosclerose, alergias, miopatias, HIV, obesidade ou uma doença autoimune. Uma doença autoimune é uma condição crônica decorrente de uma resposta imune anormal a um autoantígeno. As doenças autoimunes que podem ser tratadas com os polipeptídeos divulgados neste documento incluem, mas não estão limitadas a lúpus, doença celíaca, diabetes mellitus tipo 1, doença de Graves, doença inflamatória do intestino, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico.

[00174] A composição farmacêutica pode compreender uma ou mais sequência de ligante peptídico cliváveis por protease. A sequência de ligante peptídico serve para fornecer flexibilidade entre os polipeptídeos, de modo que cada polipeptídeo seja capaz de inibir a atividade do primeiro polipeptídeo. A

sequência de ligante peptídico pode estar localizada entre qualquer ou todos os polipeptídeos de citocina, fragmento ou muteína deste, a fração de bloqueio e o elemento de extensão de meia-vida sérico. Opcionalmente, a composição compreende, duas, três, quatro ou cinco sequência de ligante peptídico. A sequência de ligante peptídico, duas, três ou quatro sequências de ligante peptídico podem ser as mesmas ou diferentes sequências de ligante peptídico. Em uma modalidade, a sequência de ligante peptídico compreende GGGGS (SEQ ID NO: 201), GSGSGS (SEQ ID NO: 202) ou G $(SGGG)_2$SGGT (SEQ ID NO: 203). Em outra modalidade, o ligante peptídico compreende uma sequência clivável por protease selecionada do grupo consistindo em HSSKLQ (SEQ ID NO: 25), GPLGVRG (SEQ ID NO: 197), IPVSLRSG (SEQ ID NO: 198), VPLSLYSG (SEQ ID NO: 199) e SGESPAYYTA (SEQ ID NO: 200).

[00175] Em algumas modalidades, o ligante peptídico é clivado por uma protease selecionada do grupo consistindo em uma calicreína, trombina, quimase, carboxipeptidase A, catepsina G, uma elastase, PR-3, granzima M, uma calpaína, uma metaloproteinase de matriz (MMP), um ativador de plasminogênio, uma catepsina, uma caspase, uma triptase ou uma protease de superfície de célula tumoral.

[00176] Os ligantes peptídicos adequados podem ser de comprimentos diferentes, tais como de 1 aminoácido (por exemplo, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluindo 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, ou 7 aminoácidos a 8 aminoácidos e podem ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ou 60 aminoácidos.

[00177] São fornecidos adicionalmente métodos de tratamento de um sujeito com ou em risco de desenvolver câncer. Os métodos compreendem administrar ao sujeito em necessidade desta uma quantidade eficaz de um polipeptídeo quimérico (uma proteína de fusão), conforme divulgado neste

documento, que é tipicamente administrada como uma composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o método compreende ainda selecionar um sujeito com ou em risco de desenvolver câncer. A composição farmacêutica compreende preferencialmente uma citocina bloqueada, fragmento ou muteína desta que é ativada em um sítio de tumor. Preferencialmente, o tumor é um tumor sólido. O câncer pode ser, mas não limitado a, um câncer de cólon, um câncer de pulmão, um melanoma, um sarcoma, um carcinoma de células renais e um câncer de mama.

[00178] O método pode envolver adicionalmente a administração de um ou mais agentes adicionais para tratar o câncer, tais como agentes quimioterápicos (por exemplo, Adriamicina, Cerubidina, Bleomicina, Alkeran, Velban, Oncovin, Fluorouracila, Tiotepa, Metotrexato, Bisantreno, Noantrona, Tiguanina, Citaribina, Procarabizina), agentes imuno-oncológicos (por exemplo, anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-CD47, anti-GD2), terapias celulares (por exemplo, CAR-T, terapia de células T), vírus oncolíticos e semelhantes.

[00179] São fornecidas neste documento formulações farmacêuticas ou composições contendo os polipeptídeos quiméricos e um carreador farmaceuticamente aceitável. As composições fornecidas neste documento são adequadas para administração *in vitro* ou *in vivo*. Por carreador farmaceuticamente aceitável entende-se um material que não é biologicamente, ou de outra forma, indesejável, isto é, o material é administrado a um paciente sem causar efeitos biológicos indesejáveis ou interagir de um modo prejudicial com os outros componentes da formulação ou composição farmacêutica na qual está contido. O carreador é selecionado para minimizar a degradação do ingrediente ativo e minimizar os efeitos colaterais adversos no sujeito.

[00180] Os carreadores adequados e suas formulações são descritos em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy,* 21ª Edição, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Normalmente, uma quantidade apropriada de um sal farmaceuticamente aceitável é usada na formulação para tornar a formulação isotônica, embora a formulação possa ser hipertônica ou

hipotônica se desejado. Exemplos de carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, água estéril, solução salina, soluções tamponadas como solução de Ringer e solução de dextrose. O pH da solução é geralmente de cerca de 5 a cerca de 8 ou de cerca de 7 a 7,5. Outros carreadores incluem preparações de liberação sustentada, como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo os polipeptídeos imunogênicos. As matrizes estão na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes, lipossomas ou micropartículas. Certos carreadores podem ser mais preferenciais dependendo, por exemplo, da via de administração e da concentração da composição a ser administrada. Os carreadores são aqueles adequados para a administração dos polipeptídeos quiméricos ou sequências de ácido nucleico que codificam os polipeptídeos quiméricos a humanos ou outros sujeitos.

[00181] As formulações são administradas de inúmeras maneiras, dependendo se um tratamento local ou sistêmico for desejado, e na área ser tratada. As composições são administradas por meio de qualquer uma das várias vias de administração, incluindo topicamente, oralmente, parentericamente, intravenosamente, intra-articularmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente, intracavidade, transdermicamente, intra-hepaticamente, intracranialmente, por nebulização/inalação, ou por instalação via broncoscopia. Em algumas modalidades, as composições são administradas localmente (não sistemicamente), incluindo intratumoralmente, intra-articularmente, intratecalmente, etc.

[00182] As preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não aquosas estéreis. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietilenoglicol, óleos vegetais como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis como oleato de etila. Os carreadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, suspensões ou emulsões incluindo solução salina e meios tamponados. Os veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringe, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem

repositores de fluidos e nutrientes, repositores de eletrólitos (como os baseados em dextrose de Ringer) e semelhantes. Aditivos e outros conservantes estão opcionalmente presentes, como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes e semelhantes.

[00183] As formulações para a administração tópica incluem pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, sprays, líquidos e pós. Carreadores farmacêuticos convencionais, aquosos, bases de pó ou oleosas, espessantes e semelhantes são opcionalmente necessários ou desejáveis.

[00184] As composições para administração oral incluem pós ou grânulos, suspensões ou soluções em água ou meio não aquoso, cápsulas, sachês ou comprimidos. Espessantes, aromatizantes, diluentes, emulsionantes, auxiliares de dispersão ou aglutinantes são opcionalmente desejáveis.

[00185] Opcionalmente, os polipeptídeos quiméricos ou sequências de ácido nucleico que codificam os polipeptídeos quiméricos são administrados por um vetor. Existem várias composições e métodos que podem ser usados para transmitir as moléculas de ácido nucleico e/ou polipeptídeos às células, ou *in vitro* ou *in vivo* por meio de, por exemplo, vetores de expressão. Esses métodos e composições podem ser amplamente divididos em duas classes: sistemas de liberação baseados em vírus e sistemas de liberação com base não viral. Tais métodos são bem conhecidos na técnica e prontamente adaptáveis para uso com as composições e métodos descritos neste documento. Tais composições e métodos podem ser usados para transfectar ou transduzir células in vitro ou in vivo, por exemplo, para produzir linhagens celulares que expressam e, preferencialmente, segregam o polipeptídeo quimérico codificado ou para transmitir terapeuticamente ácidos nucleicos a um sujeito. Os componentes dos ácidos nucleicos quiméricos divulgados neste documento normalmente estão operacionalmente ligados na estrutura para codificar uma proteína de fusão.

[00186] Conforme usado neste documento, plasmídeos ou vetores virais são agentes que transportam os ácidos nucleicos divulgados para a célula sem degradação e incluem um promotor que produz a expressão da molécula de

ácido nucleico e/ou polipeptídeo nas células nas quais é transmitido. Os vetores virais são, por exemplo, adenovírus, vírus adenoassociado, vírus do herpes, vírus da vacina, vírus da poliomielite, Sindbis e outros vírus de RNA, incluindo esses vírus com a estrutura do HIV. Também são preferenciais quaisquer famílias virais que compartilhem as propriedades desses vírus que os tornam adequados para uso como vetores. Os vetores retrovirais, em geral, são descritos por Coffin et al., Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997), que são incorporados neste documento por referência para os vetores e métodos de produzi-los. O construto de adenovírus deficientes para a replicação foi descrita (Berkner et al., J. Virol. 61: 1213-20 (1987); Massie et al., Mol. Cell. Biol. 6: 2872-83 (1986); Haj-Ahmad et al., J. Virol. 57: 267-74 (1986); Davidson et al., J. Virol. 61: 1226-39 (1987); Zhang et al., BioTechniques 15: 868-72 (1993)). O benefício e o uso desses vírus como vetores é que eles são limitados na extensão em que podem se espalhar para outros tipos de células, uma vez que podem se replicar dentro de uma célula infectada inicial, mas são incapazes de formar novas partículas virais infecciosas. Os adenovírus recombinantes demonstraram alcançar alta eficiência após a liberação direta in vivo ao epitélio das vias aéreas, hepatócitos, endotélio vascular, parênquima do SNC e vários outros sítios de tecido. Outros sistemas úteis incluem, por exemplo, vetores de vírus vaccinia replicantes e restritos ao hospedeiro e não replicantes.

[00187] Os polipeptídeos e/ou moléculas de ácido nucleico fornecidos podem ser transmitidos por meio de partículas semelhantes a vírus. As partículas semelhantes a vírus (VLPs) consistem em proteínas virais derivadas das proteínas estruturais de um vírus. Os métodos para fazer e usar partículas semelhantes a vírus são descritos, por exemplo, em Garcea e Gissmann, Current Opinion in Biotechnology 15: 513-7 (2004).

[00188] Os polipeptídeos fornecidos podem ser transmitidos por corpos densos subvirais (DBs). Os DBs transportam proteínas para as células-alvo por fusão de membrana. Os métodos para fazer e usar DBs são descritos, por exemplo, Pepperl-Klindworth et al., Gene Therapy 10: 278-84 (2003).

[00189] Os polipeptídeos fornecidos podem ser transmitidos por agregados de tegumento. Os métodos para fazer e usar agregados de tegumento são descritos na Publicação Internacional N° WO 2006/110728.

[00190] Os métodos de liberação não baseados em vírus podem incluir vetores de expressão compreendendo moléculas de ácido nucleico e sequências de ácido nucleico que codificam polipeptídeos, em que os ácidos nucleicos estão operacionalmente ligados a uma sequência de controle de expressão. As estruturas adequadas do vetor incluem, por exemplo, aquelas rotineiramente usadas na técnica, tais como plasmídeos, cromossomos artificiais, BACs, YACs ou PACs. Vários vetores e sistemas de expressão estão comercialmente disponíveis em empresas como Novagen (Madison, Wis.), Clonetech (Pal Alto, Califórnia), Stratagene (La Jolla, Califórnia) e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, Califórnia). Os vetores normalmente contêm uma ou mais regiões reguladoras. As regiões reguladoras incluem, sem limitação, sequências promotoras, sequências potenciadoras, elementos de resposta, sítios de reconhecimento de proteína, elementos induzíveis, sequências de ligação de proteína, regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3', sítios de início de transcrição, sequências de terminação, sequências de poliadenilação e íntrons. Esses vetores também podem ser usados para fazer os polipeptídeos quiméricos por expressão em uma célula hospedeira adequada, tal como células CHO.

[00191] Os promotores preferenciais que controlam a transcrição de vetores em células hospedeiras de mamífero podem ser obtidos a partir de várias fontes, por exemplo, os genomas de vírus, tais como polioma, vírus símio 40 (SV40), adenovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e, mais preferencialmente, citomegalovírus (CMV), ou de promotores heterólogos de mamífero, por exemplo, promotor de β-actina ou promotor de EF1α, ou de promotores híbridos ou quiméricos (por exemplo, promotor de CMV fundido ao promotor de β-actina). Obviamente, os promotores da célula hospedeira ou espécies relacionadas também são úteis neste documento.

[00192] O intensificador geralmente se refere a uma sequência de DNA

que funciona a uma distância fixa do sítio de partida da transcrição e pode ser 5' ou 3' para a unidade de transcrição. Além disso, os intensificadores podem estar dentro de um íntron, bem como dentro da própria sequência de codificação. Eles geralmente têm entre 10 e 300 pares de bases (bp) de comprimento e funcionam em cis. Os estimuladores geralmente funcionam para aumentar a transcrição de promotores próximos. Os intensificadores também podem conter elementos de resposta que medeiam a regulação da transcrição. Embora muitas sequências potenciadoras sejam conhecidas de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, fetoproteína e insulina), tipicamente uma usará um potenciador de um vírus de célula eucariótica para expressão geral. Exemplos preferenciais são o potencializador SV40 no lado final da origem de replicação, o potencializador de promotor inicial do citomegalovírus, o potencializador de polioma no lado final da origem de replicação e potencializadores de adenovírus.

[00193] O promotor e/ou o intensificador podem ser indutíveis (por exemplo, regulado quimicamente ou fisicamente). Um promotor e/ou intensificador quimicamente regulado pode, por exemplo, ser regulado pela presença de álcool, tetraciclina, um esteroide ou um metal. Um promotor e/ou intensificador fisicamente regulado pode, por exemplo, ser regulado por fatores ambientais, como temperatura e luz. Opcionalmente, o promotor e/ou região intensificadora pode atuar como um promotor constitutivo e/ou intensificador para maximizar a expressão da região da unidade de transcrição a ser transcrita. Em certos vetores, o promotor e/ou a região intensificadora podem ser ativos de uma maneira específica do tipo de célula. Opcionalmente, em certos vetores, o promotor e/ou a região intensificadora podem ser ativos em todas as células eucarióticas, independentemente do tipo de célula. Os promotores preferenciais deste tipo são o promotor de CMV, o promotor de SV40, o promotor de β-actina, o promotor de EF1α e a repetição terminal longa retroviral (LTR).

[00194] Os vetores também podem incluir, por exemplo, origens de replicação e/ou marcadores. Um gene marcador pode conferir um fenótipo selecionável, por exemplo, resistência a antibióticos, em uma célula. O produto

marcador é usado para determinar se o vetor foi transmitido à célula e, uma vez transmitido, é expresso. Exemplos de marcadores selecionáveis para células de mamíferos são di-hidrofolato redutase (DHFR), timidina quinase, neomicina, análogo de neomicina G418, higromicina, puromicina e blasticidina. Quando esses marcadores selecionáveis são transferidos com sucesso para uma célula hospedeira de mamífero, a célula hospedeira de mamífero transformada pode sobreviver se colocada sob pressão seletiva. Exemplos de outros marcadores incluem, por exemplo, o gene lacZ de *E. coli* , proteína fluorescente verde (GFP) e luciferase. Além disso, um vetor de expressão pode incluir uma sequência com marca projetada para facilitar a manipulação ou detecção (por exemplo, purificação ou localização) do polipeptídeo expresso. Sequências de tag, como GFP, glutationa S-transferase (GST), poli-histidina, c-myc, hemaglutinina ou sequência de tag FLAG ™ (Kodak; New Haven, Conn.), são normalmente expressas como uma fusão com o polipeptídeo codificado. Essas marcações podem ser inseridas em qualquer lugar dentro do polipeptídeo, incluindo nos terminais carboxila ou amino.

[00195] Conforme usados neste documento, os termos peptídeo, polipeptídeo ou proteína são usados de maneira ampla, significando dois ou mais aminoácidos ligados por uma ligação peptídica. Proteína, peptídeo e polipeptídeo também são usados neste documento de maneira intercambiável para se referir a sequências de aminoácidos. Deve-se reconhecer que o termo polipeptídeo não é usado neste documento para sugerir um tamanho ou quantidade específicos de aminoácidos que compreende a molécula e que um peptídeo da invenção pode conter até inúmeros resíduos de aminoácidos ou mais. Conforme usado ao longo do documento, sujeito pode ser um vertebrado, mais especificamente um mamífero (por exemplo, um humano, cavalo, gato, cachorro, vaca, porco, ovelha, cabra, camundongo, coelho, rato e porquinho-da-índia), aves, répteis, anfíbios, peixes e qualquer outro animal. O termo não denota uma idade ou sexo específico. Assim, sujeitos adultos e recém-nascidos, sejam do sexo masculino ou feminino, devem ser abrangidos. Conforme usado

neste documento, paciente ou sujeito pode ser usado alternadamente e pode se referir a um sujeito com uma doença ou distúrbio (por exemplo, câncer). O termo paciente inclui sujeitos humanos e veterinários.

[00196] Um sujeito em risco de desenvolver uma doença ou distúrbio pode ser geneticamente predisposto à doença ou distúrbio, por exemplo, ter um histórico familiar ou ter uma mutação em um gene que causa a doença ou distúrbio, ou mostrar sinais ou sintomas precoces da doença ou transtorno. Um sujeito atualmente com uma doença ou distúrbio tem um ou mais de um sintoma da doença ou distúrbio e pode ter sido diagnosticado com a doença ou distúrbio.

[00197] Os métodos e os agentes, conforme descritos neste documento, são úteis para o tratamento profilático e terapêutico. Para uso profilático, uma quantidade terapeuticamente eficaz dos polipeptídeos quiméricos ou sequências de ácido nucleico quiméricas que codificam os polipeptídeos quiméricos descritos neste documento são administrados a um sujeito antes do início (por exemplo, antes de sinais óbvios de câncer ou inflamação) ou durante o início precoce (por exemplo, após sinais e sintomas iniciais de câncer ou inflamação). A administração profilática pode ocorrer por vários dias a anos antes da manifestação dos sintomas de câncer ou inflamação. A administração profilática pode ser usada, por exemplo, no tratamento preventivo de sujeitos diagnosticados com uma predisposição genética ao câncer. O tratamento terapêutico envolve a administração a um sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz dos polipeptídeos quiméricos ou sequências de ácido nucleico que codificam os polipeptídeos quiméricos descritos neste documento após o diagnóstico ou desenvolvimento de câncer ou inflamação (por exemplo, uma doença autoimune). O uso profilático também pode ser aplicado quando um paciente está sendo submetido a um tratamento, por exemplo, uma quimioterapia, na qual é esperada inflamação.

[00198] De acordo com os métodos ensinados neste documento, o sujeito é administrado com uma quantidade eficaz do agente (por exemplo, um polipeptídeo quimérico). Os termos quantidade eficaz e dosagem eficaz são

usados indistintamente. O termo quantidade eficaz é definido como qualquer quantidade necessária para produzir uma resposta fisiológica desejada. Quantidades eficazes e horários para administrar o agente podem ser determinados empiricamente, e fazer tais determinações está dentro da habilidade na técnica. Os intervalos de dosagem para administração são aqueles grandes o suficiente para produzir o efeito desejado no qual um ou mais sintomas da doença ou distúrbio são afetados (por exemplo, reduzidos ou retardados). A dose não deve ser tão grande a ponto de causar efeitos colaterais adversos substanciais, como indesejáveis reações cruzadas, reações anafiláticas, e assim por diante. Geralmente, a dosagem irá variar com a idade, condição, sexo, tipo de doença, a extensão da doença ou distúrbio, via de administração ou se outros fármacos estão incluídos no regime e podem ser determinados por um versado no técnica. A dosagem pode ser ajustada pelo médico individual em caso de quaisquer contraindicações. As dosagens podem variar e podem ser administradas em uma ou mais doses diárias, por um ou vários dias. As orientações podem ser encontradas na literatura para as dosagens apropriadas para determinadas classes de produtos farmacêuticos.

[00199] Conforme usado neste documento, os termos tratamento, tratar ou tratar referem-se a um método de redução dos efeitos de uma doença ou condição ou sintoma da doença ou condição. Portanto, no método divulgado, o tratamento pode se referir a uma redução de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% na gravidade de uma doença estabelecida ou condição ou sintoma da doença ou condição. Por exemplo, um método para tratar uma doença é considerado um tratamento se houver uma redução de 10% em um ou mais sintomas da doença em um sujeito em comparação com um controle. Assim, a redução pode ser de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, ou qualquer percentual de redução entre 10% e 100% em comparação com os níveis nativos ou de controle. Entende-se que o tratamento não se refere necessariamente à cura ou ablação completa da doença, condição ou sintomas da doença ou condição.

[00200] Conforme usado neste documento, os termos prevenir, prevenir e prevenção de uma doença ou distúrbio referem-se a uma ação, por exemplo, a administração do polipeptídeo quimérico ou sequência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo quimérico, que ocorre antes ou em aproximadamente ao mesmo tempo, um sujeito começa a mostrar um ou mais sintomas da doença ou distúrbio, que inibe ou retarda o início ou a exacerbação de um ou mais sintomas da doença ou distúrbio. Conforme usado neste documento, as referências à diminuição, redução ou inibição incluem uma mudança de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais em comparação com um nível de controle. Esses termos podem incluir, mas não necessariamente incluem a eliminação completa.

[00201] Foram desenvolvidas variantes de IL-2 que são seletivas para IL2Rαβγ em relação a IL2Rβγ (Shanafelt, AB, et al., 2000, Nat Biotechnol.18: 1197-202; Cassell, DJ, et. Al., 2002, Curr Pharm Des., 8: 2171-83). Estas variantes têm substituições de aminoácidos que reduzem sua afinidade para IL2RB. Como IL-2 tem afinidade indetectável para IL2RG, essas variantes, consequentemente, têm afinidade reduzida para o complexo de receptor IL2Rβγ e capacidade reduzida de ativar células que expressam IL2Rβγ, mas retêm a capacidade de se ligar a IL2RA e a capacidade de ligar e ativar o complexo de receptor IL2Rαβγ.

[00202] Uma dessas variantes, IL2/N88R (Bay 50-4798), foi clinicamente testada como uma versão de baixa toxicidade de IL-2 como um estimulador do sistema imunológico, com base na hipótese de que células NK que expressam IL2Rβγ são os principais contribuintes para a toxicidade. Bay 50-4798 demonstrou estimular seletivamente a proliferação de células T ativadas em relação às células NK e foi avaliado em ensaios clínicos de fase I/II em pacientes com câncer (Margolin, K., et. Al., 2007, Clin Cancer Res., 13: 3312-9) e pacientes com HIV (Davey, RT, et. Al., 2008, J Interferon Cytokine Res., 28: 89-100). Esses ensaios clínicos mostraram que o Bay 50-4798 era consideravelmente mais seguro e tolerável do que a aldesleucina, e também

mostrou que aumentava os níveis de células T CD4+CD25+, uma população de células enriquecida em células Treg. Em seguida a esses ensaios, a pesquisa no campo estabeleceu mais completamente a identidade das células Treg e demonstrou que as células Treg expressam seletivamente IL2Rαβγ (revisado em Malek, TR, et al., 2010, Immunity, 33: 153-65).

[00203] Além disso, podem ser feitos mutantes que alteram seletivamente a afinidade para a cadeia de CD25 em relação ao Il-2 nativo.

[00204] IL-2 pode ser projetada para produzir mutantes que se ligam ao complexo IL-2R geralmente ou à subunidade IL-2Rα especificamente com uma afinidade que difere daquela da IL-2 do tipo selvagem correspondente ou de um mutante atualmente disponível (referido como C125S, como o resíduo de cisteína na posição 125 é substituído por um resíduo de serina).

[00205] Consequentemente, a presente invenção apresenta polipeptídeos de interleucina-2 mutante (IL-2 *) que incluem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à IL-2 do tipo selvagem (por exemplo, 85, 87, 90, 95, 97, 98, ou 99% idênticos) e que se ligam, em comparação com IL-2 WT, com maior ao receptor trimérico de IL-2 em relação ao receptor de IL-2 dimérico. Normalmente, as muteínas também se ligarão a uma subunidade α do receptor de IL-2 (IL-2Rα) com uma afinidade que é maior do que a afinidade com a qual a IL-2 do tipo selvagem se liga ao IL-2Rα. A sequência de aminoácidos dentro dos polipeptídeos mutantes de IL-2 pode variar de SEQ ID NO: 1 (número de acesso UniProtKB P60568) em virtude de conter (ou conter apenas) uma ou mais substituições de aminoácidos, que podem ser consideradas substituições conservativas ou não conservativas. Aminoácidos não naturais também podem ser incorporados. Alternativamente, ou além disso, a sequência de aminoácidos pode variar de SEQ ID NO: 1 (que pode ser considerada a sequência de "referência") em virtude de conter e adicionar e/ou deletar um ou mais resíduos de aminoácidos. Mais especificamente, a sequência de aminoácidos pode diferir daquela da SEQ ID NO: 1 em virtude de uma mutação em pelo menos uma das seguintes posições

da SEQ ID NO: 1: 1, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 26, 29, 30, 31, 35, 37, 46, 48, 49, 54, 61, 64, 67, 68, 69, 71, 73, 74, 75, 76, 79, 88, 89, 90, 92, 99, 101, 103, 114, 125, 128 ou 133 (ou combinações destas). Conforme observado, apenas uma dessas posições pode ser alterada, assim como duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou 11 ou mais (incluindo até todas) das posições. Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode diferir da SEQ ID NO: 1 nas posições 69 e 74 e adicionalmente em uma ou mais das posições 30, 35 e 128. A sequência de aminoácidos também pode diferir de SEQ ID NO: 2 (conforme divulgado em US 7569215, incorporado neste documento por referência) em um dos seguintes conjuntos de posições: (a) posições 64, 69 e 74; (b) posições 69, 74 e 101; (c) posições 69, 74 e 128; (d) posições 30, 69, 74 e 103; (e) posições 49, 69, 73 e 76; (f) posições 69, 74, 101 e 133; (g) posições 30, 69, 74 e 128; (h) posições 69, 74, 88 e 99; (i) posições 30, 69, 74 e 128; (j) posições 9, 11, 35, 69 e 74; (k) posições 1, 46, 49, 61, 69 e 79; (1) posições 48, 68, 71, 90, 103 e 114; (m) posições 4, 10, 11, 69, 74, 88 e 133; (n) posições 15, 30, 31, 35, 48, 69, 74 e 92; (O) posições 30, 68, 69, 71, 74, 75, 76 e 90; (p) posições 30, 31, 37, 69, 73, 74, 79 e 128; (q) posições 26, 29, 30, 54, 67, 69, 74 e 92; (r) posições 8, 13, 26, 30, 35, 37, 69, 74 e 92; e (s) posições 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 e 89. Com exceção das mutações nessas posições, a sequência de aminoácidos do polipeptídeo mutante de IL-2 pode ser idêntica à SEQ ID NO: 1. Com relação a substituições específicas, a sequência de aminoácidos pode diferir da SEQ ID NO: 1 em virtude de ter uma ou mais das seguintes mutações: A1T, S4P, K8R, K9T, T10A, Q11R, Q13R, E15K, N26D, N29S, N30S, N30D, N30T, Y31H, Y31C, K35R, T37A, T37R, M46L, K48E, K49R, K49E, K54R, E61D, K64R, E67G, E68D, V69A, N71T, N71A, N71R, A73V, Q74P, S75P, K76E, K76R, H79R, N88D, I89V, N90H, I92T, S99P, T101A, F103S, I114V, I128T, I128A, T133A ou T133N. Nossa nomenclatura é consistente com a da literatura científica, onde o código de uma única letra do aminoácido no tipo selvagem ou sequência de referência é seguido por sua posição dentro da sequência e, em seguida, pelo código de uma única letra do aminoácido com o qual é substituído. Portanto, A1T

designa uma substituição do resíduo de alanina na posição 1 por treonina. Outros polipeptídeos mutantes dentro do escopo da invenção incluem aqueles que incluem um mutante de SEQ ID NO: 2 tendo substituições em V69 (por exemplo, A) e Q74 (por exemplo, P). Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode incluir um dos seguintes conjuntos de mutações em relação à SEQ ID NO: 2: (a) K64R, V69A e Q74P; (b) V69A, Q74P e T101A; (c) V69A, Q74P e I128T; (d) N30D, V69A, Q74P e F103S; (e) K49E, V69A, A73V e K76E; (f) V69A, Q74P, T101A e T133N; (g) N30S, V69A, Q74P e I128A; (h) V69A, Q74P, N88D e S99P; (i) N30S, V69A, Q74P e I128T; (j) K9T, Q11R, K35R, V69A e Q74P; (k) A1T, M46L, K49R, E61D, V69A e H79R; (l) K48E, E68D, N71T, N90H, F103S e I114V; (m) S4P, T10A, Q11R, V69A, Q74P, N88D e T133A; (n) E15K, N30S Y31H, K35R, K48E, V69A, Q74P e I92T; (o) N30S, E68D, V69A, N71A, Q74P, S75P, K76R e N90H; (p) N30S, Y31C, T37A, V69A, A73V, Q74P, H79R e I128T; (q) N26D, N29S, N30S, K54R, E67G, V69A, Q74P e I92T; (r) K8R, Q13R, N26D, N30T, K35R, T37R, V69A, Q74P e I92T; e (s) N29S, Y31H, K35R, T37A, K48E, V69A, N71R, Q74P, N88D e I89V. SEQ ID NO: 2 é divulgada em US 7569215, que é incorporada neste documento por referência como um exemplo de sequência polipeptídica de IL-2 que pode ser usada na invenção.

[00206] Conforme observado acima, qualquer um dos polipeptídeos mutantes de IL-2 divulgados neste documento pode incluir as sequências descritas; eles também podem ser limitados às sequências descritas e de outra forma idênticas à SEQ ID NO: 1. Além disso, qualquer um dos polipeptídeos mutantes de IL-2 descritos neste documento pode incluir opcionalmente uma substituição do resíduo de cisteína na posição 125 por outro resíduo (por exemplo, serina) e/ou pode incluir opcionalmente uma deleção do resíduo de alanina na posição 1 de SEQ ID NO: 1.

[00207] Os polipeptídeos mutantes de IL-2 divulgados neste documento podem se ligar à subunidade de IL-2Rα com um K_d de menos do que cerca de 28 nM (por exemplo, menos do que cerca de 25 nM; menos do que cerca de 5 nM; cerca de 1 nM; menos do que cerca de 500 pM; ou menos do que cerca de

100 pM). Mais especificamente, um polipeptídeo de IL-2 mutante pode ter uma constante de equilíbrio de afinidade inferior a 1,0 nM (por exemplo, cerca de 0,8, 0,6, 0,4 ou 0,2 nM). A afinidade também pode ser expressa como uma taxa relativa de dissociação de uma subunidade de IL-2Rα ou de um complexo receptor de IL-2 (por exemplo, um complexo expresso na superfície de uma célula ou de outra forma ligado à membrana). Por exemplo, os polipeptídeos mutantes de IL-2 podem se dissociar de, por exemplo, IL-2Rα, a uma taxa diminuída em relação a um polipeptídeo do tipo selvagem ou a um agente terapêutico baseado em IL-2, por exemplo, IL-2*. Alternativamente, a afinidade pode ser caracterizada como o tempo, ou tempo médio, em que um polipeptídeo IL-2* persiste, por exemplo, na superfície de uma célula que expressa uma IL-2R. Por exemplo, um polipeptídeo IL-2* pode persistir no receptor por pelo menos cerca de 2, 5, 10, 50, 100 ou 250 vezes (ou mais).

[00208] São divulgados materiais, composições e componentes que podem ser usados para, podem ser usados em conjunto com, podem ser usados em preparação para, ou são produtos dos métodos e composições divulgados. Estes e outros materiais são divulgados neste documento, e compreende-se que quando combinações, subconjuntos, interações, grupos, etc. destes materiais são divulgados que, enquanto referência específica das várias combinações individuais e coletivas e permutação desses compostos não pode ser explicitamente divulgada, cada uma é especificamente contemplada e descrita neste documento. Por exemplo, se um método é divulgado e discutido e um certo número de modificações que podem ser feitas a uma série de moléculas, incluindo o método são discutidos, cada uma e todas as combinações e permutações do método, e as modificações que são possíveis são especificamente contempladas, a menos que especificamente indicado em contrário. Da mesma forma, qualquer subconjunto ou combinação destes também é especificamente contemplado e divulgado. Este conceito aplica-se a todos os aspectos desta divulgação, incluindo, mas não se limitando a, etapas nos métodos usando as composições divulgadas. Portanto, se houver uma

variedade de etapas adicionais que podem ser executadas, compreende-se que cada uma dessas etapas adicionais pode ser realizada com quaisquer etapas de método específicas ou combinação de etapas dos métodos divulgados, e que cada tal combinação ou subconjunto de combinações é especificamente contemplado e deve ser considerado divulgado.

[00209] As publicações citadas neste documento e os materiais citados são especificamente incorporados por referência, em sua totalidade, neste documento.

EXEMPLOS

[00210] A seguir encontram-se exemplos de métodos e composições da invenção. Entende-se que várias outras modalidades podem ser praticadas, dada a descrição geral fornecida neste documento.

Exemplo 1: Detecção de IL-2, IL-2 muteína, IL-2Rα e lL-2Rγ em Proteínas de Fusão por ELISA

[00211] A muteína de IL-2 é detectada com um anticorpo comercialmente disponível, por exemplo, o monoclonal anti-IL-2 (JES6-1A12) (BD Pharmingen; San Jose, CA). Um controle positivo é usado para mostrar se o anticorpo monoclonal reconhece a citocina ou muteína. Anticorpos contra IL-2Rα e cadeia de lL-2Rγ também são usados. Os poços de uma placa de 96 poços são revestidos com um anticorpo (2,5 µg/ml) em PBS. Os poços são bloqueados com 5% de leite desnatado em PBS com 0,2% de Tween®20 (PBS-M-Tw) e as proteínas de fusão são adicionadas durante 1-2 horas a 37°C. Após a lavagem, um anticorpo marcado com anti-IL-2,, por exemplo, JES5H4 (BD Pharmingen) é adicionado e a ligação é detectada usando Strepavidin HRP (Southern Biotechnology Associates; Birmingham, Ala.). A placa ELISA é desenvolvida pela adição de 50 µl de O-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) em 0,1 M de Citrato, pH 4,5 e 0,04% de H_2O_2, interrompida pela adição de 50 µl/poço, 2N H_2SO_4 e a absorbância foi lida a 490 nm.

Exemplo 2: Clivagem de Protease da Proteína de Fusão pela Protease MMP9

[00212] Um versado na técnica estaria familiarizado com métodos de configuração de ensaio de clivagem de proteína. 100ug de proteína em 1xPBS pH 7,4 foram clivados com 1 ug de MMP9 ativo (catálogo Sigma # SAE0078-50 ou catálogo Enzo BML-SE360) e incubados em temperatura ambiente durante até 16 horas. A proteína digerida é, em seguida, usada em ensaios funcionais ou armazenada a -80°°C antes do teste. A extensão da clivagem foi monitorada por SDS PAGE usando métodos bem conhecidos na técnica. Conforme mostrado nas **FIGs. 10, 13, 18a, 18b, 24b, 24c e 27a,** uma clivagem total das proteínas de fusão pela protease MMP9 é observada.

Exemplo 3: Ensaio de CTLL-2

[00213] As células CTLL2 (ATCC) foram semeadas em suspensão a uma concentração de 500.000 células/poço em meio de cultura com ou sem albumina sérica humana (HSA) 40mg/ml e estimuladas com uma série de diluições de hIL2 recombinante ou hIL2 ativável durante 72 horas a 37°°C e 5% de CO_2. A atividade de hIL2 ativável não clivada e clivada foi testada. A hIL2 ativável clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. A atividade celular foi avaliada usando um ensaio de viabilidade celular baseado em luminescência CellTiter-Glo (Promega). Os resultados são mostrados nas **FIGs. 8, 9 e 25.**

Exemplo 4: Clivagem de protease do polipeptídeo quimérico IL-2/IL-2Rα/IL-2Rγ resulta em maior acessibilidade a anticorpos e muteína de IL-2 biologicamente ativa

[00214] As proteínas de fusão da muteína de IL-2 são bioquimicamente caracterizadas antes e após a clivagem com uma protease, por exemplo, PSA. As análises de imunoblot mostrarão que as proteínas de fusão podem ser clivadas por PSA e que há um aumento na intensidade do produto de clivagem de baixo peso molecular previsto de aproximadamente 20 kDa reativo com um anticorpo anti-IL-2 após o tratamento das amostras com PSA. O grau de clivagem depende da quantidade de PSA, bem como do tempo de incubação. Curiosamente, quando a proteína de fusão é analisada antes e depois do

tratamento com PSA por ELISA, verificou-se que a quantidade aparente de IL-2 aumenta após a clivagem do PSA. Nesta experiência, existe um aumento de aproximadamente 2 ou 4 vezes na quantidade aparente de IL-2 detectada usando este ELISA sanduíche dependendo do construto, sugerindo que a ligação do anticorpo é parcialmente impedida na proteína de fusão intacta. Alíquotas das mesmas amostras também são analisadas após o tratamento com PSA usando a linhagem celular CTLL-2 que requer IL-2 para crescimento e sobrevivência e a viabilidade das células pode ser verificada usando o ensaio MTT colorimétrico. Neste ensaio, quanto mais um sobrenadante puder ser diluído, mais IL-2 biologicamente ativa ele conterá, e há um aumento na quantidade de IL-2 biologicamente ativa após a clivagem de PSA. A quantidade de aumento da muteína de IL-2 irá sugerir que após a clivagem de PSA há um aumento no fragmento de clivagem de baixo peso molecular previsto de aproximadamente 20 kDa reativo com um anticorpo anti-IL-2, um aumento na acessibilidade do anticorpo e, o mais importante, um aumento na quantidade de muteína de IL-2 biologicamente ativa.

Exemplo 5: Liberação *In Vivo* de uma Proteína de Fusão Ativada por Protease Resulta em Redução no Crescimento Tumoral

[00215] O polipeptídeo quimérico é examinado para determinar se poderia ter efeitos biológicos *in vivo*. Para esses experimentos, um sistema é usado no qual as células tumorais injetadas de forma intraperitoneal rápida e preferencialmente fixam-se e crescem inicialmente nas manchas leitosas, uma série de agregados imunes organizados encontrados no omento (Gerber et al., Am. J. Pathol. 169:1739-52 (2006)). Este sistema oferece uma maneira conveniente de examinar os efeitos do tratamento com proteína de fusão no crescimento tumoral, uma vez que as proteínas de fusão podem ser liberadas por via intraperitoneal várias vezes, e o crescimento tumoral pode ser analisado examinando as células omentais dissociadas. Para esses experimentos, a linhagem celular Colon 38, uma linhagem celular de tumor de crescimento rápido que expressa tanto MMP2 quanto MMP9 *in vitro*, pode ser usada. O tecido

omental normalmente expressa uma quantidade relativamente pequena de MMP2 e MMP9, mas, quando o tumor da Colon 38 está presente no omento, os níveis de MMP aumentam. Usando este modelo de tumor, a capacidade das proteínas de fusão de muteína de IL-2 para afetar o crescimento tumoral é examinada. As células da Colon 38 são injetadas por via intraperitoneal, permite-se que se fixem e cresçam por 1 dia e, em seguida, são tratadas diariamente com proteína de fusão por via interaperitoneal. No dia 7, os animais são sacrificados e o omento é examinado quanto ao crescimento tumoral usando citometria de fluxo e por um ensaio de formação de colônia.

Exemplo 6: Construção de um CD20 de Direcionamento de Proteína IL2 Ativável Exemplificativa

Geração de um domínio de IL2 ativável

[00216] Um polipeptídeo de IL-2 capaz de se ligar a um polipeptídeo de CD20 presente em um tumor ou em uma célula tumoral é produzido como segue. É produzido um ácido nucleico que contém sequências de ácido nucleico: (1) codificando uma sequência de polipeptídeo IFNg e (2) um ou mais ligantes polipeptídicos. Os construtos de plasmídeos de interleucina ativável podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais, e são eletroporados para HEK293 ou outras linhagens celulares de humano ou de mamífero adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem ensaios de ativação de células T que usam células T responsivas à estimulação de IFNg na presença de uma protease.

Geração de um domínio de ligação scFv CD20

[00217] A CD20 é uma das proteínas de superfície celular presentes nos linfócitos B. O antígeno CD20 é encontrado em linfócitos pré-B e B maduros normais e malignos, incluindo aqueles em mais de 90% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) de células B. O antígeno está ausente nas células-tronco hematopoiéticas, nos linfócitos B ativados (células plasmáticas) e no tecido normal. Dessa forma, vários anticorpos principalmente de origem murina foram descritos: 1F5, 2B8/C2B8, 2H7 e 1H4.

[00218] Os anticorpos anti-CD20 humanos ou humanizados são, portanto, usados para gerar sequências de scFv para domínios de ligação a CD20 de uma proteína de interleucina ativável. Sequências de DNA que codificam domínios VL e VH humanos ou humanizados são obtidas, e os códons para os construtos são, opcionalmente, otimizados para expressão em células de Homo sapiens. A ordem em que os domínios VL e VH aparecem no scFv é variada (ou seja, orientação VL-VH ou VH-VL), e três cópias de "G4S" (SEQ ID NO.: 201) ou “G_4S” (SEQ ID NO.: 201) subunidade $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO.: 204) conectam os domínios variáveis para criar o domínio de scFv. Os construtos de plasmídeos de scFv anti-CD20 podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais, e são eletroporados para HEK293 ou outras linhagens celulares de humano ou de mamífero adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem análise de ligação por FACS, análise cinética usando Proteon e coloração de células que expressam CD20.

Clonagem de construtos de expressão de DNA que codificam a proteína IL2 ativável

[00219] O construto de IL2 ativável com domínios de sítio de clivagem de protease é usado para construir uma proteína interleucina ativável em combinação com um domínio de scFv anti-CD20 e um elemento de extensão da meia-vida sérica (por exemplo, um peptídeo de ligação de HSA ou domínio VH), com os domínios organizados conforme mostrado na **Figura 11**. Para a expressão de uma proteína interleucina ativável em células CHO, as sequências de codificação de todos os domínios de proteína são clonadas em um sistema de vetor de expressão de mamífero. Em resumo, as sequências genéticas que codificam o domínio de interleucina ativável, o elemento de extensão da meia-vida sérica e o domínio de ligação de CD20 juntamente com os ligantes peptídicos L1 e L2 são sintetizadas e subclonadas separadamente. Os construtos resultantes são então ligados entre si na ordem do domínio de ligação de CD20 – L1 – IL2, subunidade 1 – L2 –, domínio de clivagem de protease – L3 – IL2, subunidade 2 – L4 – anti-CD20 scFv – L5 –, elemento de extensão de

meia-vida sérica para produzir um construto final. Todos os construtos de expressão são projetados para conter sequências de codificação para um peptídeo sinal N-terminal e uma (6xHis)-tag de hexa-histidina do terminal C (SEQ ID NO.: 205) para facilitar a secreção e purificação de proteínas, respectivamente.

Expressão de proteínas IL2 ativáveis em células CHO transfectadas de forma estável

[00220] Um sistema de expressão de células CHO (Flp-In®, Life Technologies), um derivado de células de ovário de Hamster Chinês CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao e Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968;60(4):1275-81), é usado. As células aderentes são subcultivadas de acordo com os protocolos de cultura celular padrão fornecidos pela Life Technologies.

[00221] Para adaptação ao crescimento em suspensão, as células são separadas dos frascos de cultura de tecidos e colocadas em meio sem soro. As células adaptadas à suspensão são criopreservadas em meio com 10% de DMSO.

[00222] As linhagens celulares de CHO recombinantes que expressam, de forma estável, proteínas interleucina ativáveis secretadas são geradas por transfecção de células adaptadas a suspensão. Durante a seleção com o antibiótico Higromicina B, as densidades celulares viáveis são medidas duas vezes por semana, e as células são centrifugadas e ressuspensas em meio de seleção novo a uma densidade máxima de $0,1x10^6$ células viáveis/mL. Agrupamentos de células que expressam, de forma estável, proteínas interleucina ativáveis são recuperados após 2-3 semanas de seleção, ponto em que as células são transferidas para o meio de cultura padrão em frascos de agitação. A expressão de proteínas secretadas recombinantes é confirmada pela realização de eletroforese em gel de proteínas ou citometria de fluxo. Os agrupamentos de células estáveis são criopreservados em meio contendo DMSO.

[00223] As proteínas IL2 ativáveis são produzidas em culturas

descontínuas alimentadas de 10 dias de linhagens celulares de CHO transfectadas de forma estável por secreção no sobrenadante da cultura celular. Os sobrenadantes da cultura celular são colhidos após 10 dias em viabilidades de cultura de, tipicamente, >75%. Amostras são coletadas das culturas de produção em dias alternados, e a densidade celular e a viabilidade são avaliadas. No dia da coleta, os sobrenadantes da cultura celular são limpos por centrifugação e filtração a vácuo antes de serem usados.

[00224] Os títulos de expressão de proteína e a integridade do produto em sobrenadantes de cultura celular são analisados por SDS-PAGE.

Purificação de proteínas IL2 ativáveis

[00225] Proteínas IL2 ativáveis são purificadas a partir de sobrenadantes de cultura celular de CHO em um procedimento de duas etapas. Os construtos são submetidos a cromatografia de afinidade em uma primeira etapa, seguido por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) preparativa em Superdex 200 em uma segunda etapa. As amostras são trocadas por tampão e concentradas por ultrafiltração a uma concentração típica de >1 mg/mL. A pureza e a homogeneidade (tipicamente >90%) das amostras finais são avaliadas por SDS PAGE sob condições redutoras e não redutoras, o que é seguido por imunoblot usando um anticorpo anti-HSA ou anti-idiotipo, bem como por SEC analítica, respectivamente. As proteínas purificadas são armazenadas em alíquotas a -80°C até o uso.

Exemplo 7: Determinação da afinidade do antígeno por citometria de fluxo

[00226] As proteínas interleucina ativáveis do Exemplo 1 são testadas quanto às suas afinidades de ligação a células $CD20^+$ humanas e células $CD20^+$ de cynomolgus.

[00227] As células $CD20^+$ são incubadas com 100 µL de diluições em série das proteínas interleucina ativáveis do Exemplo 1 e pelo menos uma protease. Após três lavagens com tampão FACS, as células são incubadas com 0,1 mL de anticorpo anti-idiotipo monoclonal de camundongo a 10 µg/mL no

mesmo tampão durante 45 min em gelo. Após um segundo ciclo de lavagem, as células são incubadas com 0,1 mL de anticorpos IgG anti-camundongo de cabra conjugados com FITC a 15 µg/mL nas mesmas condições anteriores. Como um controle, as células são incubadas com a IgG anti-His seguida pelos anticorpos IgG de cabra anti-camundongo conjugados com FITC sem as proteínas IL2 ativáveis. As células foram então lavadas novamente e ressuspensas em 0,2 mL de tampão FACS contendo 2 µg/mL de iodeto de propídio (PI) para excluir células mortas. A fluorescência de $1x10^4$ células vivas é medida usando um citômetro de fluxo Beckman-Coulter FC500 MPL usando o software MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemanha) ou um citômetro de fluxo Millipore Guava EasyCyte usando o software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemanha). As intensidades de fluorescência médias das amostras de células são calculadas usando software CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemanha) ou software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemanha). Depois de retirar os valores de intensidade de fluorescência das células coradas apenas com os reagentes secundários e terciários, os valores são então usados para o cálculo dos valores K_D com a equação para ligação de um sítio (hipérbole) do GraphPad Prism (versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia EUA).

[00228] A ligação e a reatividade cruzada de CD20 são avaliadas nas linhagens celulares tumorais $CD20^+$ humanas. A razão de K_D de reatividade cruzada é calculada usando os valores de K_D determinados nas linhagens celulares de CHO que expressam antígenos de cynomolgus recombinantes ou antígenos de humanos recombinantes.

Exemplo 8: Ensaio de Citotoxicidade

[00229] A proteína interleucina ativável do Exemplo 6 é avaliada *in vitro* na sua mediação da resposta imune a células-alvo $CD20^+$.

[00230] As células $CD20^+$ REC-1 marcadas com fluorescência (uma linhagem celular de linfoma de células do manto, ATCC CRL-3004) são incubadas com PBMC isoladas de doadores aleatórios ou células T CB15 (linhagem de células T padronizada) como células efetoras na presença da

proteína IL2 ativável do Exemplo 6 e pelo menos uma protease. Após incubação por 4 h a 37 °C em uma incubadora umidificada, a liberação do corante fluorescente das células-alvo para o sobrenadante é determinada em um espectrofluorímetro. As células-alvo incubadas sem a proteína IL2 ativável do Exemplo 6 e células-alvo totalmente lisadas pela adição de saponina no final da incubação servem como controles negativos e positivos respectivamente.

[00231] Com base nas células-alvo vivas restantes medidas, a porcentagem de lise celular específica é calculada de acordo com a seguinte fórmula: [1-(número de alvos $vivos_{(amostra)}$/número de alvos $vivos_{(espontâneo)}$)] x 100%. As curvas de resposta à dose sigmoidais e os valores de EC_{50} são calculados por regressão não linear/ajuste logístico de 4 parâmetros usando o software GraphPad. Os valores de lise obtidos para uma determinada concentração de anticorpos são usados para calcular curvas de resposta à dose sigmoidais por análise de ajuste logístico de 4 parâmetros usando o software Prism.

Exemplo 9: Farmacocinética de Proteínas interleucina ativáveis

[00232] A proteína interleucina ativável do Exemplo 5 é avaliada quanto à meia-vida de eliminação em estudos com animais.

[00233] A proteína IL2 ativável é administrada em macacos cynomolgus como uma injeção em bolus a 0,5 mg/kg na veia safena. Outro grupo de macacos cynomolgus recebe um construto de IL2 comparável em tamanho, mas sem um elemento de prolongamento da meia-vida sérica. Um terceiro e um quarto grupos recebem um construto de IL2 com elementos de extensão da meia-vida sérica e uma citocina com CD20 e elementos de extensão da meia-vida sérica respectivamente, e ambos comparáveis em tamanho à proteína interleucina ativável. Cada grupo de teste consiste em 5 macacos. As amostras de soro são colhidas em pontos de tempo indicados, diluídas em série, e a concentração das proteínas é determinada usando um ELISA de ligação a CD20.

[00234] A análise farmacocinética é realizada usando as concentrações plasmáticas do artigo de teste. Os dados de plasma médios do grupo para cada

artigo de teste estão em conformidade com um perfil multiexponencial quando plotados em relação ao tempo pós-dosagem. Os dados são ajustados por um modelo de dois compartimentos padrão com entrada de bolus e constantes de taxa de primeira ordem para as fases de distribuição e eliminação. A equação geral para o melhor ajuste dos dados para administração i.v. é: $c(t)=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$, onde c(t) é a concentração plasmática no tempo t, A e B se interceptam no eixo Y, e α e β são as constantes de taxa de primeira ordem aparentes para as fases de distribuição e eliminação respectivamente. A fase α é a fase inicial da depuração e reflete a distribuição da proteína em todo o fluido extracelular do animal, enquanto a segunda porção ou porção da fase β da curva de decaimento representa a depuração plasmática verdadeira. Os métodos para ajustar tais equações são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, A=D/V(α−k21)/(α−β), B=D/V(β−k21)/(α−β), e α e β (para α>β) são raízes da equação quadrática: $r^2+(k12+k21+k10)r+k21k10=0$ usando parâmetros estimados de V=volume de distribuição, k10=taxa de eliminação, k12=taxa de transferência do compartimento 1 para o compartimento 2 e k21=taxa de transferência do compartimento 2 para o compartimento 1 e D=dose administrada.

[00235] Análise de dados: Gráficos de concentração versus perfis de tempo são feitos usando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Os valores relatados como menos do que relatáveis (LTR) não são incluídos na análise de PK e não são representados graficamente. Os parâmetros farmacocinéticos são determinados por análise compartimental usando o software WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, Calif). Os parâmetros farmacocinéticos são calculados conforme descrito em Ritschel W A e Kearns G L, 1999, IN: *Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications,* 5ª edição, American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC

[00236] Espera-se que a proteína interleucina ativável do Exemplo 5 tenha parâmetros farmacocinéticos aprimorados, como um aumento na meia-

vida de eliminação em comparação com proteínas sem um elemento de extensão da meia-vida sérica.

Exemplo 10: Modelo de Tumor de Xenoenxerto

[00237] A proteína IL2 ativável do Exemplo 6 é avaliada em um modelo de xenoenxerto.

[00238] Camundongos NOD/scid imunodeficientes fêmeas são irradiados subletalmente (2 Gy) e inoculados por via subcutânea com $4x10^6$ células Ramos RA1 no flanco dorsal direito. Quando os tumores atingem 100 a 200 mm^3, os animais são alocados em 3 grupos de tratamento. Os grupos 2 e 3 (8 animais cada) são injetados por via intraperitoneal com $1,5x10^7$ células T humanas ativadas. Três dias depois, os animais do Grupo 3 são subsequentemente tratados com um total de 9 doses intravenosas de 50 µg de proteína interleucina ativável do Exemplo 6 (qdx9d). Os grupos 1 e 2 são tratados apenas com veículo. O peso corporal e o volume tumoral são determinados durante 30 dias.

[00239] Espera-se que os animais tratados com a proteína interleucina ativável do Exemplo 5 tenham um atraso estatisticamente significativo no crescimento tumoral em comparação com o respectivo grupo de controle tratado com veículo.

[00240] Embora as modalidades preferíveis da presente invenção tenham sido mostradas e descritas neste documento, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas somente a título de exemplo. Diversas variações, alterações e substituições ocorrerão agora àqueles versados na técnica, sem que haja afastamento da invenção. Deve-se entender que diversas alternativas às modalidades da invenção descritas neste documento podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as seguintes reivindicações definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam abrangidos.

Exemplo 11: Ensaio de Sobrevida de Células IFNg WEHI de

Camundongo

[00241] As células WEHI279 (ATCC) foram semeadas em suspensão a uma concentração de 25.000 células/poço em meio de cultura com ou sem 1,5% de albumina sérica humana (HSA) e estimuladas com uma série de diluições de mIFNg recombinante ou mIFNg induzível durante 72 horas a 37°C e 5% de CO_2. A atividade de mIFNg indutível não clivado e clivado foi testada. A mIFNg indutível clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. A sobrevida celular foi avaliada usando um ensaio de viabilidade celular baseado em luminescência CellTiter-Glo (Promega). Os valores de EC50 para moléculas de mIFNg indutíveis clivadas foram pelo menos 100x mais potentes do que as moléculas de mIFNg indutíveis não clivadas. Conforme mostrado na **FIG. 16,** foi observada maior indutibilidade em ensaios em que o meio de cultura continha albumina sérica humana.

Exemplo 12: Ensaio de Célula Repórter IFNg B16 de Camundongo

[00242] Células B16-Blue IFNg (InvivoGen) foram semeadas a uma concentração de 75.000 células / poço em meio de cultura com ou sem 1,5% de albumina sérica humana (HSA) e estimuladas com uma série de diluição de mIFNg recombinante ou mIFNg induzível durante 24 horas a 37°°C e 5% de CO_2. A atividade de mIFNg indutível não clivado e clivado foi testada. A mIFNg indutível clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. Os sobrenadantes foram coletados e a ativação de SEAP foi avaliada pela adição de QUANTI-Blue Reagent (InvivoGen), incubação a 37°°C durante 2 horas e medição da absorbância a 620 nm. Os resultados são mostrados nas **Figs. 17, 19, 22, 23 e 28.** Este experimento foi repetido para proteínas de fusão IFNa usando células IFNa/b B16-Blue. Os valores de EC50 para moléculas de mIFNa indutíveis clivadas foram pelo menos 100x mais potentes do que as moléculas de mIFNa indutíveis não clivadas.

Exemplo 13.Liberação *In Vivo* de uma Proteína de Fusão Ativada por Protease Resulta em Redução no Crescimento Tumoral

[00243] O polipeptídeo quimérico é examinado para determinar se poderia ter efeitos biológicos *in vivo*. Para esses experimentos, um sistema é usado no qual as células tumorais injetadas de forma intraperitoneal rápida e preferencialmente fixam-se e crescem inicialmente nas manchas leitosas, uma série de agregados imunes organizados encontrados no omento (Gerber et al., Am. J. Pathol. 169:1739-52 (2006)). Este sistema oferece uma maneira conveniente de examinar os efeitos do tratamento com proteína de fusão no crescimento tumoral, uma vez que as proteínas de fusão podem ser liberadas por via intraperitoneal várias vezes, e o crescimento tumoral pode ser analisado examinando as células omentais dissociadas. Para esses experimentos, a linhagem celular Colon 38, uma linhagem celular de tumor de crescimento rápido que expressa tanto MMP2 quanto MMP9 *in vitro*, pode ser usada. O tecido omental normalmente expressa uma quantidade relativamente pequena de MMP2 e MMP9, mas, quando o tumor da Colon 38 está presente no omento, os níveis de MMP aumentam. Usando este modelo de tumor, a capacidade das proteínas de fusão IFN para afetar o crescimento tumoral é examinada. As células da Colon 38 são injetadas por via intraperitoneal, permite-se que se fixem e cresçam por 1 dia e, em seguida, são tratadas diariamente com proteína de fusão por via interaperitoneal. No dia 7, os animais são sacrificados e o omento é examinado quanto ao crescimento tumoral usando citometria de fluxo e por um ensaio de formação de colônia.

Exemplo 13b: O polipeptídeo quimérico foi examinado para determinar seus efeitos biológicos *in vivo*.

[00244] A linhagem celular MC38, uma linhagem celular de adenocarcinoma do cólon de crescimento rápido que expressa MMP9 *in vitro*, foi usada. Usando este modelo de tumor, a capacidade das proteínas de fusão IFNγ para afetar o crescimento tumoral foi examinada. As células MC38 foram injetadas por via subcutânea, permitidas crescer durante 10-14 dias e, em seguida, tratadas com proteína de fusão duas vezes por semana por via

intraperitoneal por um total de quatro doses, nos níveis mostrados na **FIG. 21.** Como um comparador, mIFNγ do tipo selvagem foi administrada nos níveis de dose indicados, duas vezes ao dia durante 2 semanas em um cronograma de 5 dias sim/2 dias não (10 doses no total). O crescimento do tumor e o peso corporal foram monitorados aproximadamente duas vezes por semana durante duas semanas.

Exemplo 14: Construção de um CD20 de Direcionamento de Proteína IFNg Exemplificativa

Geração de um domínio de citocina ativável

[00245] Um polipeptídeo de IFNg capaz de se ligar a um polipeptídeo de CD20 presente em um tumor ou em uma célula tumoral é produzido como segue. É produzido um ácido nucleico que contém sequências de ácido nucleico: (1) codificando uma sequência de polipeptídeo IFNg e (2) um ou mais ligantes polipeptídicos. Os construtos de plasmídeos de IFNg ativável podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais, e são eletroporados para HEK293 ou outras linhagens celulares de humano ou de mamífero adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem ensaios de ativação de células T que usam células T responsivas à estimulação de IFNg na presença de uma protease.

Geração de um domínio de ligação scFv CD20

[00246] A CD20 é uma das proteínas de superfície celular presentes nos linfócitos B. O antígeno CD20 é encontrado em linfócitos pré-B e B maduros normais e malignos, incluindo aqueles em mais de 90% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) de células B. O antígeno está ausente nas células-tronco hematopoiéticas, nos linfócitos B ativados (células plasmáticas) e no tecido normal. Dessa forma, vários anticorpos principalmente de origem murina foram descritos: 1F5, 2B8/C2B8, 2H7 e 1H4.

[00247] Os anticorpos anti-CD20 humanos ou humanizados são, portanto, usados para gerar sequências de scFv para domínios de ligação a CD20 de uma proteína IFNg ativável. Sequências de DNA que codificam

domínios VL e VH humanos ou humanizados são obtidas, e os códons para os construtos são, opcionalmente, otimizados para expressão em células de Homo sapiens. A ordem em que os domínios VL e VH aparecem no scFv é variada (ou seja, orientação VL-VH ou VH-VL), e três cópias de "G4S" (SEQ ID NO.: 201) ou “G_4S” (SEQ ID NO.: 201) subunidade $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO.: 204) conectam os domínios variáveis para criar o domínio de scFv. Os construtos de plasmídeos de scFv anti-CD20 podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais, e são eletroporados para HEK293 ou outras linhagens celulares de humano ou de mamífero adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem análise de ligação por FACS, análise cinética usando Proteon e coloração de células que expressam CD20.

Clonagem de construtos de expressão de DNA que codificam a proteína IFNg ativável

[00248] O construto de IFNg ativável com domínios de sítio de clivagem de protease é usado para construir uma proteína iIFNg ativável em combinação com um domínio de scFv anti-CD20 e um elemento de extensão da meia-vida sérica (por exemplo, um peptídeo de ligação de HSA ou domínio VH), com os domínios organizados conforme mostrado na **FIG. 14**. Para a expressão de uma proteína IFNg ativável em células CHO, as sequências de codificação de todas e ahomogeneidade (normalmente >90%) das amostras finais foram avaliadas por SDS PAGE em condições redutoras e não redutoras, seguido por imunoblot usando um anticorpo anti-HSA ou anti-idiotipo, bem como por SEC analítica, respectivamente. As proteínas purificadas foram armazenadas em alíquotas a -80ºC até o uso.

Expressão de proteínas IFNg ativáveis em células CHO transfectadas de forma estável

[00249] Um sistema de expressão de células CHO (Flp-In®, Life Technologies), um derivado de células de ovário de Hamster Chinês CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao e Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968;60(4):1275-81), é usado. As células aderentes são subcultivadas de acordo com os protocolos de

cultura celular padrão fornecidos pela Life Technologies.

[00250] Para adaptação ao crescimento em suspensão, as células são separadas dos frascos de cultura de tecidos e colocadas em meio sem soro. As células adaptadas à suspensão são criopreservadas em meio com 10% de DMSO.

[00251] As linhagens celulares de CHO recombinantes que expressam, de forma estável, proteínas IFNg ativáveis secretadas são geradas por transfecção de células adaptadas a suspensão. Durante a seleção com o antibiótico Higromicina B, as densidades celulares viáveis são medidas duas vezes por semana, e as células são centrifugadas e ressuspensas em meio de seleção fresco a uma densidade máxima de $0,1x10^6$ células viáveis/mL. Agrupamentos de células que expressam, de forma estável, proteínas IFNg ativáveis são recuperados após 2-3 semanas de seleção, ponto em que as células são transferidas para o meio de cultura padrão em frascos de agitação. A expressão de proteínas secretadas recombinantes é confirmada pela realização de eletroforese em gel de proteínas ou citometria de fluxo. Os agrupamentos de células estáveis são criopreservados em meio contendo DMSO.

[00252] As proteínas IFNg ativáveis são produzidas em culturas descontínuas alimentadas de 10 dias de linhagens celulares de CHO transfectadas de forma estável por secreção no sobrenadante da cultura celular. Os sobrenadantes da cultura celular são colhidos após 10 dias em viabilidades de cultura de, tipicamente, >75%. Amostras são coletadas das culturas de produção em dias alternados, e a densidade celular e a viabilidade são avaliadas. No dia da coleta, os sobrenadantes da cultura celular são limpos por centrifugação e filtração a vácuo antes de serem usados.

[00253] Os títulos de expressão de proteína e a integridade do produto em sobrenadantes de cultura celular são analisados por SDS-PAGE.

Purificação de proteínas IFNg ativáveis

[00254] Proteínas IFNg ativáveis são purificadas a partir de

sobrenadantes de cultura celular de CHO em um procedimento de duas etapas. Os construtos são submetidos a cromatografia de afinidade em uma primeira etapa, seguido por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) preparativa em Superdex 200 em uma segunda etapa. As amostras são trocadas por tampão e concentradas por ultrafiltração a uma concentração típica de >1 mg/mL. A pureza e a homogeneidade (tipicamente >90%) das amostras finais são avaliadas por SDS PAGE sob condições redutoras e não redutoras, o que é seguido por imunoblot usando um anticorpo anti-HSA ou anti-idiotipo, bem como por SEC analítica, respectivamente. As proteínas purificadas são armazenadas em alíquotas a -80°C até o uso.

Exemplo 15: Determinação da afinidade do antígeno por citometria de fluxo

[00255] As proteínas IFNg ativáveis do Exemplo 14 são testadas quanto às suas afinidades de ligação a células $CD20^+$ humanas e células $CD20^+$ de cynomolgus.

[00256] As células $CD20^+$ são incubadas com 100 µL de diluições em série das proteínas IFNg ativáveis do Exemplo 14 e pelo menos uma protease. Após três lavagens com tampão FACS, as células são incubadas com 0,1 mL de anticorpo anti-idiotipo monoclonal de camundongo a 10 µg/mL no mesmo tampão durante 45 min em gelo. Após um segundo ciclo de lavagem, as células são incubadas com 0,1 mL de anticorpos IgG anti-camundongo de cabra conjugados com FITC a 15 µg/mL nas mesmas condições anteriores. Como um controle, as células são incubadas com a IgG anti-His seguida pelos anticorpos IgG de cabra anti-camundongo conjugados com FITC sem as proteínas IFNg ativáveis. As células foram então lavadas novamente e ressuspensas em 0,2 mL de tampão FACS contendo 2 µg/mL de iodeto de propídio (PI) para excluir células mortas. A fluorescência de $1x10^4$ células vivas é medida usando um citômetro de fluxo Beckman-Coulter FC500 MPL usando o software MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemanha) ou um citômetro de fluxo Millipore Guava EasyCyte usando o software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemanha).

As intensidades de fluorescência médias das amostras de células são calculadas usando software CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemanha) ou software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemanha). Depois de retirar os valores de intensidade de fluorescência das células coradas apenas com os reagentes secundários e terciários, os valores são então usados para o cálculo dos valores K_D com a equação para ligação de um sítio (hipérbole) do GraphPad Prism (versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia EUA).

[00257] A ligação e a reatividade cruzada de CD20 são avaliadas nas linhagens celulares tumorais $CD20^+$ humanas. A razão K_D de reatividade cruzada é calculada usando os valores K_D determinados nas linhagens celulares de CHO que expressam antígenos de cynomolgus recombinantes ou antígenos de humanos recombinantes.

Exemplo 16: Ensaio de Citotoxicidade

[00258] A proteína IFNg ativável do Exemplo 14 é avaliada *in vitro* na sua mediação da resposta imune a células-alvo $CD20^+$.

[00259] As células $CD20^+$ REC-1 marcadas com fluorescência (uma linhagem celular de linfoma de células do manto, ATCC CRL-3004) são incubadas com PBMC isoladas de doadores aleatórios ou células T CB15 (linhagem de células T padronizada) como células efetoras na presença da proteína IFNg ativável do Exemplo 14 e pelo menos uma protease. Após incubação por 4 h a 37 °C em uma incubadora umidificada, a liberação do corante fluorescente das células-alvo para o sobrenadante é determinada em um espectrofluorímetro. As células-alvo incubadas sem a proteína IFNg ativável do Exemplo 14 e células-alvo totalmente lisadas pela adição de saponina no final da incubação servem como controles negativos e positivos respectivamente.

[00260] Com base nas células-alvo vivas restantes medidas, a porcentagem de lise celular específica é calculada de acordo com a seguinte fórmula: [1-(número de alvos $vivos_{(amostra)}$/número de alvos $vivos_{(espontâneo)}$)] x 100%. As curvas de resposta à dose sigmoidais e os valores de EC_{50} são calculados por regressão não linear/ajuste logístico de 4 parâmetros usando o

software GraphPad. Os valores de lise obtidos para uma determinada concentração de anticorpos são usados para calcular curvas de resposta à dose sigmoidais por análise de ajuste logístico de 4 parâmetros usando o software Prism.

Exemplo 17: Farmacocinética de proteínas IFNg ativáveis

[00261] A proteína IFNg ativável do Exemplo 14 é avaliada quanto à meia-vida de eliminação em estudos com animais.

[00262] A proteína IFNg ativável é administrada em macacos cynomolgus como uma injeção em bolus a 0,5 mg/kg na veia safena. Outro grupo de macacos cynomolgus recebe uma citocina comparável em tamanho, mas sem um elemento de prolongamento da meia-vida sérica. Um terceiro e um quarto grupos recebem uma citocina com elementos de prolongamento da meia-vida sérica e uma citocina com CD20 e elementos de prolongamento da meia-vida sérica respectivamente, e ambos comparáveis em tamanho à proteína IFNg ativável. Cada grupo de teste consiste em 5 macacos. As amostras de soro são colhidas em pontos de tempo indicados, diluídas em série, e a concentração das proteínas é determinada usando um ELISA de ligação a CD20.

[00263] A análise farmacocinética é realizada usando as concentrações plasmáticas do artigo de teste. Os dados de plasma médios do grupo para cada artigo de teste estão em conformidade com um perfil multiexponencial quando plotados em relação ao tempo pós-dosagem. Os dados são ajustados por um modelo de dois compartimentos padrão com entrada de bolus e constantes de taxa de primeira ordem para as fases de distribuição e eliminação. A equação geral para o melhor ajuste dos dados para administração i.v. é: $c(t)=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$, onde c(t) é a concentração plasmática no tempo t, A e B se interceptam no eixo Y, e α e β são as constantes de taxa de primeira ordem aparentes para as fases de distribuição e eliminação respectivamente. A fase α é a fase inicial da depuração e reflete a distribuição da proteína em todo o fluido extracelular do animal, enquanto a segunda porção ou porção da fase β da curva de decaimento representa a depuração plasmática verdadeira. Os métodos para ajustar tais

equações são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, A=D/V(α−k21)/(α−β), B=D/V(β−k21)/(α−β), e α e β (para α>β) são raízes da equação quadrática: r^2+(k12+k21+k10)r+k21k10=0 usando parâmetros estimados de V=volume de distribuição, k10=taxa de eliminação, k12=taxa de transferência do compartimento 1 para o compartimento 2 e k21=taxa de transferência do compartimento 2 para o compartimento 1 e D=dose administrada.

[00264] Análise de dados: Gráficos de concentração versus perfis de tempo são feitos usando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Os valores relatados como menos do que relatáveis (LTR) não são incluídos na análise de PK e não são representados graficamente. Os parâmetros farmacocinéticos são determinados por análise compartimental usando o software WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. (Mountain View, Calif). Os parâmetros farmacocinéticos são calculados conforme descrito em Ritschel W A e Kearns G L, 1999, IN: *Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications,* 5ª edição, American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC

[00265] Espera-se que a proteína IFNg ativável do Exemplo 14 tenha parâmetros farmacocinéticos aprimorados, como um aumento na meia-vida de eliminação em comparação com proteínas sem um elemento de extensão da meia-vida sérica.

Exemplo 18: Modelo de Tumor de Xenoenxerto

[00266] A proteína IFNg ativável do Exemplo 14 é avaliada em um modelo de xenoenxerto.

[00267] Camundongos NOD/scid imunodeficientes fêmeas são irradiados subletalmente (2 Gy) e inoculados por via subcutânea com $4x10^6$ células Ramos RA1 no flanco dorsal direito. Quando os tumores atingem 100 a 200 mm^3, os animais são alocados em 3 grupos de tratamento. Os grupos 2 e 3 (8 animais cada) são injetados por via intraperitoneal com $1,5x10^7$ células T humanas ativadas. Três dias depois, os animais do Grupo 3 são

subsequentemente tratados com um total de 9 doses intravenosas de 50 µg de proteína IFNg ativável do Exemplo 14 (qdx9d). Os grupos 1 e 2 são tratados apenas com veículo. O peso corporal e o volume tumoral são determinados durante 30 dias.

[00268] Espera-se que os animais tratados com a proteína IFNg ativável do Exemplo 5 tenham um atraso estatisticamente significativo no crescimento tumoral em comparação com o respectivo grupo de controle tratado com veículo.

[00269] Embora as modalidades preferíveis da presente invenção tenham sido mostradas e descritas neste documento, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas somente a título de exemplo. Diversas variações, alterações e substituições ocorrerão agora àqueles versados na técnica, sem que haja afastamento da invenção. Deve-se entender que diversas alternativas às modalidades da invenção descritas neste documento podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as seguintes reivindicações definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam abrangidos.

Exemplo 19: Ensaio HEK Blue

[00270] Células HEK-Blue IL12 (InvivoGen) foram semeadas em suspensão a uma concentração de 250.000 células/poço em meios de cultura com ou sem 40 mg/ml de albumina sérica humana (HSA) e estimuladas com uma série de diluições de hIL12 recombinante, IL12 quimérica (p35 de camundongo/p40 humano) ou hIL12 ativável por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2. A atividade de hIL12 ativável não clivada e clivada foi testada. A hIL12 indutível clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. A atividade da IL12 foi avaliada pela quantificação da atividade da Fosfatase Alcalina Secretada (SEAP) usando o reagente QUANTI-Blue (InvivoGen), um ensaio com base colorimétrica. Os resultados são mostrados nas **Figs. 11, 12, 15 e 26**.

[00271] Células HEK-Blue IL2 (InvivoGen) foram semeadas em

suspensão a uma concentração de 50.000 células/poço em meios de cultura com ou sem 15-40 mg/ml de albumina sérica humana (HSA) e estimuladas com uma série de diluições de hIL2 recombinante ou hIL2 ativável por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2. A atividade de hIL2 ativável não clivada e clivada foi testada. A hIL2 indutível clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. A atividade da IL12 foi avaliada pela quantificação da atividade da Fosfatase Alcalina Secretada (SEAP) usando o reagente QUANTI-Blue (InvivoGen), um ensaio com base colorimétrica. Os resultados são mostrados na **FIG. 24a-24d**.

Exemplo 20: Ensaio de blastos T de esplenócitos

[00272] Blastos T foram induzidos a partir de esplenócitos murinos com uma incubação de 6 dias com PHA e uma incubação de 24 horas com hIL12 recombinante. Os blastos T foram então semeados em suspensão a uma concentração de 200.000 células/poço em meios de cultura com ou sem albumina sérica humana (HSA) a 40 mg/ml e estimulados com uma série de diluições de hIL12 recombinante ou IL12 quimérica (p35 de camundongo/p40 humano) ou IL12 de camundongo por 72 horas a 37°C e 5% de CO_2. A atividade de IL12 não clivada e clivada foi testada. A hIL12 indutível clivada foi gerada por incubação com MMP9 ativa. A atividade de IL12 foi avaliada por quantificação a jusante da produção de IFNγ usando um mIFNγ alphaLISA.

Exemplo 21: Liberação *In Vivo* de uma Proteína de Fusão Ativada por Protease Resulta em Redução no Crescimento Tumoral

[00273] O polipeptídeo quimérico é examinado para determinar se poderia ter efeitos biológicos *in vivo*. Para esses experimentos, um sistema é usado no qual as células tumorais injetadas de forma intraperitoneal rápida e preferencialmente fixam-se e crescem inicialmente nas manchas leitosas, uma série de agregados imunes organizados encontrados no omento (Gerber et al., Am. J. Pathol. 169:1739-52 (2006)). Este sistema oferece uma maneira conveniente de examinar os efeitos do tratamento com proteína de fusão no crescimento tumoral, uma vez que as proteínas de fusão podem ser liberadas

por via intraperitoneal várias vezes, e o crescimento tumoral pode ser analisado examinando as células omentais dissociadas. Para esses experimentos, a linhagem celular Colon 38, uma linhagem celular de tumor de crescimento rápido que expressa tanto MMP2 quanto MMP9 *in vitro*, pode ser usada. O tecido omental normalmente expressa uma quantidade relativamente pequena de MMP2 e MMP9, mas, quando o tumor da Colon 38 está presente no omento, os níveis de MMP aumentam. Usando este modelo de tumor, a capacidade das proteínas de fusão de muteína de IL-2 para afetar o crescimento tumoral é examinada. As células da Colon 38 são injetadas por via intraperitoneal, permite-se que se fixem e cresçam por 1 dia e, em seguida, são tratadas diariamente com proteína de fusão por via interaperitoneal. No dia 7, os animais são sacrificados e o omento é examinado quanto ao crescimento tumoral usando citometria de fluxo e por um ensaio de formação de colônia.

Exemplo 22: Construção de uma Proteína de Interleucina Ativável Direcionada a CD20 Exemplificativa

Geração de um domínio de interleucina ativável

[00274] A sequência canônica da cadeia de IL-12p35 humana é a de Nº de Acesso Uniprot P29459. A sequência canônica da cadeia IL-12p40 humana é a de Nº de Acesso Uniprot P29460. IL-12p35 e IL-12p40 são clonadas em um construto de expressão. Um sítio de clivagem de protease é incluído entre os domínios de IL-12p35 e IL-12p40. Um polipeptídeo de IL-12 capaz de se ligar a um polipeptídeo de CD20 presente em um tumor ou em uma célula tumoral é produzido como segue. É produzido um ácido nucleico que contém sequências de ácidos nucleicos: (1) codificando-se uma sequência polipeptídica de IFNg e (2) um ou mais peptídeos de ligação polipeptídicos. Os construtos de plasmídeo de interleucina ativável podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais e são eletroporados para HEK293 ou outras linhagens celulares humanas ou de mamíferos adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem ensaios de ativação de células T que usam células T responsivas à estimulação de IL-12 na presença de uma protease.

Geração de um domínio de ligação scFv CD20

[00275] A CD20 é uma das proteínas de superfície celular presentes nos linfócitos B. O antígeno CD20 é encontrado em linfócitos pré-B e B maduros normais e malignos, incluindo aqueles em mais de 90% dos linfomas não-Hodgkin (LNH) de células B. O antígeno está ausente nas células-tronco hematopoiéticas, nos linfócitos B ativados (células plasmáticas) e no tecido normal. Dessa forma, vários anticorpos principalmente de origem murina foram descritos: 1F5, 2B8/C2B8, 2H7 e 1H4.

[00276] Os anticorpos anti-CD20 humanos ou humanizados são, portanto, usados para gerar sequências de scFv para domínios de ligação a CD20 de uma proteína de interleucina ativável. Sequências de DNA que codificam domínios VL e VH humanos ou humanizados são obtidas, e os códons para os construtos são, opcionalmente, otimizados para expressão em células de Homo sapiens. A ordem em que os domínios VL e VH aparecem no scFv é variada (ou seja, orientação VL-VH ou VH-VL), e três cópias de "G4S" (SEQ ID NO.: 201) ou “G_4S” (SEQ ID NO.: 201) subunidade $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO.: 204) conectam os domínios variáveis para criar o domínio de scFv. Os construtos de plasmídeos de scFv anti-CD20 podem ter Flag, His ou outras tags de afinidade opcionais, e são eletroporados para HEK293 ou outras linhagens celulares de humano ou de mamífero adequadas e purificadas. Os ensaios de validação incluem análise de ligação por FACS, análise cinética usando Proteon e coloração de células que expressam CD20.

Clonagem de construtos de expressão de DNA que codificam a proteína interleucina ativável

[00277] O construto de interleucina ativável com domínios de sítio de clivagem de protease é usado para construir uma proteína interleucina ativável em combinação com um domínio de scFv anti-CD20 e um elemento de extensão da meia-vida sérica (por exemplo, um peptídeo de ligação de HSA ou domínio VH). Para a expressão de uma proteína interleucina ativável em células CHO, as sequências de codificação de todos os domínios de proteína são clonadas

em um sistema de vetor de expressão de mamífero. Em resumo, as sequências genéticas que codificam o domínio de interleucina ativável, o elemento de extensão da meia-vida sérica e o domínio de ligação de CD20 juntamente com os ligantes peptídicos L1 e L2 são sintetizadas e subclonadas separadamente. Os construtos resultantes são então ligados entre si na ordem do domínio de ligação de CD20 – L1 – IL-12p35– L2 – domínio de clivagem de protease – L3 – IL-12p40 – L4 – scFv anti-CD20 – L5 – elemento de extensão da meia-vida sérica para produzir um construto final. Todos os construtos de expressão são projetados para conter sequências de codificação para um peptídeo sinal N-terminal e uma (6xHis)-tag de hexa-histidina C-terminal (SEQ ID NO.: 205) para facilitar a secreção e purificação de proteínas, respectivamente.

Expressão de proteínas interleucina ativáveis em células CHO transfectadas de forma estável

[00278] Um sistema de expressão de células CHO (Flp-In®, Life Technologies), um derivado de células de ovário de Hamster Chinês CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao e Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968;60(4):1275-81), é usado. As células aderentes são subcultivadas de acordo com os protocolos de cultura celular padrão fornecidos pela Life Technologies.

[00279] Para adaptação ao crescimento em suspensão, as células são separadas dos frascos de cultura de tecidos e colocadas em meio sem soro. As células adaptadas à suspensão são criopreservadas em meio com 10% de DMSO.

[00280] As linhagens celulares de CHO recombinantes que expressam, de forma estável, proteínas interleucina ativáveis secretadas são geradas por transfecção de células adaptadas a suspensão. Durante a seleção com o antibiótico Higromicina B, as densidades celulares viáveis são medidas duas vezes por semana, e as células são centrifugadas e ressuspensas em meio de seleção fresco a uma densidade máxima de $0,1x10^6$ células viáveis/mL. Agrupamentos de células que expressam, de forma estável, proteínas interleucina ativáveis são recuperados após 2-3 semanas de seleção, ponto em

que as células são transferidas para o meio de cultura padrão em frascos de agitação. A expressão de proteínas secretadas recombinantes é confirmada pela realização de eletroforese em gel de proteínas ou citometria de fluxo. Os agrupamentos de células estáveis são criopreservados em meio contendo DMSO.

[00281] As proteínas interleucina ativáveis são produzidas em culturas descontínuas alimentadas de 10 dias de linhagens celulares de CHO transfectadas de forma estável por secreção no sobrenadante da cultura celular. Os sobrenadantes da cultura celular são colhidos após 10 dias em viabilidades de cultura de, tipicamente, >75%. Amostras são coletadas das culturas de produção em dias alternados, e a densidade celular e a viabilidade são avaliadas. No dia da coleta, os sobrenadantes da cultura celular são limpos por centrifugação e filtração a vácuo antes de serem usados.

[00282] Os títulos de expressão de proteína e a integridade do produto em sobrenadantes de cultura celular são analisados por SDS-PAGE.

Purificação de proteínas interleucina ativáveis

[00283] Proteínas interleucina ativáveis são purificadas a partir de sobrenadantes de cultura celular de CHO em um procedimento de duas etapas. Os construtos são submetidos a cromatografia de afinidade em uma primeira etapa, seguido por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) preparativa em Superdex 200 em uma segunda etapa. As amostras são trocadas por tampão e concentradas por ultrafiltração a uma concentração típica de >1 mg/mL. A pureza e a homogeneidade (tipicamente >90%) das amostras finais são avaliadas por SDS PAGE sob condições redutoras e não redutoras, o que é seguido por imunoblot usando um anticorpo anti-HSA ou anti-idiotipo, bem como por SEC analítica, respectivamente. As proteínas purificadas são armazenadas em alíquotas a -80°C até o uso.

Exemplo 23: Determinação da afinidade do antígeno por citometria de fluxo

[00284] As proteínas interleucina ativáveis do Exemplo 22 são testadas

quanto às suas afinidades de ligação a células $CD20^+$ humanas e células $CD20^+$ de cynomolgus.

[00285] As células $CD20^+$ são incubadas com 100 µL de diluições em série das proteínas interleucina ativáveis do Exemplo 22 e pelo menos uma protease. Após três lavagens com tampão FACS, as células são incubadas com 0,1 mL de anticorpo anti-idiotipo monoclonal de camundongo a 10 µg/mL no mesmo tampão durante 45 min em gelo. Após um segundo ciclo de lavagem, as células são incubadas com 0,1 mL de anticorpos IgG anti-camundongo de cabra conjugados com FITC a 15 µg/mL nas mesmas condições anteriores. Como um controle, as células são incubadas com a IgG anti-His seguida pelos anticorpos IgG de cabra anti-camundongo conjugados com FITC sem as proteínas interleucina ativáveis. As células foram então lavadas novamente e ressuspensas em 0,2 mL de tampão FACS contendo 2 µg/mL de iodeto de propídio (PI) para excluir células mortas. A fluorescência de $1x10^4$ células vivas é medida usando um citômetro de fluxo Beckman-Coulter FC500 MPL usando o software MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemanha) ou um citômetro de fluxo Millipore Guava EasyCyte usando o software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemanha). As intensidades de fluorescência médias das amostras de células são calculadas usando software CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemanha) ou software Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Alemanha). Depois de retirar os valores de intensidade de fluorescência das células coradas apenas com os reagentes secundários e terciários, os valores são então usados para o cálculo dos valores K_D com a equação para ligação de um sítio (hipérbole) do GraphPad Prism (versão 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia EUA).

[00286] A ligação e a reatividade cruzada de CD20 são avaliadas nas linhagens celulares tumorais $CD20^+$ humanas. A razão K_D de reatividade cruzada é calculada usando os valores K_D determinados nas linhagens celulares de CHO que expressam antígenos de cynomolgus recombinantes ou antígenos de humanos recombinantes.

Exemplo 24: Ensaio de Citotoxicidade

[00287] A proteína interleucina ativável do Exemplo 22 é avaliada *in vitro* na sua mediação da resposta imune a células-alvo $CD20^+$.

[00288] As células $CD20^+$ REC-1 marcadas com fluorescência (uma linhagem celular de linfoma de células do manto, ATCC CRL-3004) são incubadas com PBMC isoladas de doadores aleatórios ou células T CB15 (linhagem de células T padronizada) como células efetoras na presença da proteína interleucina ativável do Exemplo 22 e pelo menos uma protease. Após incubação por 4 h a 37 °C em uma incubadora umidificada, a liberação do corante fluorescente das células-alvo para o sobrenadante é determinada em um espectrofluorímetro. As células-alvo incubadas sem a proteína interleucina ativável do Exemplo 22 e células-alvo totalmente lisadas pela adição de saponina no final da incubação servem como controles negativos e positivos respectivamente.

[00289] Com base nas células-alvo vivas restantes medidas, a porcentagem de lise celular específica é calculada de acordo com a seguinte fórmula: [1-(número de alvos $vivos_{(amostra)}$/número de alvos $vivos_{(espontâneo)}$)] x 100%. As curvas de resposta à dose sigmoidais e os valores de EC_{50} são calculados por regressão não linear/ajuste logístico de 4 parâmetros usando o software GraphPad. Os valores de lise obtidos para uma determinada concentração de anticorpos são usados para calcular curvas de resposta à dose sigmoidais por análise de ajuste logístico de 4 parâmetros usando o software Prism.

Exemplo 25: Farmacocinética de Proteínas interleucina ativáveis

[00290] A proteína interleucina ativável do Exemplo 22 é avaliada quanto à meia-vida de eliminação em estudos com animais.

[00291] A proteína interleucina ativável é administrada em macacos cynomolgus como uma injeção em bolus a 0,5 mg/kg na veia safena. Outro grupo de macacos cynomolgus recebe uma citocina comparável em tamanho, mas sem um elemento de prolongamento da meia-vida sérica. Um terceiro e um

quarto grupos recebem uma citocina com elementos de extensão da meia-vida sérica e uma citocina com CD20 e elementos de extensão da meia-vida sérica respectivamente, e ambos comparáveis em tamanho à proteína interleucina ativável. Cada grupo de teste consiste em 5 macacos. As amostras de soro são colhidas em pontos de tempo indicados, diluídas em série, e a concentração das proteínas é determinada usando um ELISA de ligação a CD20.

[00292] A análise farmacocinética é realizada usando as concentrações plasmáticas do artigo de teste. Os dados de plasma médios do grupo para cada artigo de teste estão em conformidade com um perfil multiexponencial quando plotados em relação ao tempo pós-dosagem. Os dados são ajustados por um modelo de dois compartimentos padrão com entrada de bolus e constantes de taxa de primeira ordem para as fases de distribuição e eliminação. A equação geral para o melhor ajuste dos dados para administração i.v. é: $c(t)=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$, onde c(t) é a concentração plasmática no tempo t, A e B se interceptam no eixo Y, e α e β são as constantes de taxa de primeira ordem aparentes para as fases de distribuição e eliminação respectivamente. A fase α é a fase inicial da depuração e reflete a distribuição da proteína em todo o fluido extracelular do animal, enquanto a segunda porção ou porção da fase β da curva de decaimento representa a depuração plasmática verdadeira. Os métodos para ajustar tais equações são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, $A=D/V(\alpha-k21)/(\alpha-\beta)$, $B=D/V(\beta-k21)/(\alpha-\beta)$, e α e β (para $\alpha>\beta$) são raízes da equação quadrática: $r^2+(k12+k21+k10)r+k21k10=0$ usando parâmetros estimados de V=volume de distribuição, k10=taxa de eliminação, k12=taxa de transferência do compartimento 1 para o compartimento 2 e k21=taxa de transferência do compartimento 2 para o compartimento 1 e D=dose administrada.

[00293] Análise de dados: Gráficos de concentração versus perfis de tempo são feitos usando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Os valores relatados como menos do que relatáveis (LTR) não são incluídos na análise de PK e não são representados graficamente. Os parâmetros farmacocinéticos são determinados por análise

compartimental usando o software WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. (Mountain View, Calif). Os parâmetros farmacocinéticos são calculados conforme descrito em Ritschel W A e Kearns G L, 1999, IN: *Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications,* 5ª edição, American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC

[00294] Espera-se que a proteína interleucina ativável do Exemplo 22 tenha parâmetros farmacocinéticos aprimorados, como um aumento na meia-vida de eliminação em comparação com proteínas sem um elemento de extensão da meia-vida sérica.

Exemplo 26: Modelo de Tumor de Xenoenxerto

[00295] A proteína interleucina ativável do Exemplo 22 é avaliada em um modelo de xenoenxerto.

[00296] Camundongos NOD/scid imunodeficientes fêmeas são irradiados subletalmente (2 Gy) e inoculados por via subcutânea com $4x10^6$ células Ramos RA1 no flanco dorsal direito. Quando os tumores atingem 100 a 200 mm^3, os animais são alocados em 3 grupos de tratamento. Os grupos 2 e 3 (8 animais cada) são injetados por via intraperitoneal com $1,5x10^7$ células T humanas ativadas. Três dias depois, os animais do Grupo 3 são subsequentemente tratados com um total de 9 doses intravenosas de 50 µg de proteína interleucina ativável do Exemplo 5 (qdx9d). Os grupos 1 e 2 são tratados apenas com veículo. O peso corporal e o volume tumoral são determinados durante 30 dias.

[00297] Espera-se que os animais tratados com a proteína interleucina ativável do Exemplo 22 tenham um atraso estatisticamente significativo no crescimento tumoral em comparação com o respectivo grupo de controle tratado com veículo.

[00298] Embora as modalidades preferíveis da presente invenção tenham sido mostradas e descritas neste documento, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas somente a título de

exemplo. Diversas variações, alterações e substituições ocorrerão agora àqueles versados na técnica, sem que haja afastamento da invenção. Deve-se entender que diversas alternativas às modalidades da invenção descritas neste documento podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as seguintes reivindicações definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam abrangidos.

Exemplo 27: Experimentos de MC38

A linhagem celular MC38, uma linhagem celular de adenocarcinoma do cólon de crescimento rápido que expressa MMP9 *in vitro*, foi usada. Usando este modelo de tumor, a capacidade das proteínas de fusão para afetar o crescimento tumoral foi examinada.

Exemplo 27a: MC38 IL-2POC

Agentes e Tratamento:

Gr.	N	Agente	Dose de formulação	Via	Cronograma
1[#]	10	Veículo	-	ip	bissemanalmente x 3
2	7	ACP16	700µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
3	7	ACP16	230µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
4	7	ACP16	70µg/animal	ip	bissemanalmente x 3

[#] - Grupo de Controle

Exemplo 27b: MC38 IL-2

Agentes e Tratamento:

Gr.	N	Agente	Dose de formulação	Via	Cronograma
1[#]	12	Veículo	-	ip	bissemanal x 2
2	8	ACP16	4,4 µg/animal	ip	bissemanal x 2
3	8	ACP16	17 µg/animal	ip	bissemanal x 2
4	8	ACP16	70 µg/animal	ip	bissemanal x 2
5	8	ACP16	232 µg/animal	ip	bissemanal x 2
6	8	ACP130	19 µg/animal	ip	bissemanal x 2
7	8	ACP130	45 µg/animal	ip	bissemanal x 2
8	8	ACP130	180 µg/animal	ip	bissemanal x 2
9	8	ACP130	600 µg/animal	ip	bissemanal x 1
12	8	ACP124	17 µg/animal	ip	bissemanal x 2
13	8	ACP124	70 µg/animal	ip	bissemanal x 2
14	8	ACP124	230 µg/animal	ip	bissemanal x 2
15	8	ACP124	700 µg/animal	ip	bissemanal x 2
16	8	IL-2-WTI	12 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
17	8	IL-2-WTI	36 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias

- Grupo de Controle

Procedimentos:

Camundongos foram anestesiados com isoflurano para o implante de

células para reduzir as ulcerações. 308 camundongos C57BL/6 fêmeas CR foram preparados com $5x10^5$ células tumorais MC38 em 0% de Matrigel sc no flanco. O Volume de Injeção Celular foi de 0,1 mL/camundongo. A idade do camundongo na data de início era de 8 a 12 semanas. As correspondências de pares foram realizadas quando os tumores atingiram um tamanho médio de 100 - 150 mm^3 e o tratamento iniciou. Os pesos corporais foram medidos no início e depois bissemanalmente até ao fim. As medições do calibrador foram feitas bissemanalmente até o fim. Quaisquer reações adversas foram notificadas imediatamente. Qualquer animal individual com uma única observação de >30% de perda de peso corporal ou três medições consecutivas de >25% de perda de peso corporal foi sacrificado. Qualquer grupo com uma perda de peso corporal média de >20% ou >10% de mortalidade interrompeu a dosagem; o grupo não foi sacrificado, e a recuperação é permitida. Dentro de um grupo com >20% de perda de peso, os indivíduos que atingiram o critério de avaliação de perda de peso corporal individual foram sacrificados. Se a perda de peso corporal relacionada a tratamento de grupo é recuperada até dentro de 10% dos pesos originais, a dosagem pode retomar a uma dose inferior ou a um cronograma de dosagem menos frequente. Exceções ao não-tratamento de recuperação da % de peso corporal podem ser permitidas analisando-se caso-a-caso. O ponto final foi a desaceleração do crescimento tumoral (TGD). Os animais foram monitorados individualmente. O critério de avaliação do experimento foi um volume tumoral de 1500 mm^3 ou 45 dias, o que ocorrer primeiro. Os respondedores foram acompanhados por mais tempo. Quando o critério de avaliação foi atingido, os animais tiveram que ser sacrificados.

-

Os resultados são mostrados nas Fig. 31a-c e Fig. 32a-c. As curvas de sobrevivência são mostradas na Fig 34a-d.

Exemplo 27c: MC38 IFNa e IL-12

Agentes e Tratamento:

Gr.	N	Agente	Dose de formulação	Via	Cronograma
1[#]	12	Veículo	-	ip	bissemanalmente x 3
2	8	ACP11	17,5 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
3	8	ACP11	175 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
4	8	ACP11	525 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
5	8	ACP31	33 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
6	8	ACP31	110 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
7	8	ACP31	330 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
8	8	ACP131	1 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
9	8	ACP131	10 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
10	8	ACP131	30 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
11	8	mIFNa1-WTI	1 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
12	8	mIFNa1-WTI	10 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas

					vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
13	8	IL-12-HM-WTI	2 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
14	8	IL-12-HM-WTI	10 µg/animal	ip	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias
15	8	ACP131	5 µg/animal	itu	duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias

- Grupo de Controle

Procedimentos:

Camundongos foram anestesiados com isoflurano para o implante de células para reduzir as ulcerações. 308 camundongos C57BL/6 fêmeas CR foram preparados com $5x10^5$ células tumorais MC38 em 0% de Matrigel sc no flanco. O Volume de Injeção Celular foi de 0,1 mL/camundongo. A idade do camundongo na data de início era de 8 a 12 semanas. As correspondências de pares foram realizadas quando os tumores atingiram um tamanho médio de 100 - 150 mm^3 e o tratamento iniciou. Os pesos corporais foram medidos no início e depois bissemanalmente até ao fim. As medições do calibrador foram feitas bissemanalmente até o fim. Quaisquer reações adversas foram notificadas imediatamente. Qualquer animal individual com uma única observação de >30% de perda de peso corporal ou três medições consecutivas de >25% de perda de

peso corporal foi sacrificado. Qualquer grupo com uma perda de peso corporal média de >20% ou >10% de mortalidade interrompeu a dosagem; o grupo não foi sacrificado, e a recuperação é permitida. Dentro de um grupo com >20% de perda de peso, os indivíduos que atingiram o critério de avaliação de perda de peso corporal individual foram sacrificados. Se a perda de peso corporal relacionada a tratamento de grupo é recuperada até dentro de 10% dos pesos originais, a dosagem pode retomar a uma dose inferior ou a um cronograma de dosagem menos frequente. Exceções ao não-tratamento de recuperação da % de peso corporal podem ser permitidas analisando-se caso-a-caso. O ponto final foi a desaceleração do crescimento tumoral (TGD). Os animais foram monitorados individualmente. O critério de avaliação do experimento foi um volume tumoral de 1500 mm^3 ou 45 dias, o que ocorrer primeiro. Os respondedores foram acompanhados por mais tempo. Quando o critério de avaliação foi atingido, os animais tiveram que ser sacrificados. Os resultados são mostrados nas Figs. 29b, 29c e 30.

Exemplo 27d: Tratamento com ACP16, ACP132 e ACP21

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano para implante de células para reduzir as ulcerações. Camundongos CR C57BL/6 fêmeas foram preparados com $5x10^5$ células tumorais MC38 em 0% de Matrigel sc no flanco. O Volume de Injeção Celular foi de 0,1 mL/camundongo. A idade do camundongo na data de início era de 8 a 12 semanas. As combinações de pares foram realizadas quando os tumores atingiram um tamanho médio de 100 - 150 mm^3 e começaram o tratamento. A ACP16 foi administrada com 17, 55, 70 ou 230 µg/animal; ACP132 foi administrada a 9, 28, 36 ou 119 µg/animal; ACP21 foi administrada a 13, 42, 54 ou 177 µg/animal. Os pesos corporais foram medidos no início e depois bissemanalmente até o fim. As medições do calibrador foram feitas bissemanalmente até o fim. Quaisquer reações adversas foram notificadas imediatamente. Qualquer animal individual com uma única observação de >30% de perda de peso corporal ou três medições consecutivas

de >25% de perda de peso corporal foi sacrificado. Qualquer grupo com uma perda de peso corporal média de >20% ou >10% de mortalidade interrompeu a dosagem; o grupo não foi sacrificado, e a recuperação é permitida. Dentro de um grupo com >20% de perda de peso, os indivíduos que atingiram o critério de avaliação de perda de peso corporal individual foram sacrificados. Se a perda de peso corporal relacionada a tratamento de grupo é recuperada até dentro de 10% dos pesos originais, a dosagem pode retomar a uma dose inferior ou a um cronograma de dosagem menos frequente. Exceções ao não-tratamento de recuperação da % de peso corporal podem ser permitidas analisando-se caso-a-caso. O ponto final foi a desaceleração do crescimento tumoral (TGD). Os animais foram monitorados individualmente. O critério de avaliação do experimento foi um volume tumoral de 1500 mm^3 ou 45 dias, o que ocorrer primeiro. Os respondedores foram acompanhados por mais tempo. Quando o critério de avaliação foi atingido, os animais tiveram que ser sacrificados. Os resultados são mostrados na Fig 35.

Exemplo 27e: Reexposição a MC38

Camundongos curados (tratados com ACP16) do Exemplo 27b foram reexpostos com implantação de tumor para determinar se a memória anti-tumor foi estabelecida a partir dos tratamentos iniciais.

Agentes e Tratamento:

Gr.	N	Agente	Dose de formulação	Via	Cronograma
1#	33	Sem Tratamento	-	-	-
2	7	ACP16	70 µg/animal	ip	(ACP16 bissemanalmente x 2)
3	8	ACP16	232 µg/animal	ip	(ACP16 bissemanalmente x 2)
5	5	IL-2-WTI	12 µg/animal	ip	(IL-2WTI duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois

					duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias)
6	7	IL-2-WTI	36 µg/animal	ip	(IL-2WTI duas vezes ao dia x 5, depois pausa de 2 dias, depois duas vezes ao dia x 5 e depois pausa de 2 dias)

- Grupo de Controle

Procedimentos:

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano para implante de células para reduzir as ulcerações. Esta parte do estudo começou no dia do implante (Dia 1). O Grupo 1 consistiu em 33 camundongos C57BL/6 fêmeas CR com $5x10^5$ células tumorais MC38 em 0% de Matrigel por via subcutânea no flanco. Os grupos 2-6 consistiram em 33 camundongos C57BL/6 fêmeas CR preparados com $5x10^5$ células tumorais MC38 em 0% de Matrigel 0% sc no flanco esquerdo. Os tumores do experimento com MC38 anterior (Exemplo 27b) foram implantados no flanco direito de cada animal. O Volume de Injeção Velular foi de 0,1 mL/camundongo. A idade dos camundongos de controle no início era de 14 a 17 semanas. Estes camundongos foram pareados por idade com os camundongos do experimento com MC38 anterior (Exemplo 27b). Nenhuma dosagem de agente ativo ocorreu durante a reexposição. Pesos corporais foram avaliados bissemanalmente até o final, assim como as medições do calibrador. Quaisquer reações adversas ou morte foram relatadas imediatamente. Qualquer animal individual com uma única observação de >30% de perda de peso corporal ou três medições consecutivas de >25% de perda de peso corporal foi sacrificado. O ponto final foi a desaceleração do crescimento tumoral (TGD). Os animais foram monitorados individualmente. O critério de avaliação do experimento foi um volume tumoral de 1000 mm^3 ou 45 dias, o que ocorrer

primeiro. Os respondedores foram acompanhados por mais tempo, quando possível. Quando o critério de avaliação foi atingido, os animais tiveram que ser sacrificados. Os resultados são mostrados na Fig. 33

Exemplo 28.Proteínas de Fusão Condicionalmente Ativas Que Contêm Uma Fração Bloqueadora Que É Um Domínio de Ligação à Albumina Sérica

[00299] Este exemplo descreve a produção e a atividade de proteínas de fusão, de preferência citocinas, que possuem atividade induzível, ou seja, são inativas até serem induzidas, tipicamente por separação de uma fração de bloqueio da fração ativa após a clivagem de um ligante peptídico entre a fração de bloqueio e a fração ativa. As proteínas de fusão contêm um único domínio variável de anticorpo (um dAb) que se liga à albumina sérica por meio das alças de CDR e se liga a uma fração ativa (no caso, uma scFV anti-CD3) por meio de uma ou mais alças não CDR (por exemplo, a alça C). A fração de bloqueio de ligação à albumina sérica está operacionalmente ligada à fração ativa através de um ligante peptídico clivável por protease, e a fração ativa está operacionalmente ligada a um domínio de direcionamento (no caso, um dAb de receptor de fator de crescimento anti-epidérmico (EGFR) ou dAb anti-antígeno da membrana específica da próstata (PSMA)) através de um ligante peptídico que não é clivável por protease. Estas proteínas de fusão podem ser administradas como proteínas inativas que se são ativadas após a clivagem do ligante peptídico clivável por protease e subsequente liberação do domínio inibitório de ligação à albumina. A scFV anti-CD3 nas proteínas de fusão é um substituto para uma citocina desejada nas proteínas de fusão descritas nesta divulgação. Proteínas de fusão semelhantes que contêm uma citocina desejada (por exemplo, IL-2, IL-12, um interferon) ou fragmento funcional ou muteína desta, um domínio de direcionamento e um dAb de ligação à albumina que também se liga e inibe a citocina ou fragmento funcional ou muteína desta podem ser preparados usando os métodos descritos e exemplificados neste documento. O dAb anti-albumina sérica que se liga e inibe a atividade de uma citocina

desejada ou fragmento funcional ou muteína desta pode fornecer mascaramento estérico da citocina (através da proximidade das citocinas à albumina sérica ligada) e mascaramento específico da citocina (através de ligação à citocina através do alça não CDR (por exemplo, o alça C)). O dAb anti-albumina sérica que se liga e inibe a atividade de uma citocina desejada ou fragmento funcional ou muteína desta pode ser obtida usando métodos adequados, tais como introdução de diversidade de sequência de aminoácidos nas alças não CDR (por exemplo, alça C) de um dAb de ligação anti-albumina sérica e triagem para ligação à citocina desejada. Quaisquer métodos adequados podem ser usados para a seleção, tais como exibição de fago. Por exemplo, um dab anti-albumina sérica exemplificativo que pode ser usado tem a sequência seguinte, e a sequência de aminoácidos na alça C (Sublinhada em Negrito) pode ser diversificada (por exemplo, randomizada), e os dAbs resultantes triados para ligação à albumina sérica via interação com CDR e à citocina via interação com alça não CDR. Se desejado, a sequência de aminoácidos de um peptídeo de ligação a citocina conhecido pode ser enxertada na alça C.

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ**GGGGGLDGNEEPGG**LEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO.: 194)

A. A ativação da protease de ProTriTAC leva a um aumento significativo da atividade *in vitro*

[00300] ProTriTAC purificado (pró-fármaco), ProTriTAC não clivável [pró-fármaco (não clivável)] e fragmento de fármaco ativo recombinante que imita o ProTriTAC ativado por protease (fármaco ativo) foram testados quanto à ligação a CD3 humano recombinante em um ensaio ELISA, ligação a células T primárias humanas purificadas em um ensaio de citometria de fluxo e potência funcional em um ensaio de citotoxicidade celular dependente de células T.

[00301] Para ELISA, proteínas ProTriTAC solúveis nas concentrações indicadas foram incubadas com CD3e humano recombinante imobilizado (R&D Systems) por 1 h em temperatura ambiente em PBS suplementado com 15

mg/ml de albumina sérica humana. As placas foram bloqueadas usando SuperBlock (Thermo Fisher), lavadas usando PBS com 0,05% de Tween-20 e detectadas usando um anticorpo monoclonal idiotipo anti-CD3 não competitivo 11D3 seguido por anticorpo secundário marcado com peroxidase e solução de substrato TMB-ELISA (Thermo Fisher).

[00302] Para citometria de fluxo, proteínas ProTriTAC solúveis nas concentrações indicadas foram incubadas com células T primárias humanas purificadas por 1 h a 4 °C na presença de PBS com 2% de soro fetal bovino e 15 mg/ml de albumina sérica humana. As placas foram lavadas com PBS com 2% de soro fetal bovino, detectadas usando o anticorpo monoclonal idiotipo anti-CD3 não competitivo marcado com AlexaFluor 647 11D3, e os dados foram analisados usando FlowJo 10 (FlowJo, LLC).

[00303] Para a potência funcional em ensaios de citotoxicidade celular dependente de células T, proteínas ProTriTAC solúveis nas concentrações indicadas foram incubadas com células T humanas em repouso purificadas (célula efetora) e com célula cancerígena HCT116 (célula-alvo) a uma razão efetor:célula-alvo de 10:1 durante 48 h a 37 °C. A linhagem da célula-alvo HCT116 foi transfectada de forma estável com um gene repórter de luciferase para permitir a medição de morte celular mediada por célula T específica por ONE-Glo (Promega).

B. ProTriTAC exibe atividade potente, dependente de protease e anti-tumor em um modelo de xenoenxerto de tumor de roedor

[00304] O ProTriTAC foi avaliado quanto à sua atividade antitumoral in vivo em um tumor de xenoenxerto subcutâneo HCT116 misturado com células T humanas expandidas em camundongos NCG imunocomprometidos. Especificamente, 5x106 células HCT116 foram misturadas com 2,5x106 células T expandidas por camundongo no dia 0. As dosagens de ProTriTACs foram realizadas começando no dia seguinte com um cronograma q.d. x 10 via injeção intraperitoneal. As medições do volume tumoral foram determinadas usando medições de calibre e calculadas usando a fórmula V = (comprimento x largura

x largura) / 2 nos tempos indicados.

C. Expressão, purificação e estabilidade de moléculas triespecíficas de ProTriTAC exemplificativas

Produção de Proteínas

[00305] As sequências que codificam moléculas de proteína de fusão induzíveis foram clonadas no vetor de expressão de mamífero pcDNA 3.4 (Invitrogen) precedido por uma sequência líder e seguido por uma tag de Histidina 6x (SEQ ID NO: 205). As células Expi293F (Life Technologies A14527) foram mantidas em suspensão em Optimum Growth Flasks (Thomson) entre 0,2 a 8 x 1e6 células/ml em meios Expi 293. O DNA de plasmídeo purificado foi transfectado em células Expi293 de acordo com os protocolos do Expi293 Expression System Kit (Life Technologies, A14635) e mantido durante 4-6 dias após a transfecção. Alternativamente, as sequências que codificam as moléculas de proteína de fusão foram clonadas no vetor de expressão de mamífero pDEF38 (CMC ICOS), transfectadas em células CHO-DG44 dhfr-, conjuntos estáveis foram gerados e foram cultivadas em meios de produção por até 12 dias antes da purificação. A quantidade de proteínas de fusão exemplificativas em meios condicionados foi quantificada usando um instrumento Octet RED 96 com pontas de Proteína A (ForteBio/Pall) usando uma proteína de fusão de controle para uma curva padrão. O meio condicionado de qualquer uma das células hospedeiras foi filtrado e parcialmente purificado por cromatografia de afinidade e dessalinização. As proteínas de fusão foram subsequentemente polidas por troca iônica e após agrupamento de frações formuladas em um tampão neutro contendo excipientes. A pureza final foi avaliada por SDS-PAGE e SEC analítica usando uma coluna Acquity BEH SEC 200 de 1,7µ 4,6 x 150 mm (Waters Corporation) resolvida em uma fase móvel aquosa/orgânica com excipientes em pH neutro em um sistema 1290 LC e picos integrados com Chemstation Software CDS (Agilent). As proteínas de fusão purificadas de células hospedeiras CHO são mostradas na SDS-PAGE descrita abaixo.

Avaliação de Estabilidade

[00306] As proteínas de fusão purificadas em duas formulações foram subaliquotadas em tubos estéreis e tensionadas por cinco ciclos de congelamento-descongelamento, cada um compreendendo mais de 1 hora a -80 °C e temperatura ambiente ou por incubação a 37 °C durante 1 semana. Amostras tensionadas foram avaliadas quanto à concentração e turbidez por espectrometria de UV usando placas de 96 poços transparentes de UV (Corning 3635) com um software SpectraMax M2 e SoftMaxPro (Molecular Devices), SDS-PAGE e SEC analítica e comparadas com a mesma análise de amostras não tensionadas de controle. Uma sobreposição de cromatogramas de SEC analítica de amostras de controle e tensionadas para uma única molécula de ProTriTAC exemplificativa purificada de células hospedeiras 293 é ilustrada abaixo.

[00307] Os resultados mostram que ProTriTACs foram produzidos com rendimentos comparáveis a TriTACs normais de agrupamentos estáveis de CHO; e que as proteínas eram estáveis após repetidos congelamentos-descongelamentos a 37 ° C durante 1 semana.

D. Demonstração de mascaramento funcional e estabilidade de ProTriTAC in vivo em um estudo farmacocinético de macaco cynomolgus de três semanas

[00308] Dose única de ProTriTAC direcionado a PSMA (SEQ ID C1872), ProTriTAC não clivável (SEQ ID NO .: 187), TriTAC não mascarado/não clivável (SEQ IDNO: 190) e ProTriTAC ativado por protease que mimetiza o fármaco ativa (SEQ IDNO: 188) foi administrada em macacos cynomolgus a 0,1 mg/kg por meio de injeção intravenosa. As amostras de plasma foram coletadas nos pontos de tempo indicados. As concentrações de ProTriTAC foram determinadas usando ensaios de ligação de ligante com PSMA humano recombinante biotinilado (R&D systems) e 11D3 clonado anti-anticorpo idiotipo de CD3 marcado com enxofre em um ensaio MSD (Meso Scale Diagnostic, LLC). Os parâmetros farmacocinéticos foram estimados usando o software de farmacocinética Phoenix WinNonlin usando uma abordagem não

compartimental consistente com a via de administração em bolus intravenosa.

[00309] Para calcular a taxa de conversão do pró-fármaco in vivo, a concentração do fármaco ativo em circulação foi estimada resolvendo o seguinte sistema de equações diferenciais, onde P é a concentração de pró-fármaco, A é a concentração de fármaco ativo, k_a é a taxa de ativação de pró-fármaco na circulação, $k_{c,P}$ é a taxa de depuração do pró-fármaco e $k_{c,A}$ é a taxa de depuração do fármaco ativo.

$$\frac{dP}{dt} = -k_{c,P}P$$

$$\frac{dA}{dt} = k_aP - k_{c,A}A$$

[00310] As taxas de eliminação do pró-fármaco, do fármaco ativo e de um controle de pró-fármaco não clivável ($k_{c,NCLV}$) foram determinadas empiricamente em macacos cynomolgus. Para estimar a taxa de ativação do pró-fármaco em circulação, presumimos que a diferença entre a taxa de depuração do pró-fármaco clivável e do pró-fármaco não clivável surgiu apenas da ativação não específica em circulação. Portanto, a taxa de conversão do pró-fármaco em fármaco ativo em circulação foi estimada subtraindo-se a taxa de depuração do pró-fármaco clivável do pró-fármaco não clivável.

$$k_a = k_{c,NCLV} - k_{c,P}$$

[00311] A concentração inicial do pró-fármaco em circulação foi determinada empiricamente, e a concentração inicial do fármaco ativo foi considerada como sendo zero.

Resultados e Discussão

[00312] Os resultados do Exemplo 28 mostram que proteínas de fusão que contêm um polipeptídeo com atividade terapêutica desejada, como uma citocina ou fragmento funcional ou muteína desta ou scFV anti-CD3 podem ser

preparadas em que a atividade terapêutica é mascarada por um domínio de mascaramento que se liga à albumina sérica e ao polipeptídeo ativo. O domínio de mascaramento está operacionalmente ligado ao domínio ativo por meio de um ligante peptídico clivável por protease. Os resultados mostram que este tipo de proteína de fusão pode ser administrado como uma proteína inativa que se torna ativada após a clivagem da protease no local desejado de atividade terapêutica, tal como em um tumor.

[00313] As sequências de aminoácidos das proteínas de fusão utilizadas no Exemplo 28 são fornecidas como SEQ ID NO: 183-190.

[00314] Os construtos da proteína de fusão de amostra são detalhados na Tabela 3. Na tabela 3, "L" é uma abreviatura de "ligante peptídico" e "lig. cliv." é uma abreviatura de “ligante peptídico clivável”. Outras abreviaturas: “mIFNg” indica interferon gama de camundongo (IFNg); “HAlbumina” indica albumina sérica humana (HSA); “MAlbumina” indica albumina sérica de camundongo.

Tabela 3: TABELA DE PERMUTAÇÃO DE CONSTRUTO

Nome do Construto	**Descrição do Construto**
ACP01	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP02	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP03	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP50	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP51	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP52	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP53	mAlbumina-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina-6xHis

ACP54	mAlbumina-(lig. cliv.)-mIFNg-Peptídeo Ligante-mIFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina-6xHis
ACP30	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP55	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis-C-tag
ACP56	(anti-FOLR1)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP57	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP58	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP59	(anti-FOLR1)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP60	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP61	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-mIFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-FN(CGS-2)-6xHis
ACP63	anti-FN CGS-2 scFv (Vh/Vl)-6xHis
ACP69	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg
ACP70	camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP71	camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina
ACP72	mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg
ACP73	mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina

ACP74	mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-5mer ligante peptídico-mAlbumina-5mer ligante peptídico-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina
ACP75	mAlbumina-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-10mer ligante peptídico-mAlbumina-10mer ligante peptídico-(lig. cliv.)-camundongo IFNg-(lig. cliv.)-mAlbumina
ACP78	(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-camundongo_IFNg-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-camundongo_IFNg-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)_(controle_não-clivável)
ACP134	Anti-HSA-(lig. cliv.)-camundongo-(lig. cliv.)-anti-HSA-(lig. cliv.)-camundongo_IFNg-(lig. cliv.)-anti-HSA-L-anti-FOLR1
ACP135	Anti-FOLR1-L-HSA-(lig. cliv.)-camundongo-(lig. cliv.)-HSA-(lig. cliv.)-camundongo_IFNg-(lig. cliv.)-HSA
ACP04	humano p40-murino p35-6xHis
ACP05	humano p40-humano p35-6xHis
ACP34	camundongo p35- (lig. cliv.)-camundongo p40-6xHis
ACP35	camundongo p35-GS-(lig. cliv.)-GS-camundongo p40-6xHis
ACP36	(anti-HSA)-(Lig. Cliv.)-camundongo p40-camundongo p35-(Lig. Cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP37	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(Lig. Cliv.)-camundongo p40-camundongo p35-(Lig. Cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP79	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIL12-(lig. cliv.)-(Anti-HSA)-6xHis
ACP80	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIL12-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP06	Bloqueador12-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-humano p40-Peptídeo Ligante-camundongo p35-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP07	Bloqueador12-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-humano p40-Peptídeo

	Ligante-camundongo p35-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP08	(anti-FOLR1)-Peptídeo Ligante-Bloqueador12-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-humano p40-Peptídeo Ligante-camundongo p35-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP09	(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-Bloqueador12-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-humano p40-Peptídeo Ligante-camundongo p35-6xHis
ACP10	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-humano p40-L-camundongo p35-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador12-6xHis
ACP11	Humano_p40-Peptídeo Ligante-camundongo_p35- (lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador12-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-6xHis
ACP91	humano_p40-Peptídeo Ligante-camundongo_p35-Peptídeo Ligante-Peptídeo Ligante-Bloqueador-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)_(controle_não-clivável)
ACP136	humano p40-L-camundongo p35-(lig. cliv.)-Bloqueador
ACP138	humano_p40-L-camundongo_p35- (lig. cliv.)-Bloqueador-L-(anti-HSA)-L-FOLR1
ACP139	Anti-FOLR1-L-humano_p40-L-camundongo_p35-(lig. cliv.)-Bloqueador12-L-(anti-HSA)
ACP140	Anti-FOLR1-(lig. cliv.)-humano_p40-L-camundongo_p35-(lig. cliv.)-Bloqueador12-L-(anti-HSA)
ACP12	(anti-EpCAM)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-bloqueador2-6xHis
ACP13	(anti-EpCAM)-Bloqueador2-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP14	Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2- (lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP15	Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)- IL2 -6xHis
ACP16	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-Bloqueador2-6xHis

ACP17	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-Bloqueador2-6xHis
ACP18	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-vh(lig. cliv.)vl-6xHis
ACP19	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM) -6xHis
ACP20	IL2-(lig. cliv.)-Bloqueador2-6xHis
ACP21	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-6xHis
ACP22	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-bloqueador-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP23	(anti-FOLR1)-(lig. cliv.)-Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)- IL2-6xHis
ACP24	(Bloqueador2)-(lig. cliv.)-(IL2)-6xHis
ACP25	Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP26	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-bloqueador(NARA1 Vh/Vl)
ACP27	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-bloqueador(NARA1 Vl/Vh)
ACP28	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-(NARA1 Vh/Vl)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM)
ACP29	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-(NARA1 Vl/Vh)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-EpCAM)
ACP38	IL2-(lig. cliv.)-bloqueador-(anti-HSA)-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP39	(anti-EpCAM)-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-Bloqueador2-(lig. cliv.)-IL-2-6xHis
ACP40	CD25ecd-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP41	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-CD25ecd-6xHis
ACP42	(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-CD25ecd-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2-6xHis

ACP43	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-CD25ecd-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-6xHis
ACP44	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-CD25ecd-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP45	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP46	IL2-(lig. cliv.)-ligante peptídicoL-vh(lig. cliv.)vl-ligante peptídico-(anti-HSA)-L-(anti-EpCAM)-6xHis
ACP47	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-(Peptídeo Ligante Clivável)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-6xHis
ACP48	IL2-(lig. cliv.)-Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-6xHis
ACP49	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-6xHis
ACP92	(anti-HSA)-(16mer Lig. Cliv.)-IL2-(16mer Lig. Cliv.)-(anti-HSA)-6XHis
ACP93	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(anti-EpCAM)-Bloqueador2-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP94	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-Bloqueador2-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP95	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-IL2-6xHis
ACP96	(anti-EpCAM)-(16mer lig. cliv.)-IL2-(16mer lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP97	(anti-EpCAM)-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP99	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP100	(anti-EpCAM)-Peptídeo Ligante-IL2-6xHis
ACP101	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis
ACP102	(anti-EpCAM)-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-bloqueador-6xHis
ACP103	IL2-(lig. cliv.)-Peptídeo Ligante-Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(antiI-FOLR1)-6xHis
ACP104	(anti-FOLR1)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-

	Bloqueador2-6xHis
ACP105	Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP106	(anti-FOLR1)-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-bloqueador-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-IL2 -6xHis
ACP107	Bloqueador2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-IL2-Peptídeo Ligante-(anti-FOLR1)-6xHis
ACP108	(anti-EpCAM)-IL2-(Duplamente lig. cliv.)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-bloqueador-6xHis
ACP117	anti-FN CGS-2 scFv (Vh/Vl)-6xHis
ACP118	NARA1 Vh/Vl não-clivável
ACP119	NARA1 Vh/Vl clivável
ACP120	NARA1 Vh/Vl não-clivável
ACP121	NARA1 Vl/Vh clivável
ACP124	IL2-Peptídeo Ligante-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-Peptídeo Ligante-bloqueador_(controle_não-clivável)
ACP132	IL2-L-HSA
ACP141	IL2-L-Albumina_humana
ACP142	IL2-(lig. cliv.)-Albumina_humana
ACP144	IL2-(lig. cliv.)-HSA-(ligante clivável)bloqueador-L-(anti-FOLR1)
ACP145	Anti-FOLR1-L-IL2-(lig. cliv.)-HSA-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-bloqueador2
ACP146	Anti-FOLR1-(cleav. link)-IL2-(lig. cliv.)-HSA-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-bloqueador2
ACP133	IL2-6x His
ACP147	IL2-(Peptídeo ligante clivável)-(anti-HSA)-Peptídeo Ligante-(lig. cliv.)-bloqueador2-L-(anti-EpCAM)
ACP148	(anti-EpCAM)-L-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-L-(Peptídeo ligante cliv.)-bloqueador2

ACP149	(anti-EpCAM)-(lig. cliv.)-IL2-(Peptídeo ligante cliv)-(anti-HSA)-L-(Peptídeo ligante cliv.)-bloqueador2
ACP31	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNa1-(lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP32	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNa1(N+C trunc)-(lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP33	(anti-HSA)-(lig. cliv.)-mIFNa1(C trunc)-(lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP131	mIFNa1
ACP125	Anti-HSA-(lig. cliv.)-mIFNa1
ACP126	mIFNa1-(lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP127	Albumina_Camundongo-(Lig. cliv.)-mIFNa1-(cleav link)-Albumina_camundongo
ACP128	Albumina_Camundongo-(lig. cliv.)-mIFNa1
ACP129	mIFNa1-(lig. cliv.)-mAlb
ACP150	(Anti-FOLR1)-L-(anti-HSA)-(Lig. cliv.)-mIFNa1-(Lig. cliv.)-(anti-HSA)
ACP151	Anti-FOLR1-L-(anti-HSA)-(Lig. cliv.)-mIFNa1-(Lig. cliv.)-(anti-HSA)-L-(anti-FOLR1)
ACP152	(anti-HSA)-L-mIFNa1-L-(anti-HSA)_(controle_não-clivável)
ACP153	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-ligante peptídico(lig. cliv.)-bloqueador2
ACP154	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-ligante peptídico(lig. cliv.)-bloqueador2
ACP155	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-ligante peptídico(lig. cliv.)-bloqueador2
ACP156	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-ligante peptídico(lig. cliv.)-bloqueador2
ACP157	IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-ligante peptídico(lig. cliv.)-bloqueador2

Tabela de Sequência

SEQ ID NO.	**Nome**	**Sequência**
1	IL-2 Humana	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIISTLT

2	Albumina sérica humana	MKWVTFISLL FLFSSAYSRG VFRRDAHKSE VAHRFKDLGE ENFKALVLIA FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNPNLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELLF FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDELR DEGKASSAKQ GLKCASLQKF GERAFKAWAV ARLSQRFPKA EFAEVSKLVT DLTKVHTECC HGDLLECADD RADLAKYICE NQDSISSKLK ECCEKPLLEK SHCIAEVEND EMPADLPSLA ADFVGSKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYEYAR RHPDYSVVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE FKPLVEEPQN LIKQNCELFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPTLVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDCLSVF LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNGRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEK ERQIKKQTALV ELVKHK PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET CFAEEGKKLVAASQAALGL
45	ACP12 (proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggs aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS

		VGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTF GGGTKVEIKHHHHHH
46	ACP13 (proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggs EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAP GKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTN VGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsgg ggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAG MKGLPGSaptssstkktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatel khlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefl nrwitfcqsiistltHHHHHH
47	ACP14 (proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAP GKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTN VGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsgg ggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlll dlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrp rdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMK GLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTT

		LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
48	ACP15 (proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAP GKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTN VGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsgg ggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqle hllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfh lrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
49	ACP16 (proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKG LPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWV RQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHH H
50	ACP17 (proteína	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL

	de fusão de IL2)	KPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggs aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKG LPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWV RQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQN VGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHH H
51	ACP18 (proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggs aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDS SSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSsggpgpagmkglpgsDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIY SASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH

52	ACP19 (proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPG KGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNV GWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggg gsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQ APGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgg ggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQ APGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHH**
53	ACP20 (proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWG QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGG GTKVEIKHHHHHH
54	ACP21 (proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPG KGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNS

		LRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNV GWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
55	ACP22 (proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPG KGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNV GWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKSGGPGPAGM KGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsg gggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMS WYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHH HH
56	ACP23 (proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQT PGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMN NLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSSGGPGPAGMK GLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ NVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggs

		ggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
57	ACP24 (proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
58	ACP25 (proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
59	ACP26 (proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk

		pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSggggsggggsggggsggggsQVQLQQSGAELVRPGTSVK VSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYN EKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGD GYYAYFDVWGAGTTVTVSSggggsggggsggggsDIVLTQSPASL AVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLI YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQS NEDPYTFGGGTKLEIKHHHHHHHEPEA
60	ACP27 (proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPG KQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggs aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSggggsggggsggggsggggsDIVLTQSPASLAVSLGQRATI SCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIP ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGG TKLEIKggggsggggsggggsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKA SGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAY FDVWGAGTTVTVSSHHHHHHHEPEA
61	ACP28 (proteína de fusão	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsQVQLQ

	de IL2)	QSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLE WIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTS DDSAVYFCARWRGDGYYAYFDVWGAGTTVTVSSggggsgggg sggggsDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKggggsggggsggggs EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgggg gsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQA PGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMN SLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHHEPEA
62	ACP29 (proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelk pleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiist ltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsDIVLT QSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQ PPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATY YCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKggggsggggsggggsQVQLQQSG AELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGV INPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARWRGDGYYAYFDVWGAGTTVTVSSggggsggggsgggg sEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgg ggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQ APGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHHEPE A
63	IL2Ra	10 20 30 40 50

		MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTMLNCE 60 70 80 90 100 CKRGFRRIKS GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE 110 120 130 140 150 QKERKTTEMQ SPMQPVDQAS LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYY 160 170 180 190 200 QCVQGYRALH RGPAESVCKM THGKTRWTQP QLICTGEMET SQFPGEEKPQ 210 220 230 240 250 ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ VAVAGCVFLL 260 270 ISVLLLSGLT WQRRQRKSRR TI
64	IL2Rb	10 20 30 40 50 MAAPALSWRL PLLILLLPLA TSWASAAVNG TSQFTCFYNS RANISCVWSQ 60 70 80 90 100 DGALQDTSCQ VHAWPDRRRW NQTCELLPVS QASWACNLIL GAPDSQKLTT 110 120 130 140 150 VDIVTLRVLC REGVRWRVMA IQDFKPFENL RLMAPISLQV VHVETHRCNI 160 170 180 190 200 SWEISQASHY FERHLEFEAR TLSPGHTWEE APLLTLKQKQ EWICLETLTP

		210 220 230 240 250 DTQYEFQVRV KPLQGEFTTW SPWSQPLAFR TKPAALGKDT IPWLGHLLVG 260 270 280 290 300 LSGAFGFIIL VYLLINCRNT GPWLKKVLKC NTPDPSKFFS QLSSEHGGDV 310 320 330 340 350 QKWLSSPFPS SSFSPGGLAP EISPLEVLER DKVTQLLLQQ DKVPEPASLS 360 370 380 390 400 SNHSLTSCFT NQGYFFFHLP DALEIEACQV YFTYDPYSEE DPDEGVAGAP 410 420 430 440 450 TGSSPQPLQP LSGEDDAYCT FPSRDDLLLF SPSLLGGPSP PSTAPGGSGA 460 470 480 490 500 GEERMPPSLQ ERVPRDWDPQ PLGPPTPGVP DLVDFQPPPE LVLREAGEEV 510 520 530 540 550 PDAGPREGVS FPWSRPPGQG EFRALNARLP LNTDAYLSLQ ELQGQDPTHL V
65	IL2Rg	10 20 30 40 50 MLKPSLPFTS LLFLQLPLLG VGLNTTILTP NGNEDTTADF FLTTMPTDSL

		60 70 80 90 100 SVSTLPLPEV QCFVFNVEYM NCTWNSSSEP QPTNLTLHYW YKNSDNDKVQ 110 120 130 140 150 KCSHYLFSEE ITSGCQLQKK EIHLYQTFVV QLQDPREPRR QATQMLKLQN 160 170 180 190 200 LVIPWAPENL TLHKLSESQL ELNWNNRFLN HCLEHLVQYR TDWDHSWTEQ 210 220 230 240 250 SVDYRHKFSL PSVDGQKRYT FRVRSRFNPL CGSAQHWSEW SHPIHWGSNT 260 270 280 290 300 SKENPFLFAL EAVVISVGSM GLIISLLCVY FWLERTMPRI PTLKNLEDLV 310 320 330 340 350 TEYHGNFSAW SGVSKGLAES LQPDYSERLC LVSEIPPKGG ALGEGPGASP 360 CNQHSPYWAP PCYTLKPET
66	ACP04 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12 murina	iwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkef gdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcw wlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaa eeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtw stphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewa svpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysct aedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyed

	)	lkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadp yrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaHHHHHH
67	ACP05 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12 murina)	iwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkef gdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcw wlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaa eeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtw stphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewa svpcsggggsggggsggggsrnlpvatpdpgmfpclhhsqnllravsnmlqkarqtl efypctseeidheditkdktstveaclpleltknesclnsretsfitngsclasrktsfmmal clssiyedlkmyqvefktmnakllmdpkrqifldqnmlavidelmqalnfnsetvpqks sleepdfyktkiklcillhafriravtidrvmsylnasHHHHHH
68	ACP06 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12 murina)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLP GTAPKLLIYYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQ LVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsggg gsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSiwelkkdvyvveldwyp dapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlsh slllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssd pqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklky enytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgks krekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsg gggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktc lplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnh nhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtin rvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS

		VSSQGTLVTVSSHHHHHHHEPEA
69	ACP07 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12 murina)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLP GTAPKLLIYYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDE ADYYCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQ LVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsggg gsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSiwelkkdvyvveldwyp dapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlsh sllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssd pqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklky enytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgks krekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsg gggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktc lplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnh nhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtin rvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGS LSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNY ADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDR IYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
70	ACP08 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12	QVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQT PGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMN NLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSggggsggggsggg gsQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQV

	murina)	QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsgg ggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSiwelkkdvyvveldwy pdapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevls hsllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgss dpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklk yenytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgk skrekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggs ggggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlkt clplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqn hnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvti nrvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTL YAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL SVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
71	ACP09 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12 murina)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggg gsQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsgg ggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSiwelkkdvyvveldwy pdapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevls hsllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgss dpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklk

		yenytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgk skrekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggs ggggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlkt clplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqn hnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvti nrvmgylssaHHHHHHEPEA
72	ACP10 (proteína de fusão de p40 humana/ p35 IL12 murina)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGSiwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgk tltiqvkefgdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceakny sgrftcwwlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqeds acpaaeeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevswe ypdtwstphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryysss wsewasvpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktarekl khysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlcl gsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppv geadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSgg ggsggggsggggsggggsggggsggggsQSVLTQPPSVSGAPGQRVT ISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYYNDQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDRYTHPALLFG TGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTHGSHDN WGQGTMVTVSSHHHHHHEPEA
73	ACP11 (proteína de fusão de p40	iwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkef gdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqkepknktflrceaknysgrftcw wlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdnkeyeysvecqedsacpaa eeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlqlkplknsrqvevsweypdtw

	humana/ p35 IL12 murina)	stphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrknasisvraqdryyssswsewa svpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysct aedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyed lkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadp yrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSggggsgg ggsggggsggggsggggsggggsQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCS GSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYYNDQRPSGVPDRFSG SKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDRYTHPALLFGTGTK VTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTHGSHDNWGQ GTMVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAE SVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
74	IL12 p40 humana (Nº de Acesso Uniprot P29460)	10 20 30 40 50 MCHQQLVISW FSLVFLASPL VAIWELKKDV YVVELDWYPD APGEMVVLTC 60 70 80 90 100 DTPEEDGITW TLDQSSEVLG SGKTLTIQVK EFGDAGQYTC HKGGEVLSHS 110 120 130 140 150 LLLLHKKEDG IWSTDILKDQ KEPKNKTFLR CEAKNYSGRF TCWWLTTIST 160 170 180 190 200 DLTFSVKSSR GSSDPQGVTC GAATLSAERV RGDNKEYEYS VECQEDSACP 210 220 230 240 250 AAEESLPIEV MVDAVHKLKY ENYTSSFFIR DIIKPDPPKN LQLKPLKNSR 260 270 280 290 300 QVEVSWEYPD TWSTPHSYFS LTFCVQVQGK SKREKKDRVF TDKTSATVIC 310 320 RKNASISVRA QDRYYSSSWS EWASVPCS

75	IL12 p35 de camundongo (Nº de Acesso Uniprot P43431)	10 20 30 40 50 MCQSRYLLFL ATLALLNHLS LARVIPVSGP ARCLSQSRNL LKTTDDMVKT 60 70 80 90 100 AREKLKHYSC TAEDIDHEDI TRDQTSTLKT CLPLELHKNE SCLATRETSS 110 120 130 140 150 TTRGSCLPPQ KTSLMMTLCL GSIYEDLKMY QTEFQAINAA LQNHNHQQII 160 170 180 190 200 LDKGMLVAID ELMQSLNHNG ETLRQKPPVG EADPYRVKMK LCILLHAFST 210 RVVTINRVMG YLSSA
76	IL12Rb-2	10 20 30 40 50 MAHTFRGCSL AFMFIITWLL IKAKIDACKR GDVTVKPSHV ILLGSTVNIT 60 70 80 90 100 CSLKPRQGCF HYSRRNKLIL YKFDRRINFH HGHSLNSQVT GLPLGTTLFV 110 120 130 140 150 CKLACINSDE IQICGAEIFV GVAPEQPQNL SCIQKGEQGT VACTWERGRD 160 170 180 190 200 THLYTEYTLQ LSGPKNLTWQ KQCKDIYCDY LDFGINLTPE SPESNFTAKV 210 220 230 240 250 TAVNSLGSSS SLPSTFTFLD IVRPLPPWDI RIKFQKASVS RCTLYWRDEG 260 270 280 290 300 LVLLNRLRYR PSNSRLWNMV NVTKAKGRHD LLDLKPFTEY EFQISSKLHL 310 320 330 340 350 YKGSWSDWSE SLRAQTPEEE PTGMLDVWYM KRHIDYSRQQ ISLFWKNLSV 360 370 380 390 400 SEARGKILHY QVTLQELTGG KAMTQNITGH TSWTTVIPRT GNWAVAVSAA 410 420 430 440 450 NSKGSSLPTR INIMNLCEAG LLAPRQVSAN SEGMDNILVT WQPPRKDPSA 460 470 480 490 500 VQEYVVEWRE LHPGGDTQVP LNWLRSRPYN VSALISENIK SYICYEIRVY 510 520 530 540 550 ALSGDQGGCS SILGNSKHKA PLSGPHINAI TEEKGSILIS WNSIPVQEQM 560 570 580 590 600 GCLLHYRIYW KERDSNSQPQ LCEIPYRVSQ NSHPINSLQP RVTYVLWMTA 610 620 630 640 650 LTAAGESSHG NEREFCLQGK ANWMAFVAPS ICIAIIMVGI FSTHYFQQKV 660 670 680 690 700 FVLLAALRPQ WCSREIPDPA NSTCAKKYPI AEEKTQLPLD RLLIDWPTPE 710 720 730 740 750 DPEPLVISEV LHQVTPVFRH PPCSNWPQRE KGIQGHQASE KDMMHSASSP 760 770 780 790 800 PPPRALQAES RQLVDLYKVL ESRGSDPKPE NPACPWTVLP AGDLPTHDGY 810 820 830 840 850 LPSNIDDLPS HEAPLADSLE ELEPQHISLS VFPSSSLHPL TFSCGDKLTL 860 DQLKMRCDSL ML

77	IL12Rb-1	10 20 30 40 50 MEPLVTWVVP LLFLFLLSRQ GAACRTSECC FQDPPYPDAD SGSASGPRDL 60 70 80 90 100 RCYRISSDRY ECSWQYEGPT AGVSHFLRCC LSSGRCCYFA AGSATRLQFS 110 120 130 140 150 DQAGVSVLYT VTLWVESWAR NQTEKSPEVT LQLYNSVKYE PPLGDIKVSK 160 170 180 190 200 LAGQLRMEWE TPDNQVGAEV QFRHRTPSSP WKLGDCGPQD DDTESCLCPL 210 220 230 240 250 EMNVAQEFQL RRRQLGSQGS SWSKWSSPVC VPPENPPQPQ VRFSVEQLGQ 260 270 280 290 300 DGRRRLTLKE QPTQLELPEG CQGLAPGTEV TYRLQLHMLS CPCKAKATRT 310 320 330 340 350 LHLGKMPYLS GAAYNVAVIS SNQFGPGLNQ TWHIPADTHT EPVALNISVG 360 370 380 390 400 TNGTTMYWPA RAQSMTYCIE WQPVGQDGGL ATCSLTAPQD PDPAGMATYS 410 420 430 440 450 WSRESGAMGQ EKCYYITIFA SAHPEKLTLW STVLSTYHFG GNASAAGTPH 460 470 480 490 500 HVSVKNHSLD SVSVDWAPSL LSTCPGVLKE YVVRCRDEDS KQVSEHPVQP 510 520 530 540 550 TETQVTLSGL RAGVAYTVQV RADTAWLRGV WSQPQRFSIE VQVSDWLIFF 560 570 580 590 600 ASLGSFLSIL LVGVLGYLGL NRAARHLCPP LPTPCASSAI EFPGGKETWQ 610 620 630 640 650 WINPVDFQEE ASLQEALVVE MSWDKGERTE PLEKTELPEG APELALDTEL 660 SLEDGDRCKA KM
78	IL-12 p35 humana (Nº de Acesso Uniprot P29459)	10 20 30 40 50 MCHQQLVISW FSLVFLASPL VAIWELKKDV YVVELDWYPD APGEMVVLTC 60 70 80 90 100 DTPEEDGITW TLDQSSEVLG SGKTLTIQVK EFGDAGQYTC HKGGEVLSHS 110 120 130 140 150 LLLLHKKEDG IWSTDILKDQ KEPKNKTFLR CEAKNYSGRF TCWWLTTIST 160 170 180 190 200 DLTFSVKSSR GSSDPQGVTC GAATLSAERV RGDNKEYEYS VECQEDSACP 210 220 230 240 250 AAEESLPIEV MVDAVHKLKY ENYTSSFFIR DIIKPDPPKN LQLKPLKNSR 260 270 280 290 300 QVEVSWEYPD TWSTPHSYFS LTFCVQVQGK SKREKKDRVF TDKTSATVIC 310 320 RKNASISVRA QDRYYSSSWS EWASVPCS

79	IL-12 p40 de camundongo (Nº de Acesso Uniprot P43432)	10 20 30 40 50 MCPQKLTISW FAIVLLVSPL MAMWELEKDV YVVEVDWTPD APGETVNLTC 60 70 80 90 100 DTPEEDDITW TSDQRHGVIG SGKTLTITVK EFLDAGQYTC HKGGETLSHS 110 120 130 140 150 HLLLHKKENG IWSTEILKNF KNKTFLKCEA PNYSGRFTCS WLVQRNMDLK 160 170 180 190 200 FNIKSSSSSP DSRAVTCGMA SLSAEKVTLD QRDYEKYSVS CQEDVTCPTA 210 220 230 240 250 EETLPIELAL EARQQNKYEN YSTSFFIRDI IKPDPPKNLQ MKPLKNSQVE 260 270 280 290 300 VSWEYPDSWS TPHSYFSLKF FVRIQRKKEK MKETEEGCNQ KGAFLVEKTS 310 320 330 TEVQCKGGNV CVQAQDRYYN SSCSKWACVP CRVRS
80	ACP01 (proteína de fusão de IFNg de camundongo)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlf evlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhq llpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
81	ACP02 (proteína de fusão de IFNg de camundongo)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlf evlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhq llpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveek slfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkda fmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGL PGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR

		QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
82	ACP03 (proteína de fusão de IFNg de camundongo)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlf evlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhq llpesslrkrkrsrcggggsggggsggggshgtviesleslnnyfnssgidveekslfldi wrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsi akfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGS EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
83	IFN-g humano (Nº de Acesso Uniprot P01579)	10 20 30 40 50 MKYTSYILAF QLCIVLGSLG CYCQDPYVKE AENLKKYFNA GHSDVADNGT 60 70 80 90 100 LFLGILKNWK EESDRKIMQS QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM 110 120 130 140 150 NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN YSVTDLNVQR KAIHELIQVM AELSPAAKTG 160 KRKRSQMLFR GRRASQ
84	IFN-g de camundongo (Nº de Acesso Uniprot P01580)	10 20 30 40 50 MNATHCILAL QLFLMAVSGC YCHGTVIESL ESLNNYFNSS GIDVEEKSLF 60 70 80 90 100 LDIWRNWQKD GDMKILQSQI ISFYLRLFEV LKDNQAISNN ISVIESHLIT 110 120 130 140 150 TFFSNSKAKK DAFMSIAKFE VNNPQVQRQA FNELIRVVHQ LLPESSLRKR KRSRC
85	ACP30 (proteína	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF

	de fusão de IFNg de camundongo)	TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKG LPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfe vlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqll pesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
86	ACP31 (proteína de fusão de IFNa1 de camundongo)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkdfgfpqekvdaqqikkaqaip vlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqgclmqqvgvqefpltqedall avrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanvlgrlreekSGGPGPAG MKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHH HHHEPEA
87	ACP32 (proteína de fusão de IFNa1 de camundongo)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkdfgfpqekvdaqqikkaqaip vlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqgclmqqvgvqefpltqedall avrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanvSGGPGPAGMKGLP

	ongo)	GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
88	IFNgR1	10 20 30 40 50 MALLFLLPLV MQGVSRAEMG TADLGPSSVP TPTNVTIESY NMNPIVYWEY 60 70 80 90 100 QIMPQVPVFT VEVKNYGVKN SEWIDACINI SHHYCNISDH VGDPSNSLWV 110 120 130 140 150 RVKARVGQKE SAYAKSEEFA VCRDGKIGPP KLDIRKEEKQ IMIDIFHPSV 160 170 180 190 200 FVNGDEQEVD YDPETTCYIR VYNVYVRMNG SEIQYKILTQ KEDDCDEIQC 210 220 230 240 250 QLAIPVSSLN SQYCVSAEGV LHVWGVTTEK SKEVCITIFN SSIKGSLWIP 260 270 280 290 300 VVAALLLFLV LSLVFICFYI KKINPLKEKS IILPKSLISV VRSATLETKP 310 320 330 340 350 ESKYVSLITS YQPFSLEKEV VCEEPLSPAT VPGMHTEDNP GKVEHTEELS 360 370 380 390 400 SITEVVTTEE NIPDVVPGSH LTPIERESSS PLSSNQSEPG SIALNSYHSR 410 420 430 440 450 NCSESDHSRN GFDTDSSCLE SHSSLSDSEF PPNNKGEIKT EGQELITVIK 460 470 480 APTSFGYDKP HVLVDLLVDD SGKESLIGYR PTEDSKEFS
89	IFNgR2	10 20 30 40 50 MRPTLLWSLL LLLGVFAAAA AAPPDPLSQL PAPQHPKIRL YNAEQVLSWE 60 70 80 90 100 PVALSNSTRP VVYQVQFKYT DSKWFTADIM SIGVNCTQIT ATECDFTAAS 110 120 130 140 150 PSAGFPMDFN VTLRLRAELG ALHSAWVTMP WFQHYRNVTV GPPENIEVTP 160 170 180 190 200 GEGSLIIRFS SPFDIADTST AFFCYYVHYW EKGGIQQVKG PFRSNSISLD 210 220 230 240 250 NLKPSRVYCL QVQAQLLWNK SNIFRVGHLS NISCYETMAD ASTELQQVIL 260 270 280 290 300 ISVGTFSLLS VLAGACFFLV LKYRGLIKYW FHTPPSIPLQ IEEYLKDPTQ 310 320 330 PILEALDKDS SPKDDVWDSV SIISFPEKEQ EDVLQTL
90	ACP51 Proteína de fusão de IFG de camundongo	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhq

		llpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
91	ACP52 Proteína de fusão de IFG de camundongo	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMK GLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlf evlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhq llpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGL VQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGG GLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARIT RGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHH
92	ACP53 Proteína de fusão de IFG de camundongo	eahkseiahryndlgeqhfkglvliafsqylqkcsydehaklvqevtdfaktcvadesaa ncdkslhtlfgdklcaipnlrenygeladcctkqepernecflqhkddnpslppferpea eamctsfkenpttfmghylhevarrhpyfyapellyyaeqyneiltqccaeadkescltp kldgvkekalvssvrqrmkcssmqkfgerafkawavarlsqtfpnadfaeitklatdltkv nkecchgdllecaddraelakymcenqatisskIqtccdkpllkkahclsevehdtmp adlpaiaadfvedqevcknyaeakdvflgtflyeysrrhpdysvslllrlakkyeatlekcc aeanppacygtvlaefqplveepknlvktncdlyeklgeygfqnailvrytqkapqvstp tlveaarnlgrvgtkcctlpedqrlpcvedylsailnrvcllhektpvsehvtkccsgslverr pcfsaltvdetyvpkefkaetftfhsdictlpekekqikkqtalaelvkhkpkataeqlktv mddfaqfldtcckaadkdtcfstegpnlvtrckdalaSGGPGPAGMKGLPGSh

		gtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqai snnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkr krsrcSGGPGPAGMKGLPGSeahkseiahryndlgeqhfkglvliafsqylqk csydehaklvqevtdfaktcvadesaancdkslhtlfgdklcaipnlrenygeladcctk qepernecflqhkddnpslppferpeaeamctsfkenpttfmghylhevarrhpyfya pellyyaeqyneiltqccaeadkescltpkldgvkekalvssvrqrmkcssmqkfgera fkawavarlsqtfpnadfaeitklatdltkvnkecchgdllecaddraelakymcenqati ssklqtccdkpllkkahclsevehdtmpadlpaiaadfvedqevcknyaeakdvflgtfl yeysrrhpdysvslllrlakkyeatlekccaeanppacygtvlaefqplveepknlvktnc dlyeklgeygfqnailvrytqkapqvstptlveaarnlgrvgtkcctlpedqrlpcvedyls ailnrvcllhektpvsehvtkccsgslverrpcfsaltvdetyvpkefkaetftfhsdictlpe kekqikkqtalaelvkhkpkataeqlktvmddfaqfldtcckaadkdtcfstegpnlvtrc kdalaHHHHHH
93	ACP54 Proteína de fusão de IFG de camundongo	eahkseiahryndlgeqhfkglvliafsqylqkcsydehaklvqevtdfaktcvadesaa ncdkslhtlfgdklcaipnlrenygeladcctkqepernecflqhkddnpslppferpea eamctsfkenpttfmghylhevarrhpyfyapellyyaeqyneiltqccaeadkescltp kldgvkekalvssvrqrmkcssmqkfgerafkawavarlsqtfpnadfaeitklatdltkv nkecchgdllecaddraelakymcenqatissklqtccdkpllkkahclsevehdtmp adlpaiaadfvedqevcknyaeakdvflgtflyeysrrhpdysvslllrlakkyeatlekcc aeanppacygtvlaefqplveepknlvktncdlyeklgeygfqnailvrytqkapqvstp tlveaarnlgrvgtkcctlpedqrlpcvedylsailnrvcllhektpvsehvtkccsgslverr pcfsaltvdetyvpkefkaetftfhsdictlpekekqikkqtalaelvkhkpkataeqlktv mddfaqfldtcckaadkdtcfstegpnlvtrckdalaSGGPGPAGMKGLPGSh gtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqai snnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkr krsrcggggsggggsggggshgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdg dmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpq vqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSeahkseiah ryndlgeqhfkglvliafsqylqkcsydehaklvqevtdfaktcvadesaancdkslhtlf

		gdklcaipnlrenygeladcctkqepernecflqhkddnpslppferpeaeamctsfke npttfmghylhevarrhpyfyapellyyaeqyneiltqccaeadkescltpkldgvkeka lvssvrqrmkcssmqkfgerafkawavarlsqtfpnadfaeitklatdltkvnkecchgd llecaddraelakymcenqatissklqtccdkpllkkahclsevehdtmpadlpaiaadf vedqevcknyaeakdvflgtflyeysrrhpdysvslllrlakkyeatlekccaeanppac ygtvlaefqplveepknlvktncdlyeklgeygfqnailvrytqkapqvstptlveaarnlg rvgtkcctlpedqrlpcvedylsailnrvcllhektpvsehvtkccsgslverrpcfsaltvd etyvpkefkaetftfhsdictlpekekqikkqtalaelvkhkpkataeqlktvmddfaqfld tcckaadkdtcfstegpnlvtrckdalaHHHHHH
94	ACP50 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiw rnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsia kfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcggggsggggsggggshgtvies leslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnis vieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrc SGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSHHHHHH
95	ACP55 Proteína de fusão de IFG de	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak

	camundongo	fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtvieslesslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
96	ACP56 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtvieslesslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
97	ACP57 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtvieslesslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSE

	ongo	VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgggg sQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQT PGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMN NLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
98	ACP58 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGShg tviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqais nnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkr srcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSC AASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKG RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGK GTQVTVSSHHHHHHEPEA
99	ACP59 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfl diwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafm

		siakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPG Shgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdn qaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpessl rkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAE SVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
100	ACP60 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGShg tviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqais nnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkr srcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSC AASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQ GTQVTVSSHHHHHHEPEA
101	ACP61 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGShg tviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqais

		nnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkr srcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVGAFRPY RKHEWGQGTLVTVSRggggsggggsggggsSSELTQDPAVSVAL GQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTTTGAQAEDEADYYCNSSPFEHNLV VFGGGTKLTVLHHHHHHEPEA
102	ACP63 Anti-FN CGS-2 scFv	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVGAFRPYRKHE WGQGTLVTVSRggggsggggsggggsSSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTTTGAQAEDEADYYCNSSPFEHNLVVFGG GTKLTVLHHHHHHEPEA
103	ACP69 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKG LPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfe vlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqll

		pesslrkrkrsrcHHHHHHEPEA
104	ACP70 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarchgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgd mkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqv qrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgt viesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqais nnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkr srcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSHHHHHHEPEA
105	ACP71 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarchgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgd mkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqv qrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFA KTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCT KQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTF MGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVA RLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAEL AKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADL PAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSL LLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLV KTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNL GRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHV TKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTL PEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCC

		KAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALASGGPGPAGMKGLPGSh gtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqai snnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkr krsrcSGGPGPAGMKGLPGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLV LIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSL HTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDD NPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFY APELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSS VRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKL ATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQ TCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKN YAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCC AEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGF QNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQR LPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCF SALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAEL VKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPN LVTRCKDALAHHHHHHEPEA
106	ACP72 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFS QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLF GDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE

		DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC KDALASGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiw rnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsia kfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSE AHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQ EVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGEL ADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFK ENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCA EADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAF KAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECA DDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHD TMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRH PDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLV EEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLV EAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKT PVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTF HSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFA QFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALASGGPGPAGM KGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylr lfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvh qllpesslrkrkrsrcHHHHHHEPEA
107	ACP73 Proteína de fusão de IFG de camund	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFS QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLF GDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL

	ongo	TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC KDALASGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiw rnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsia kfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSE AHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQ EVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGEL ADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFK ENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCA EADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAF KAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECA DDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHD TMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRH PDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLV EEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLV EAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKT PVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTF HSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFA QFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALASGGPGPAGM KGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylr lfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvh qllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEAHKSEIAHRYNDLGE QHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES

		AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNE CFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEV ARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGV KEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNA DFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQ ATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVE DQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKY EATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLY EKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKC CTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGS LVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIK KQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDT CFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHHEPEA
108	ACP74 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllglllwlrgarcEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFS QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLF GDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC KDALASGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiw rnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsia

		kfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSg gggsEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEH AKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRE NYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAM CTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILT QCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFG ERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGD LLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSE VEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEY SRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEF QPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVS TPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCL LHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKA ETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVM DDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAggggsSG GPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgd mkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqv qrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEAHKSEIA HRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFA KTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCT KQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTF MGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKES CLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVA RLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAEL AKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADL PAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSL LLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLV KTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNL GRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHV

		TKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTL PEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCC KAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHHEPEA
109	ACP75 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFS QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLF GDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC KDALASGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiw rnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsia kfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSg gggsggggsEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCS YDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIP NLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPE AEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQY NEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSM QKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKEC CHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKA HCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGT FLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGT

		VLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKA PQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILN RVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQL KTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAgg ggsggggsSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfld iwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsi akfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGS EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLV QEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYG ELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSF KENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCC AEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERA FKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLEC ADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEH DTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRR HPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPL VEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTL VEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEK TPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTF HSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFA QFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHHEPEA
110	ACP78 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSggggsggggsggggshgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkd gdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnp qvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcggggsggggsggggsEVQLVESGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS

		SISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggshgtvieslesl nnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvies hlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcgggg sggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHH HHHHEPEA
111	ACP134 Proteína de fusão de IFG de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwr nwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiak fevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKG LPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfe vlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqll pesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAG GSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGST NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNF DRIYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
112	ACP135 Proteína de fusão	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ

	de IFG de camundongo	VTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGShgtviesleslnnyfnssgidveekslfldiwrnwqkdgdmkilqsqiisfylrlfevlkdnqaisnnisvieshlittffsnskakkdafmsiakfevnnpqvqrqafnelirvvhqllpesslrkrkrsrcSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
113	ACP34 proteína de fusão de IL-12 de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltcdtpeedditwtsdqrhgvigsgktltitvkefldagqytchkggetlshshlllhkkengiwsteilknfknktflkceapnysgrftcswlvqrnmdlkfniksssspdsravtcgmaslsaekvtldqrdyekysvscqedvtcptaeetlpielalearqqnkyenystsffirdiikpdppknlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvriqrkkekmketeegcnqkgaflvektstevqckggnvcvqaqdryynsscskwacvpcrvrsHHHHHH
114	ACP35 proteína de fusão de IL-12	mdmrvpaqllgllllwlrgarcrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaggggsggggsggggsSGGPGPAGMK

	de camundongo	GLPGSggggsggggsggggsmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltcdtpeeddditwtsdqrhgvigsgktltitvkefldagqytchkggetlshshlllhkkengiwsteilknfknktflkceapnysgrftcswlvqrnmdlkfnikssssspdsravtcgmaslsaekvtldqrdyekysvscqedvtcptaeetlpielalearqqnkyenystsffirdiikpdppknlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvriqrkkekmketeegcnqkgaflvektstevqckggnvcvqaqdryynsscskwacvpcrvrsHHHHHH
115	ACP36 proteína de fusão de IL-12 de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltcdtpeedditwtsdqrhgvigsgktltitvkefldagqytchkggetlshshlllhkkengiwsteilknfknktflkceapnysgrftcswlvqrnmdlkfnikssssspdsravtcgmaslsaekvtldqrdyekysvscqedvtcptaeetlpielalearqqnkyenystsffirdiikpdppknlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvriqrkkekmketeegcnqkgaflvektstevqckggnvcvqaqdryynsscskwacvpcrvrsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
116	ACP37 proteína de fusão de IL-12 de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltc

		dtpeedditwtsdqrhgvigsgktltitvkefldagqytchkggetlshshlllhkkengiw steilknfknktflkceapnysgrftcswlvqrnmdlkfnikssssspdsravtcgmasls aekvtldqrdyekysvscqedvtcptaeetlpielalearqqnkyenystsffirdiikpdp pknlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvriqrkkekmketeegcnqkg aflvektstevqckggnvcvqaqdryynsscskwacvpcrvrsggggsggggsggg gsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclpl elhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhn hqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinr vmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGTLVTVSSHHHHHH
117	ACP79 proteína de fusão de IL-12 de camundongo	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSSGGPGPAGMKGLPGSmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltc dtpeedditwtsdqrhgvigsgktltitvkefldagqytchkggetlshshlllhkkengiw steilknfknktflkceapnysgrftcswlvqrnmdlkfnikssssspdsravtcgmasls aekvtldqrdyekysvscqedvtcptaeetlpielalearqqnkyenystsffirdiikpdp pknlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvriqrkkekmketeegcnqkg aflvektstevqckggnvcvqaqdryynsscskwacvpcrvrsggggsggggsggg gsrvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclpl elhknesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhn hqqiildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinr vmgylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY

		AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS VSSQGTLVTVSSHHHHHH
118	ACP80 proteína de fusão de IL-12 de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGSmwelekdvyvvevdwtpdapgetvnltcdt peedditwtsdqrhgvigsgktltitvkefldagqytchkggetlshshlllhkkengiwst eilknfknktflkceapnysgrftcswlvqrnmdlkfnikssssspdsravtcgmaslsae kvtldqrdyekysvscqedvtcptaeetlpielalearqqnkyenystsffirdiikpdppk nlqmkplknsqvevsweypdswstphsyfslkffvriqrkkekmketeegcnqkgafl vektstevqckggnvcvqaqdryynsscskwacvpcrvrsggggsggggsggggs rvipvsgparclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelh knesclatretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqq iildkgmlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmg ylssaSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS QGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRL SCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYW GKGTQVTVSSHHHHHH
119	Proteína de fusão de IL-12 quimérica ACP91	mdmrvpaqllgllllwlrgarciwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgit wtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqk epknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdn keyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlql kplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrkna sisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnl lkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgs clppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqs

		lnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaggggsggggs ggggsggggsggggsggggsggggsggggsggggsQSVLTQPPSVSGA PGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYYNDQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDRYTH PALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGS NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKT HGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGL VQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
120	ACP136 Proteína de fusão de IL-12 quimérica	mdmrvpaqllglllwlrgarciwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgit wtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqk epknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdn keyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlql kplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrkna sisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnl lkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgs clppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqs lnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPGPA GMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsQSVLTQPPS VSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYY NDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSY DRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIR YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSHHHHHHEPEA
121	ACP138 Proteína	mdmrvpaqllglllwlrgarciwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpeedgit wtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilkdqk

	de fusão de IL-12 quimérica	epknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervrgdn keyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppknlql kplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicrkna sisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsqsrnl lkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretssttrgs clppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidelmqs lnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPGPA GMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsQSVLTQPPS VSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYY NDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSY DRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIR YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsggggsEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQ ESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQR EFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPE DTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
122	ACP139 Proteína de fusão de IL-12 quimérica	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSggggsggggsggggsiwelkkdvyvveldwypdapgemvvltcdtpee dgitwtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlshsllllhkkedgiwstdilk dqkepknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatlsaervr gdnkeyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklkyenytssffirdiikpdppk nlqlkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdktsatvicr knasisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsggggsrvipvsgparclsq

		srnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknesclatretsstt rgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkgmlvaidel mqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssaSGGPG PAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsQSVLTQP PSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIY YNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSY DRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIR YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsggggsEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
123	ACP140 Proteína de fusão de IL-12 quimérica	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSSGGPGPAGMKGLPGSiwelkkdvyvveldwypdapgemvvltc dtpeedgitwtldqssevlgsgktltiqvkefgdagqytchkggevlshsllllhkkedgiw stdilkdqkepknktflrceaknysgrftcwwlttistdltfsvkssrgssdpqgvtcgaatls aervrgdnkeyeysvecqedsacpaaeeslpievmvdavhklkyenytssffirdiik pdppknlqlkplknsrqvevsweypdtwstphsyfsltfcvqvqgkskrekkdrvftdkt satvicrknasisvraqdryyssswsewasvpcsggggsggggsggggsrvipvsg parclsqsrnllkttddmvktareklkhysctaedidheditrdqtstlktclplelhknescl atretssttrgsclppqktslmmtlclgsiyedlkmyqtefqainaalqnhnhqqiildkg mlvaidelmqslnhngetlrqkppvgeadpyrvkmklcillhafstrvvtinrvmgylssa SGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsQ SVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGT APKLLIYYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLV

		ESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGL EWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSggggsggggsggggs EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
124	ACP38 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAID SSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGK APKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQE SGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELV ARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTG VYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHH
125	ACP39 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA ASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ GTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSP

		DTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNW DALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSA SFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYT YPYTFGGGTKVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehllldl qmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprd lisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH**
126	ACP40 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcelcdddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriks gslymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvd qaslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthg ktrwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatmets iftteyqggggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLP GSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqclee elkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcq siistltHHHHHH
127	ACP41 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggg gsggggsggggsggggselcdddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksg slymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdq aslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthgk trwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatmetsif tteyqHHHHHH
128	ACP42 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSggggsggggsggggselcdddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrri ksgslymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqp vdqaslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmt

		hgktrwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatm etsiftteyqgggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKG LPGSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcl eeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitf cqsiistltHHHHHH
129	ACP43 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggg gsggggsggggsggggselcdddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksg slymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdq aslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthgk trwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatmetsif tteyqgggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSHHHHHH
130	ACP44 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggg gsggggsggggsggggselcdddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksg slymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdq aslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthgk trwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatmetsif tteyqSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS QGTLVTVSSHHHHHH
131	ACP45 Proteína	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF

	de fusão de IL-2	TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVR GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTF GGGTKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAG MKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatel khlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefl nrwitfcqsiistltHHHHHH
132	ACP46 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggg gsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQG TTVTVSSsggpgpagmkglpgsDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKg gggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTV SSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR IFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTV SSHHHHHH
133	ACP47 Proteína	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS

	de fusão de IL-2	RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
134	ACP48 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
135	ACP49 Proteína de fusão	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggg

	de IL-2	gsgggsgggsgggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGT KVEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSHHHHHH
136	ACP92 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknp kltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgs ettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLV ESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
137	ACP93 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA

		ASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTF GGGTKVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilngi nnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvi vlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
138	ACP94 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFG GGTKVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilngin nyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivl elkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
139	ACP95 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL

		VTVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkg settfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
140	ACP96 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkl trmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgset tfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
141	ACP97 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGR FTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkg settfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
142	ACP99 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltf kfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmce

		yadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
143	ACP100 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltf kfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmce yadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
144	ACP101 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
145	ACP102 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkl trmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgset tfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsgggg sggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT LAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA

		SQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHH HHHH
146	ACP103 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsgggsgggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHHHHH
147	ACP104 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWV

		AAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQK PGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
148	ACP105 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGG TKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKG LPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcl eeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitf cqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAE SVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSLS LSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIY WGQGTQVTVSSHHHHHH
149	ACP106 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPD

		TVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWD ALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSAS FRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTY PYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsSGGP GPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfymp kkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
150	ACP107 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGG TKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkkt qlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaq sknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltggggsgg ggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVM AWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKN TVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHH HHH
151	ACP108 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltf kfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmce

		yadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSrgetgpaaPGSE VQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgggg sggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTK VEIKHHHHHH
152	ACP117 Anti-FN CGS-2 scFv	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVGAFRPYRKHE WGQGTLVTVSRggggsggggsggggsSSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDR FSGSSSGNTASLTTTGAQAEDEADYYCNSSPFEHNLVVFGG GTKLTVLHHHHHHEPEA
153	ACP118 NARA1 Vh/Vl não-clivável	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGY AFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFDV WGAGTTVTVSSggggsggggsggggsDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESG IPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFG GGTKLEIKHHHHHHEPEA
154	ACP119 NARA1 Vh/Vl clivável	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGY AFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFDV WGAGTTVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSDIVLTQSPASLAVSL

		GQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS NLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNED PYTFGGGTKLEIKHHHHHHHEPEA
155	ACP120 NARA1 Vl/Vh não-clivável	mdmrvpaqllgllllwlrgarcDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQS VDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKg gggsggggsggggsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFT NYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTA DKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFDVWG AGTTVTVSSHHHHHHEPEA
156	ACP121 NARA1 Vl/Vh clivável	mdmrvpaqllgllllwlrgarcDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQS VDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGS GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKS GGPGPAGMKGLPGSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASG YAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFD VWGAGTTVTVSSHHHHHHEPEA
157	ACP124 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG RDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
158	ACP132 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsggggsdahksevahrfkdlgeenfk alvliafaqylqqcpfedhvklvnevtefaktcvadesaencdkslhtlfgdklctvatlret ygemadccakqepernecflqhkddnpnlprlvrpevdvmctafhdneetflkkylye iarrhpyfyapellffakrykaafteccqaadkaacllpkldelrdegkassakqrlkcasl

		qkfgerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdllecaddradlakyi cenqdsissklkeccekpllekshciaevendempadlpslaadfveskdvcknyae akdvflgmflyeyarrhpdysvvlllrlaktyettlekccaaadphecyakvfdefkplvee pqnlikqncelfeqlgeykfqnallvrytkkvpqvstptlvevsrnlgkvgskcckhpeak rmpcaedylsvvlnqlcvlhektpvsdrvtkccteslvnrrpcfsalevdetyvpkefnae tftfhadictlsekerqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekcckaddket cfaeegkklvaasqaalglHHHHHHEPEA
159	ACP141 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsggggsdahksevahrfkdlgeenfk alvliafaqylqqcpfedhvklvnevtefaktcvadesaencdkslhtlfgdklctvatlret ygemadccakqepernecflqhkddnpnlprlvrpevdvmctafhdneetflkkylye iarrhpyfyapellffakrykaafteccqaadkaacllpkldelrdegkassakqrlkcasl qkfgerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdllecaddradlakyi cenqdsissklkeccekpllekshciaevendempadlpslaadfveskdvcknyae akdvflgmflyeyarrhpdysvvlllrlaktyettlekccaaadphecyakvfdefkplvee pqnlikqncelfeqlgeykfqnallvrytkkvpqvstptlvevsrnlgkvgskcckhpeak rmpcaedylsvvlnqlcvlhektpvsdrvtkccteslvnrrpcfsalevdetyvpkefnae tftfhadictlsekerqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekcckaddket cfaeegkklvaasqaalglHHHHHHEPEA
160	ACP142 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSdahksevahrfkdlg eenfkalvliafaqylqqcpfedhvklvnevtefaktcvadesaencdkslhtlfgdklctv atlretygemadccakqepernecflqhkddnpnlprlvrpevdvmctafhdneetflk kylyeiarrhpyfyapellffakrykaafteccqaadkaacllpkldelrdegkassakqrl kcaslqkfgerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdllecaddrad lakyicenqdsissklkeccekpllekshciaevendempadlpslaadfveskdvck nyaeakdvflgmflyeyarrhpdysvvlllrlaktyettlekccaaadphecyakvfdefk

		plveepqnlikqncelfeqlgeykfqnallvrytkkvpqvstptlvevsrnlgkvgskcckh peakrmpcaedylsvvlnqlcvlhektpvsdrvtkccteslvnrrpcfsalevdetyvpk efnaetftfhadictlsekerqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekccka ddketcfaeegkklvaasqaalglHHHHHHEPEA
161	ACP144 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggs ggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTV RGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDAL DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFR YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPY TFGGGTKVEIKggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSL SLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYA DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCNRNFDRI YWGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
162	ACP145 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltr mltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettf mceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsgg

		ggsgggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPD TVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWD ALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSAS FRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTY PYTFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
163	ACP146 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkg settfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggg gsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTY SPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSN WDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIY SASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
164	ACP133 IL-2-6xHis ("6xHis" divulgado como	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfeqsiistltHHHHHH

	SEQ ID NO: 205)	
165	ACP147 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggs ggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTV RGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDAL DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFR YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPY TFGGGTKVEIKggggsggggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSL RLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDY WGKGTQVTVSSHHHHHHEPEA
166	ACP148 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltf kfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmce yadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggs ggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTV

		RGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDAL DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFR YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPY TFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
167	ACP149 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASG RIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVT VSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkl trmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgset tfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsgggg sggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTY SPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSN WDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIY SASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY YTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
168	ACP33 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkd fgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqg clmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanv SGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG

		RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSHHHHHHEPEA
169	ACP131 IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarccdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkdfgfpqek vdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqgclmqqv gvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanvlgrlreek HHHHHHEPEA
170	ACP125 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkd fgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqg clmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanv lgrlreekHHHHHHEPEA
171	ACP126 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarccdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkdfgfpqek vdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqgclmqqv gvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanvlgrlreek SGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT LVTVSSHHHHHHEPEA
172	ACP127 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFS QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLF GDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN

		PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC KDALASGGPGPAGMKGLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrk dfgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlq gclmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssan vlgrlreekSGGPGPAGMKGLPGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFK GLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANC DKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQ HKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARR HPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEK ALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFA EITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATIS SKLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQE VCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATL EKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLG EYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLP EDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVER RPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTA LAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFST EGPNLVTRCKDALAHHHHHHEPEA
173	ACP128 Proteína de fusão de IFNa de camund	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFS QYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLF GDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSL PPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPEL LYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL

	ongo	TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC KDALASGGPGPAGMKGLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrk dfgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlq gclmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssan vlgrlreekHHHHHHEPEA
174	ACP129 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarccdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkdfgfpqek vdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqgclmqqv gvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanvlgrlreek SGGPGPAGMKGLPGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAF SQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTL FGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPS LPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPE LLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDL TKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCD KPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVE DYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTV DETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKP KATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC

		KDALAHHHHHHEPEA
175	ACP150 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASG FTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQ VTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQG TLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclk drkdfgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqln dlqgclmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralss sanvlgrlreekSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
176	ACP151 Proteína de fusão de IFNa de camundongo	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGScdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkd fgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqg clmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanv lgrlreekSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAE SVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSLS LSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYAD SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIY WGQGTQVTVSSHHHHHHEPEA
177	ACP152 Proteína	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF

	de fusão de IFNa de camundongo	TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggscdlpqthnlrnkraltllvqmrrlsplsclkdrkdfgfpqekvdaqqikkaqaipvlseltqqilniftskdssaawnttlldsfcndlhqqlndlqgclmqqvgvqefpltqedallavrkyfhritvylrekkhspcawevvraevwralsssanvlgrlreekggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
178	ACP153 (Conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpGPAGLYAQpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggssggpGPAGLYAQpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHEPEA
179	ACP154 (Conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpPGGPAGIGpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggssggpPGGPAGIGpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI

		SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGG TKVEIKHHHHHHHEPEA
180	ACP155 (Conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltsggpALFKSSFPpgsEVQLVESGGGLVQ PGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsgggg ssggpALFKSSFPpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGG TKVEIKHHHHHHHEPEA
181	ACP156 (Conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltsggpPLAQKLKSSpgsEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggg gssggpPLAQKLKSSpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWG QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGV

		PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGG GTKVEIKHHHHHHHEPEA
182	ACP157 (Conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfk fympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltsggpPGGPAGIGalfkssfpPLAQKLKSSpg sEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQA PGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgg ggsggggsggggsggggssggpPGGPAGIGalfkssfpPLAQKLKSSpgs EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAP GKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTN VGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHEPE A
183	Pró-fármaco de EGFR (G8) C1486	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQG GGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS GGGGKPLGLQARVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC ASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGT KLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGGG LVQPGGSLTLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAI NWASGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS*HHHHHH

184	Pró-fármaco não clivável de EGFR (G8) C1756	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQG GGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY YADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGG GLVQPGGSLTLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVA INWASGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS*HHHHHH
185	Fármaco Ativo de EGFR (G8) C1300	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA INWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCA ASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWASGSTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGYQINSGN YNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS*HHHHHH
186	Pró-fármaco de PSMA C1872	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQG GGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS GGGGKPLGLQARVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC ASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGT

		KLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF GNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGGG* *LVQPGGSLTLSCAASRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTI* *NPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY* *YCDSYGYRGQGTQVTVSS*HHHHHH
187	Pró-fármaco não clivável de PSMA C1873	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQG GGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY YADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGG* *GLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVST* *INPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY* *YCDSYGYRGQGTQVTVSS*HHHHHH
188	Fármaco Ativo de PSMA C1875	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA INWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRD DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCA* *ASRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVK* *GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRGQGT*

		*QVTVSS*HHHHHH
189	GFP TriTAC C646	*QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQA PGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFEYWGQGTQVTVSS*GGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGG TKLTVLHHHHHH
190	TriTAC não mascarado/não clivável C1874	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGVVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL TLSCAASRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYA ESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRG QGTQVTVSSHHHHHH
191	Bloqueador 2	mdmrvpaqllglllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI

	(Bloqueador de IL2)	SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSggggsggggsggggsDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
192	Bloqueador 12 (bloqueador de IL-12)	mdmrvpaqllglllwlrgarcQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYYNDQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDRYTHPALLFGTGTKVTVLggggsggggsggggsQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKTHGSHDNWGQGTMVTVSSHHHHHH

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00315] Todas as divulgações de todas as publicações de patentes e não patentes citadas neste documento são, cada uma, incorporadas por referência em suas totalidades para todos os fins.

OUTRAS MODALIDADES

[00316] A divulgação exposta acima pode abranger múltiplas invenções distintas com utilidade independente. Embora cada uma destas invenções tenha sido divulgada na(s) sua(s) forma(s) preferida(s), as suas concretizações específicas como descritas e ilustradas aqui não devem ser consideradas num sentido limitativo, porque são possíveis numerosas variações. O assunto das invenções inclui todas as combinações e subcombinações novas e não óbvias dos vários elementos, características, funções e/ou propriedades descritas neste documento. As reivindicações a seguir destacam particularmente certas combinações e subcombinações consideradas como novas e não óbvias. As invenções incorporadas em outras combinações e subcombinações de recursos, funções, elementos e/ou propriedades podem ser reivindicadas neste pedido,

em pedidos que reivindicam prioridade desse pedido ou em pedidos relacionados. Tais reivindicações, quer sejam voltadas para uma invenção diferente ou para a mesma invenção, e se de um escopo mais amplo, mais restrito, igual ou diferente em comparação com as reivindicações originais, também são consideradas como incluídas dentro do assunto das invenções da presente descrição.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de fusão, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos cada um de:

a) um polipeptídeo de citocina [A];

b) uma fração de bloqueio de citocina [D]; e

c) um ligante polipeptídico clivável por protease [L];

em que o polipeptídeo de citocina e a fração de bloqueio de citocina estão operacionalmente ligados pelo ligante polipeptídico clivável por protease e o polipeptídeo de fusão tem atividade de ativação do receptor de citocina atenuada, em que a atividade de ativação do receptor de citocina do polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca 10X menor que a atividade de ativação do receptor de citocina do polipeptídeo que contém o polipeptídeo de citocina que é produzido por clivagem do ligante clivável por protease.

2. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de citocina é selecionado do grupo que consiste em IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, TGFβ, IFNα, IFNβ, IFNγ, TNF, TGFbeta, CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21 e fragmentos ativos destes.

3. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de citocina é um polipeptídeo de citocina de meia-vida curta.

4. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo do ligante clivável por protease compreende, independentemente, uma sequência que é capaz de ser clivada por uma protease selecionada do grupo que consiste em uma calicreína, trombina, quimase, carboxipeptidase A, catepsina G, catepsina L, uma elastase, PR-3, granzima M, uma calpaína, uma metaloproteinase de matriz (MMP), um ADAM, um FAP, uma catepsina L, um ativador de plasminogênio, uma catepsina, uma caspase, uma triptase e um protease de superfície de células tumorais.

5. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo clivável por protease compreende, independentemente, dois ou mais sítios de clivagem para a mesma protease, ou dois ou mais sítios de clivagem que são clivados por diferentes proteases ou pelo menos um dos polipeptídeos cliváveis por protease compreende um sítio de clivagem para duas ou mais proteases diferentes.

6. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de citocina também é um elemento de prolongamento da meia-vida.

7. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de citocina bloqueia estericamente a atividade agonista da citocina.

8. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de citocina é albumina sérica humana, uma proteína de ligação ao antígeno ou um polipeptídeo de ligação ao antígeno que se liga à albumina sérica humana ou a um fragmento desta.

9. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a citocina está livre para se dissociar da fração de bloqueio de citocina após o ligante de polipeptídeo clivável por protease ser clivado por uma protease.

10. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de citocina inibe o polipeptídeo de citocina de ativar seu receptor cognato.

11. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão se liga ao receptor cognato do polipeptídeo de citocina antes da clivagem do ligante clivável por protease.

12. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda pelo menos um elemento de prolongamento da meia-vida.

13. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de citocina se associa não covalentemente ao polipeptídeo de citocina, independentemente da ligação peptídica do ligante.

14. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que a associação não covalente é dependente do pH.

15. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida inibe estericamente ou bloqueia a ativação e/ou ligação do polipeptídeo de citocina ao seu receptor cognato.

16. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida é albumina sérica humana, uma IgG humana, uma IgG humanizada, um scFv, um Fab, um sdAb ou um fragmento destes.

17. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de citocina compreende um domínio de ligação ao ligante, um anticorpo de domínio único ou scFv que se liga ao polipeptídeo de citocina, ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo selecionado entre um anticorpo de domínio único e um scFv que se liga a um receptor do polipeptídeo de citocina.

18. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, **caracterizado** pelo fato de que a atividade de ativação do receptor de citocina é determinada usando um ensaio de ativação do receptor *in vitro* padrão e quantidades iguais em uma base molar do polipeptídeo de citocina e da proteína de fusão.

19. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 18, **caracterizado** pelo fato de que a citocina perde contato com a fração de bloqueio de citocina e/ou elemento de prolongamento da meia-vida após a sequência clivável por protease ser clivada por uma protease.

20. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreendendo pelo menos cada um entre [A], [D] e [L], em qualquer uma das seguintes orientações:

a) [A]-[L]-[D];

b) [D]-[L]-[A];

c) [D]-[L]-[A]-[L]-[D]-[L]-[A];

d) [A]-[L]-[D]-[L]-[A]-[L]-[D];

e) [D]-[L]-[A]-[L]-[D];

f) [D]-[L]-[A]-[L]-[A]-[L]-[D];

g) [D]-[L]-[A]-[L]-[D]-[L]-[A]-[L]-[D]; e

h) [D]-[L]-[A]-[A]-[L]-[D].

21. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende dois peptídeos de citocina.

22. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1, que tem a Fórmula:

[A]-[L1]-[D]-[L2]-[A]-[L2]-[D]

caracterizado pelo fato de que

A é um polipeptídeo de citocina;

L1 e L2 são, independentemente, ligantes polipeptídicos cliváveis por protease;

D é uma fração de bloqueio de citocina opcionalmente capaz de prolongar a meia-vida sérica; e

em que L1 é um substrato para uma primeira protease e em que L2 é um substrato para uma segunda protease.

23. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida é um elemento de prolongamento da meia-vida, dois elementos de prolongamento da meia-vida ou três elementos de prolongamento da meia-vida.

24. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ligante clivável por protease, dois ligantes cliváveis por protease, três ligantes cliváveis por protease, quatro ligantes cliváveis por protease, cinco ligantes cliváveis por protease, seis ligantes cliváveis por protease ou sete ligantes cliváveis por protease.

25. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um peptídeo de ligação ao antígeno específico de tumor.

26. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação ao antígeno específico do tumor está operacionalmente ligado ao polipeptídeo de citocina por um ligante não clivável.

27. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação ao antígeno específico do tumor está operacionalmente ligado ao polipeptídeo de citocina por um ligante clivável.

28. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de citocina tem uma meia-vida sérica comparável à citocina de ocorrência natural correspondente.

29. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que a meia-vida sérica do polipeptídeo que contém o polipeptídeo de citocina que é produzido por clivagem da proteína de fusão é comparável à citocina de ocorrência natural correspondente.

30. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de citocina é uma muteína que tem uma meia-vida sérica curta e é rapidamente depurada após a clivagem do polipeptídeo de fusão.

31. Polipeptídeo de fusão, **caracterizado** pelo fato de que compreende pelo menos cada um de:

a) um polipeptídeo de interferon [A];

b) uma fração de bloqueio de interferon [D]; e

c) um ligante polipeptídico clivável por protease [L]; e

em que o polipeptídeo de interferon e a fração de bloqueio de interferon estão operacionalmente ligados pelo ligante polipeptídico clivável por protease e o polipeptídeo de fusão tem atividade de ativação do receptor de interferon atenuada, em que a atividade de ativação do receptor de interferon do polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca 10X menor que a atividade de ativação do receptor de interferon do polipeptídeo de interferon que é produzido por clivagem do ligante clivável por protease.

32. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 31, que tem a Fórmula:

[D]-[L1]-[A]-[L2]-[D];

caracterizado pelo fato de que

A é um polipeptídeo de interferon alfa (IFNα);

L1 e L2 são, independentemente, um ligante polipeptídico clivável por protease;

D é uma fração de bloqueio de IFNα que também prolonga a meia-vida in vivo; e

em que o polipeptídeo de interferon alfa e a fração de bloqueio de interferon alfa estão operacionalmente ligados pelo ligante polipeptídico clivável por protease, o polipeptídeo de fusão tem atividade de ativação do receptor de interferon alfa atenuada, em que a atividade de ativação do receptor de interferon alfa do polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca 10X menor do que a atividade de ativação do receptor de interferon do polipeptídeo de interferon alfa que é produzido pela clivagem do ligante clivável por protease, e em que quando ocorre a clivagem de ambos os ligantes, a meia-vida in vivo do polipeptídeo de

interferon alfa é substancialmente semelhante à do interferon alfa de ocorrência natural.

33. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 31, que tem a Fórmula:

[D]-[L1]-[A]-[L2]-[D]-[L3]-[A]-[L4]-[D];

caracterizado pelo fato de que

A é um polipeptídeo de interferon gama (IFNγ);

L1, L2, L3 e L4 são, independentemente, ligantes polipeptídicos cliváveis por protease;

D é uma fração de bloqueio de IFNγ capaz de prolongar a meia-vida sérica; e

em que o polipeptídeo de interferon gama e a fração de bloqueio de interferon gama estão operacionalmente ligados pelo ligante polipeptídico clivável por protease, o polipeptídeo de fusão tem atividade de ativação do receptor de interferon gama atenuada, em que a atividade de ativação do receptor de interferon gama do polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca 10X menor do que a atividade de ativação do receptor de interferon do polipeptídeo de interferon gama que é produzido pela clivagem do ligante clivável por protease, e em que quando ocorre a clivagem de ambos os ligantes, a meia-vida in vivo do polipeptídeo de interferon gama é substancialmente semelhante à do interferon gama de ocorrência natural.

34. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 33, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo do ligante clivável por protease compreende uma sequência que é capaz de ser clivada por uma protease selecionada do grupo que consiste em uma calicreína, trombina, quimase, carboxipeptidase A, catepsina G, catepsina L, uma elastase, PR-3, granzima M, uma calpaína, uma metaloproteinase de matriz (MMP), um ADAM, um FAP, uma catepsina L, um ativador de plasminogênio, uma catepsina, uma caspase, uma triptase e um protease de superfície de células

tumorais.

35. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que cada polipeptídeo clivável por protease compreende, independentemente, dois ou mais sítios de clivagem para a mesma protease, ou dois ou mais sítios de clivagem que são clivados por diferentes proteases ou pelo menos um dos polipeptídeos cliváveis por protease compreende um sítio de clivagem para duas ou mais proteases diferentes.

36. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que o interferon é interferon alfa ou interferon gama.

37. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 31, que tem a Fórmula:

[A]-[L1]-[D]-[L2]-[A]-[L2]-[D]

caracterizado pelo fato de que

A é um polipeptídeo de interferon;

L1 e L2 são, independentemente, ligantes polipeptídicos cliváveis por protease;

D é uma fração de bloqueio de interferon capaz de prolongar a meia-vida sérica; e

em que L1 é um substrato para uma primeira protease e em que L2 é um substrato para uma segunda protease.

38. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 37, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de interferon também é um elemento de prolongamento da meia-vida.

39. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 37, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de interferon bloqueia estericamente a atividade agonista da citocina.

40. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 38 ou 39, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de interferon é albumina sérica humana, ou um polipeptídeo de ligação ao antígeno que se liga à albumina sérica humana.

41. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 40, **caracterizado** pelo fato de que o interferon está livre para se dissociar da fração de bloqueio de interferon após o ligante polipeptídico clivável por protease ser clivado por uma protease.

42. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 41, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de interferon inibe o polipeptídeo de interferon de ativar seu receptor cognato.

43. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 42, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão se liga ao receptor cognato para o polipeptídeo de interferon antes da clivagem do ligante clivável por protease.

44. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 43, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda pelo menos um elemento de prolongamento da meia-vida.

45. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 44, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de interferon se associa não covalentemente ao polipeptídeo de interferon.

46. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 44, **caracterizado** pelo fato de que a associação não covalente é dependente de pH.

47. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida inibe estericamente ou bloqueia a ativação e/ou ligação do polipeptídeo de interferon ao seu receptor cognato.

48. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida é albumina sérica humana, uma IgG humana ou um fragmento desta.

49. Polipeptídeo de fusão, de acordo com as reivindicações 44 a 48, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida não se liga ao polipeptídeo de interferon.

50. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de interferon compreende um domínio de ligação ao ligante ou fragmento de um receptor cognato para o interferon, um anticorpo de domínio único ou scFv que se liga ao polipeptídeo de interferon, ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, anticorpo de domínio único, scFv) que se liga a um receptor de interferon.

51. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 50, **caracterizado** pelo fato de que a atividade de ativação do receptor do interferon cognato é determinada usando um ensaio de ativação do receptor *in vitro* padrão e quantidades iguais em uma base molar do polipeptídeo de fusão e do polipeptídeo de interferon.

52. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 51, **caracterizado** pelo fato de que o interferon está livre para se dissociar da fração de bloqueio do interferon e/ou elemento de prolongamento da meia-vida após a sequência clivável por protease ser clivada por uma protease.

53. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 52, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão compreende pelo menos cada um de [A], [B] e [L], em qualquer uma das seguintes orientações:

a) [A]-[L]-[D];

b) [D]-[L]-[A];

c) [D]-[L]-[A]-[L]-[D]-[L]-[A];

d) [A]-[L]-[D]-[L]-[A]-[L]-[D];

e) [D]-[L]-[A]-[L]-[D];

f) [D]-[L]-[A]-[L]-[A]-[L]-[D];

g) [D]-[L]-[A]-[L]-[D]-[L]-[A]-[L]-[D]; e

h) [D]-[L]-[A]-[A]-[L]-[D].

54. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 53, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão

compreende dois peptídeos de citocina.

55. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado** pelo fato de que os dois polipeptídeos de citocina são dois peptídeos de citocina diferentes.

56. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um elemento de prolongamento da meia-vida é um elemento de prolongamento da meia-vida ou dois elementos de prolongamento da meia-vida.

57. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 56, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ligante polipeptídico clivável por protease é um ligante clivável por protease, dois ligantes cliváveis por protease, três ligantes cliváveis por protease, quatro ligantes cliváveis por protease, cinco ligantes cliváveis por protease, seis ligantes cliváveis por protease ou sete ligantes cliváveis por protease.

58. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 57, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um peptídeo de ligação ao antígeno específico do tumor.

59. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 58, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação ao antígeno específico do tumor está operacionalmente ligado ao polipeptídeo de interferon por um ligante não clivável.

60. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 58, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação ao antígeno específico do tumor está operacionalmente ligado ao polipeptídeo de interferon por um ligante clivável.

61. Ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que codifica o polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60.

62. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende o ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 61.

63. Célula hospedeira, **caracterizada** pelo fato de que compreende o

vetor, de acordo com a reivindicação 62, ou ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 61.

64. Método de preparação de uma composição farmacêutica, **caracterizado** pelo fato de que compreende a cultura da célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 63, em condições adequadas para expressão e coleta dos polipeptídeos desejados.

65. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende i) um polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, e ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

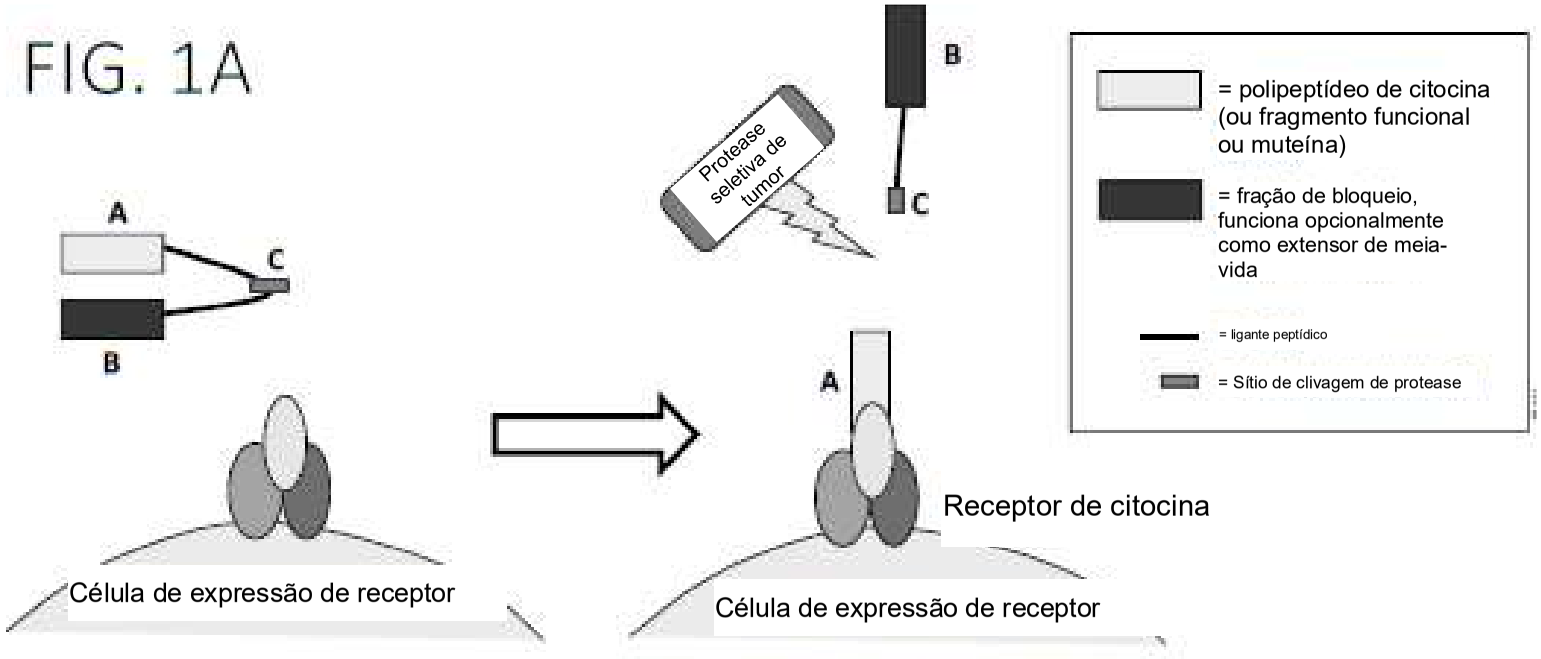
66. Método de tratamento de um tumor, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração, a um sujeito em necessidade, de uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60.

67. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, **caracterizado** pelo fato de que é para uso como medicamento.

68. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, **caracterizado** pelo fato de que é para uso no tratamento de um tumor em um sujeito em necessidade.

69. Composição farmacêutica para o tratamento de um tumor em um sujeito em necessidade, **caracterizada** pelo fato de que compreende como ingrediente ativo um polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60.

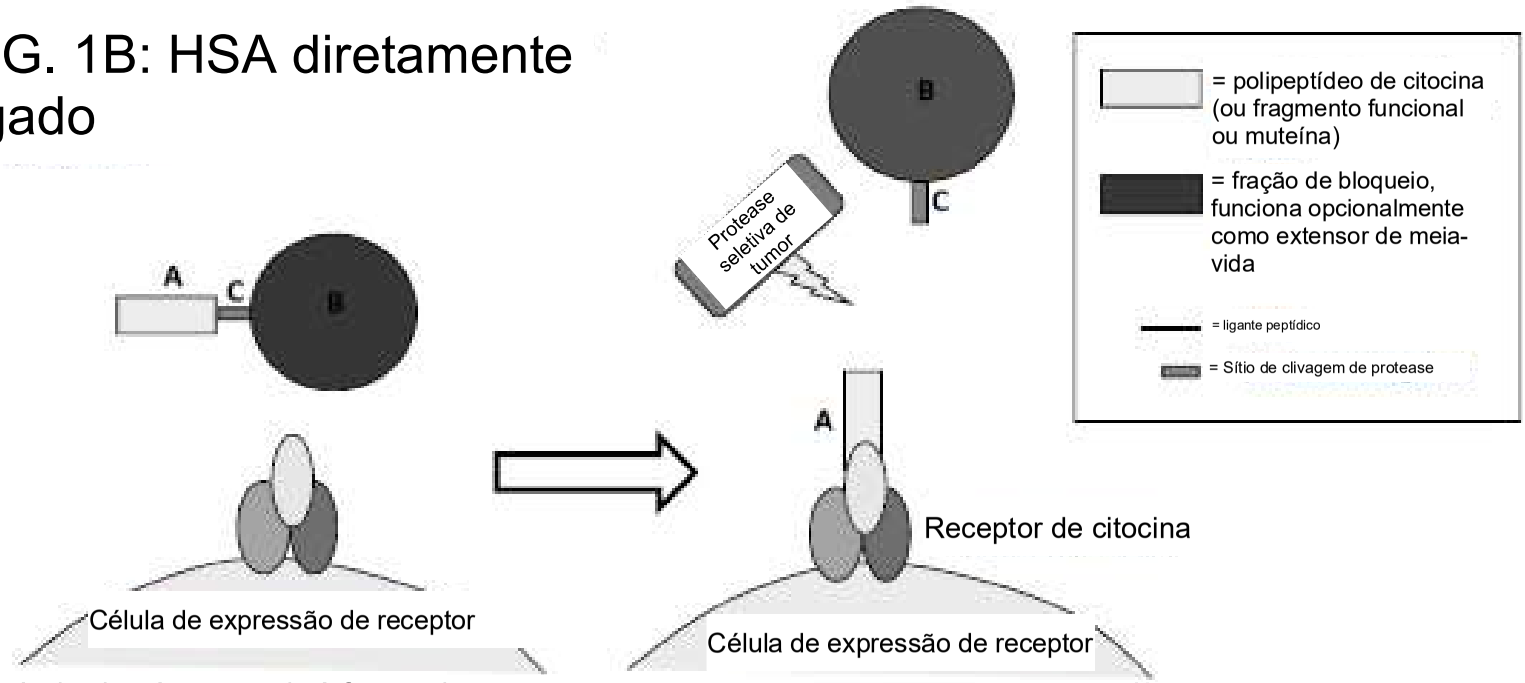
FIG. 1A



1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídico clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

2. Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina para ligar o receptor

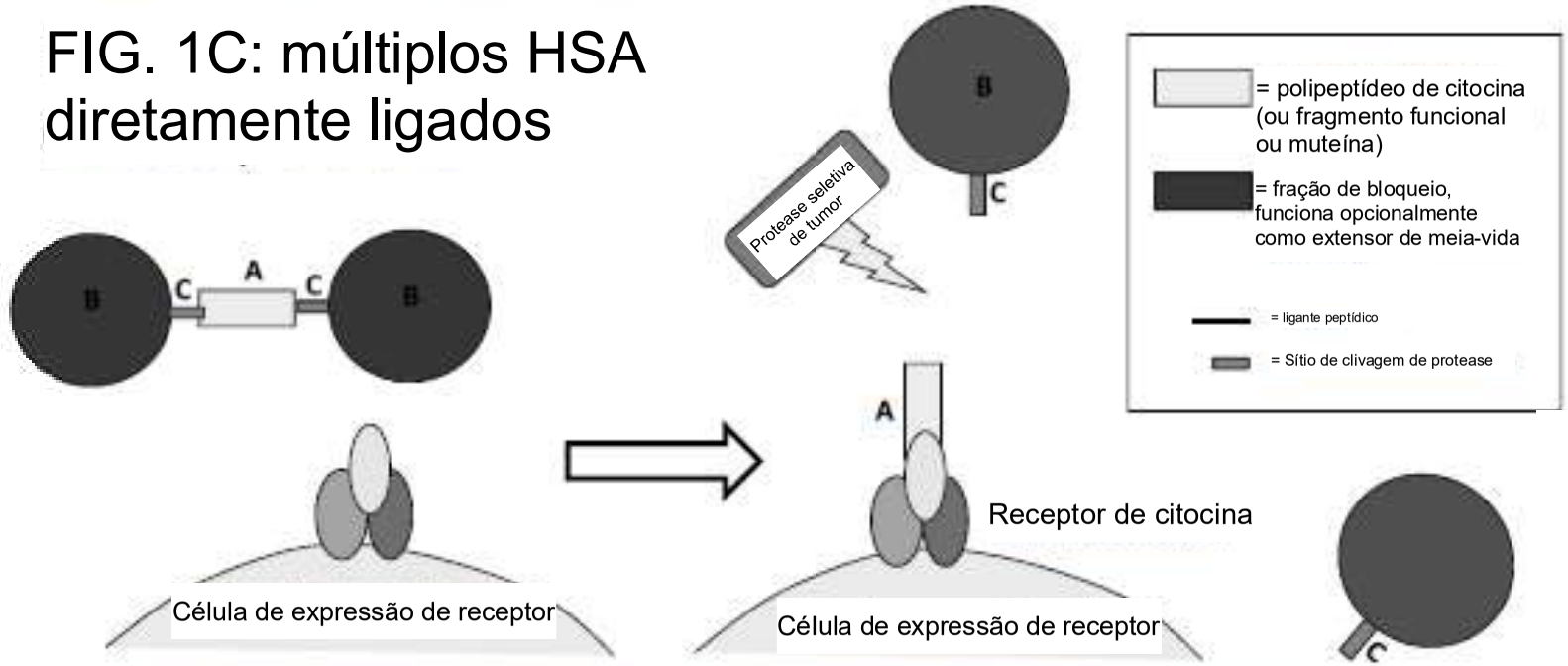
FIG. 1B: HSA diretamente ligado



1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídeo clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

2. Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina para ligar o receptor

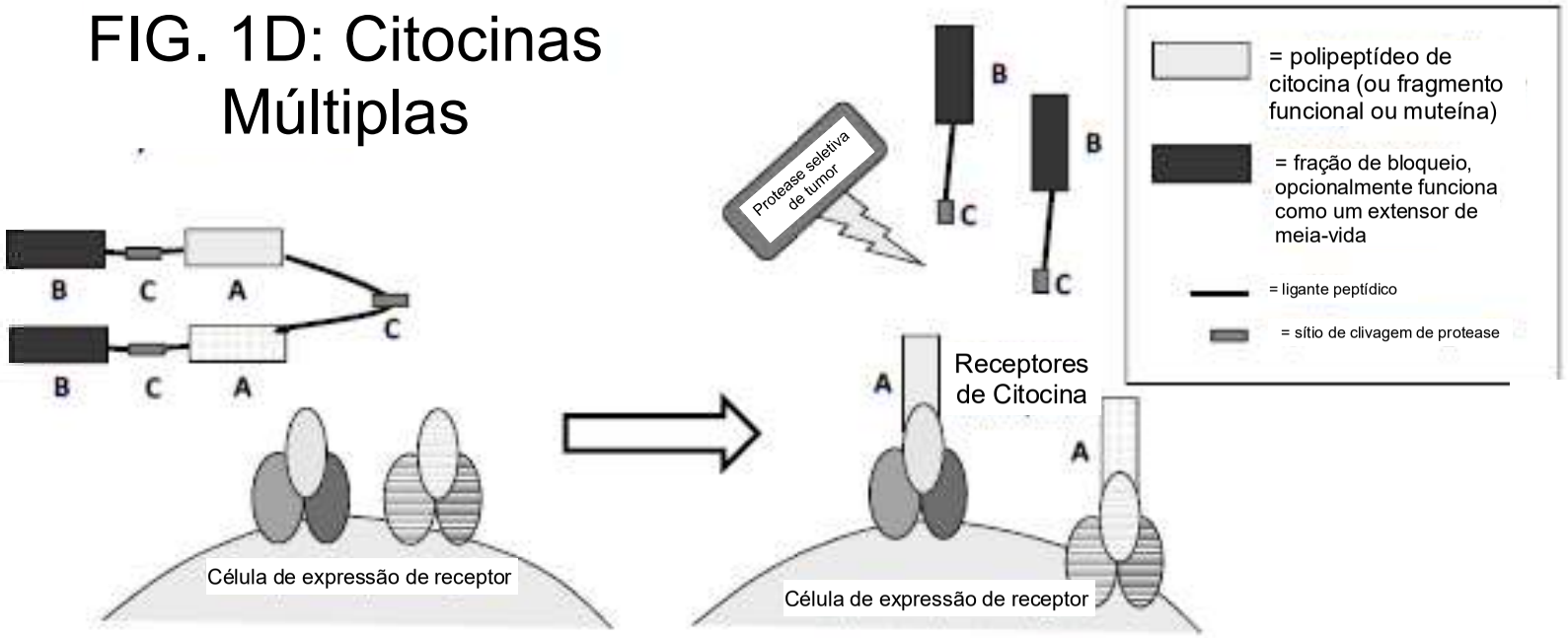
FIG. 1C: múltiplos HSA diretamente ligados



1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídico clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

2. Um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio ou ligante peptídico de clivagem de protease, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor. A citocina agora tem propriedades PK semelhantes comparadas à citocina nativa (por exemplo, meia-vida curta).

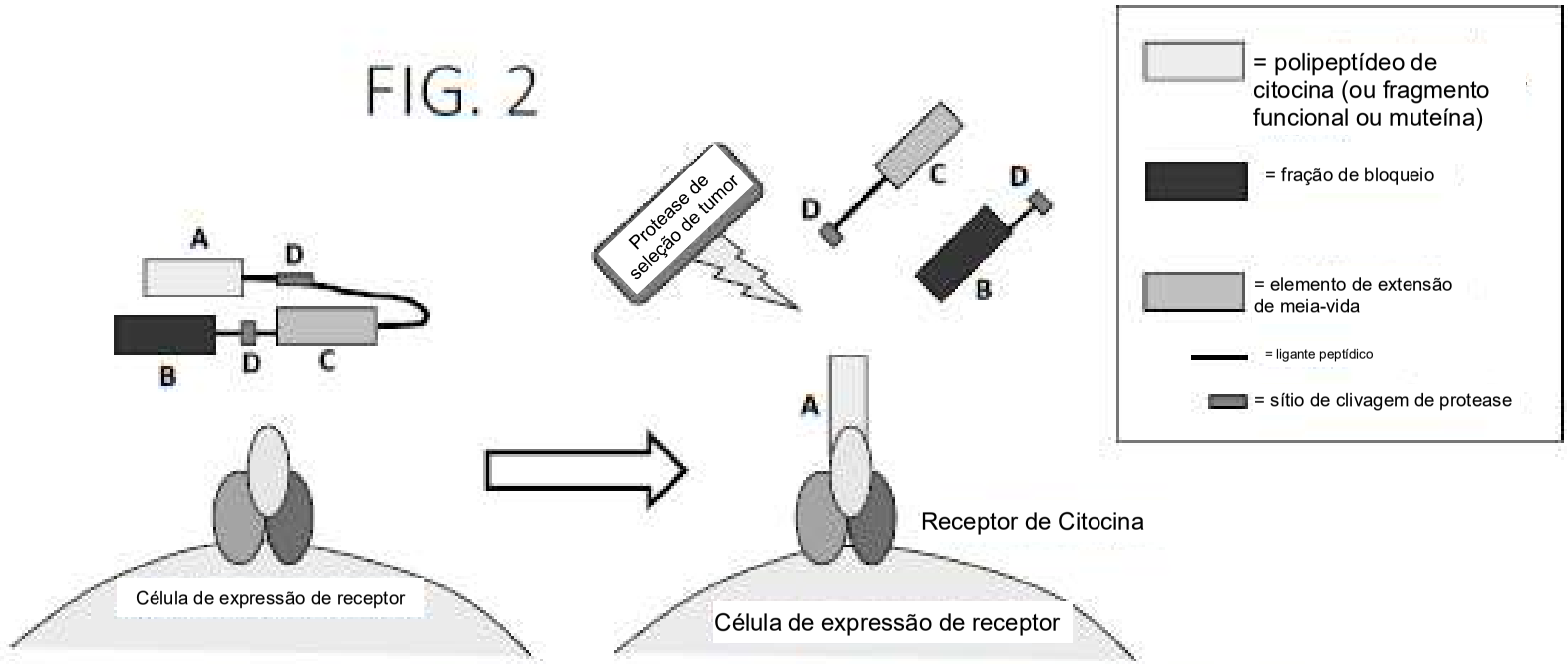
FIG. 1D: Citocinas Múltiplas



1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídico clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

2. Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio ou ligante peptídico de clivagem de protease, liberando a fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor.

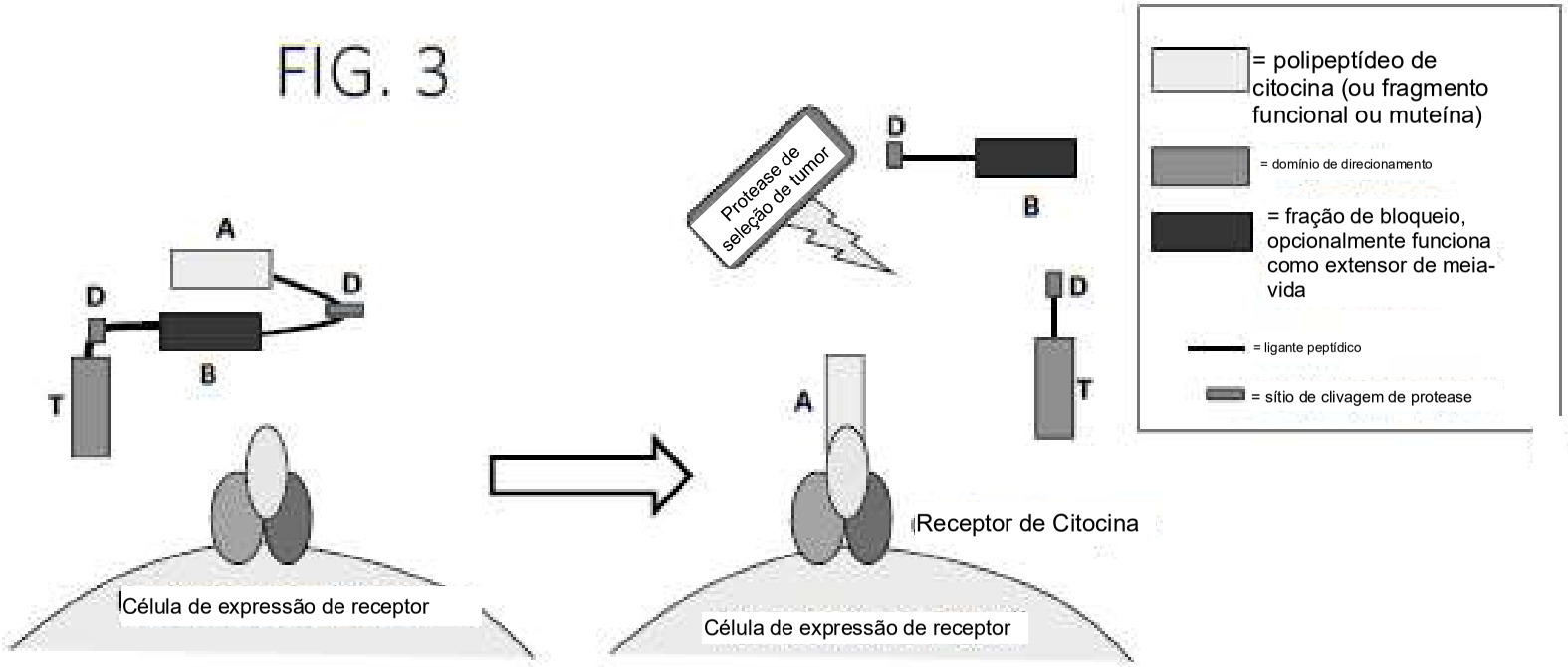
FIG. 2



1.A citocina é conectada à fração de bloqueio através do (s) ligante (s) peptídico (s) clivável (eis) por protease, assim bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor. Ela também está ligada a um elemento de extensão de meia-vida separado, que estende a meia-vida

2.Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando o elemento de extensão de meia-vida e fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor. A citocina agora tem propriedades pK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo (meia-vida curta)

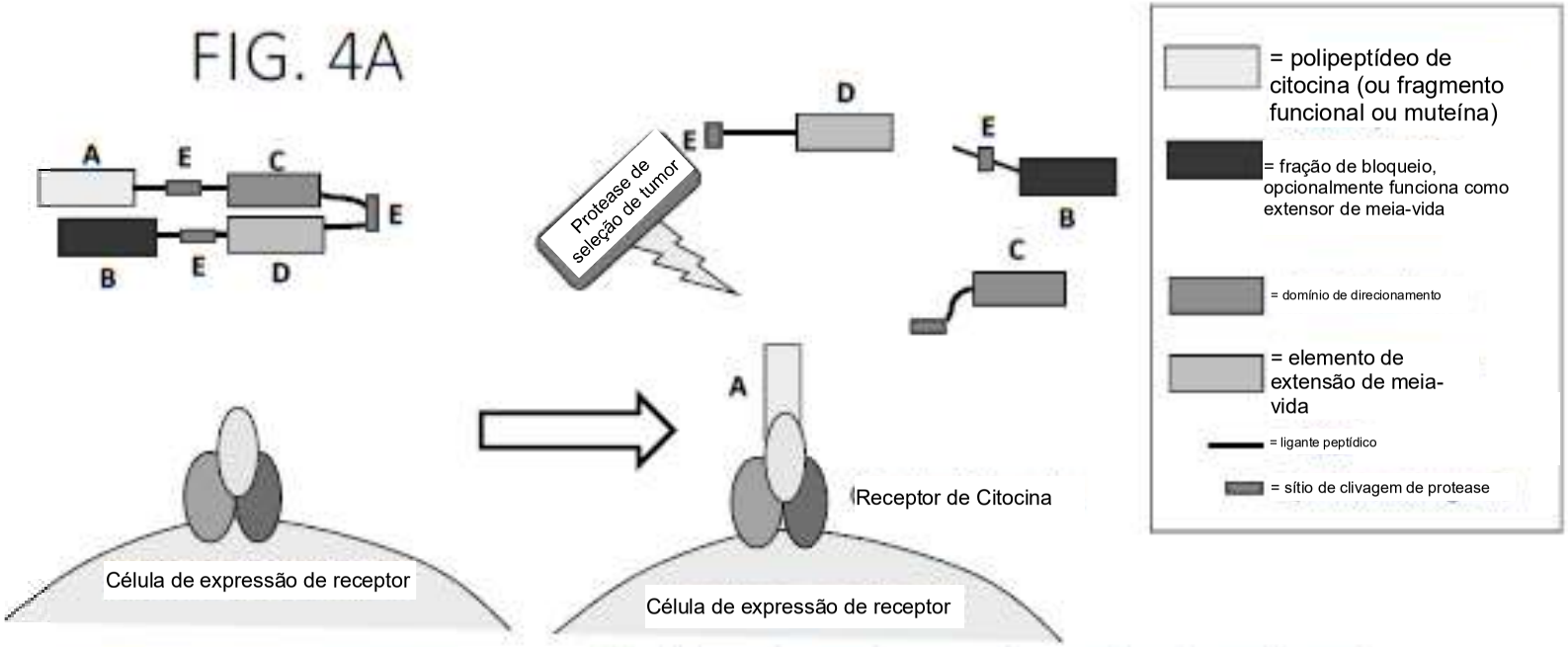
FIG. 3



1.A citocina é conectada à fração de bloqueio e ao domínio de direcionamento através do ligante peptídico clivável por protease, assim bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

2.Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio de clivagem de protease no ligante peptídico, liberando o domínio de direcionamento e fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor.

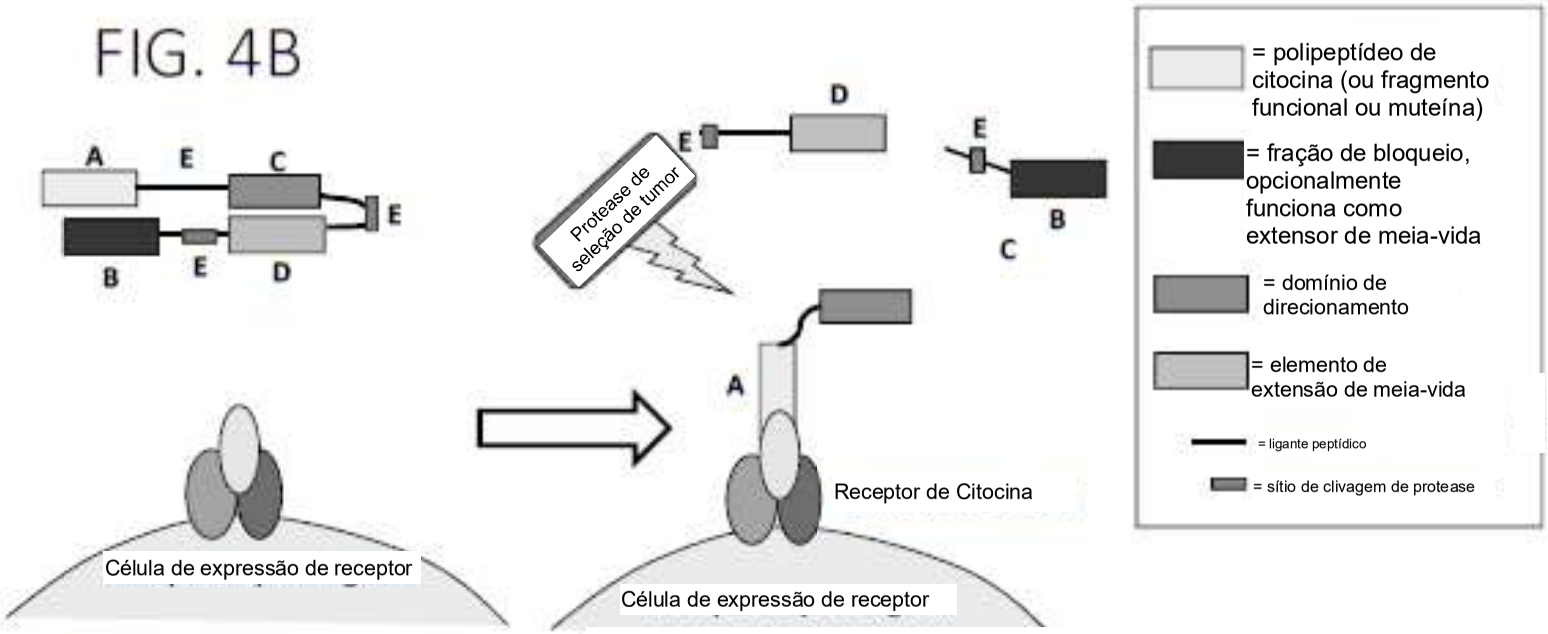
FIG. 4A



1.A citocina é conectada ao domínio de direcionamento, fração de bloqueio e ao elemento de extensão de meia-vida através do (s) ligante (s) peptídico (s) clivável (eis) por protease, assim bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

2.Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio de clivagem de protease no (s) ligante (s) peptídico (s), liberando o elemento de extensão de meia-vida, domínio de direcionamento, fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor. A citocina agora tem propriedade PK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo, meia-vida curta).

FIG. 4B



1.A citocina é conectada ao domínio de direcionamento, fração de bloqueio e ao elemento de extensão de meia-vida através do (s) ligante (s) peptídico (s) clivável (eis) por protease, assim bloqueando sua capacidade de se ligar

2.Em um ambiente inflamatório ou de tumor, a protease cliva no sítio de clivagem de protease no (s) ligante (s) peptídico (s), liberando o elemento de extensão de meia-vida e fração de bloqueio e permitindo que a citocina se ligue ao receptor. A porção de direcionamento permanece ligada, mantendo a citocina no microambiente tumoral. A citocina agora tem propriedades pK semelhantes em comparação com a citocina nativa (por exemplo, meia -vida curta).

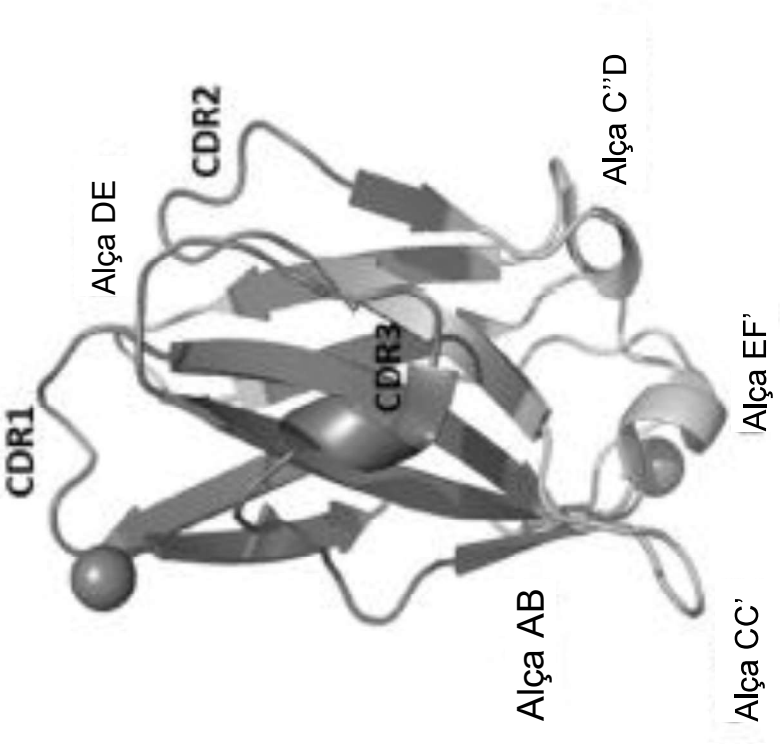


FIG. 5

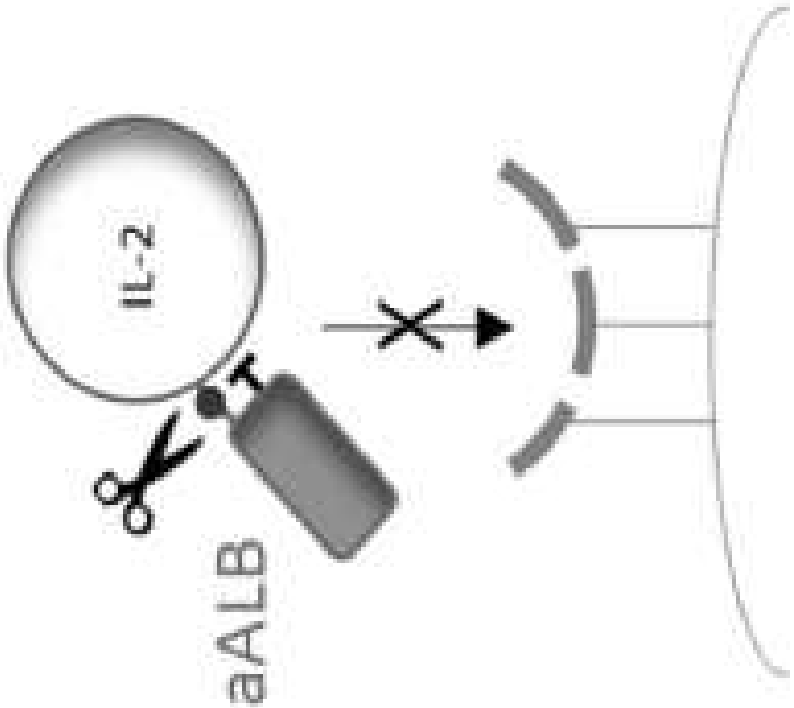


FIG. 6

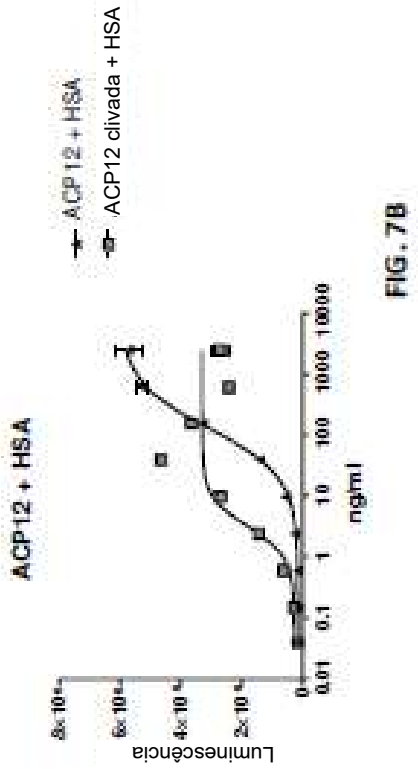


FIG. 7B

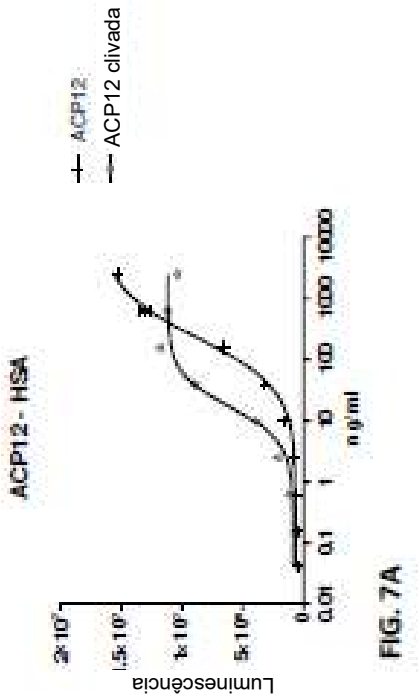


FIG. 7A

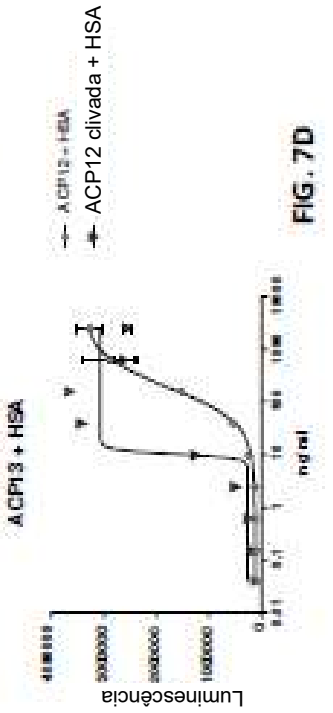


FIG. 7D

FIG. 7C

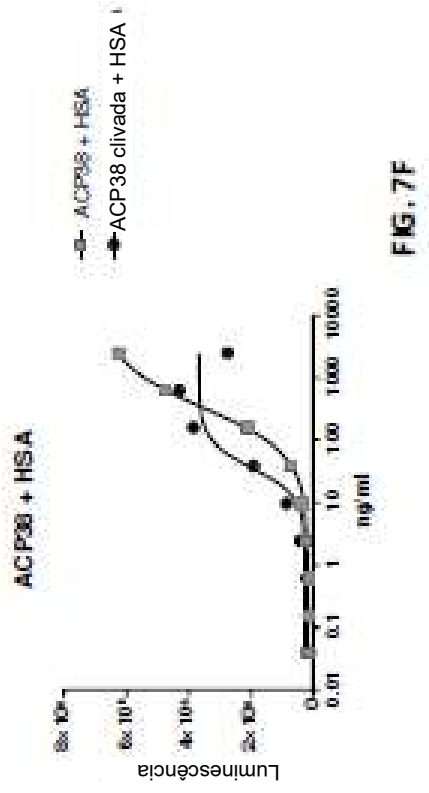


FIG. 7E

FIG. 7F

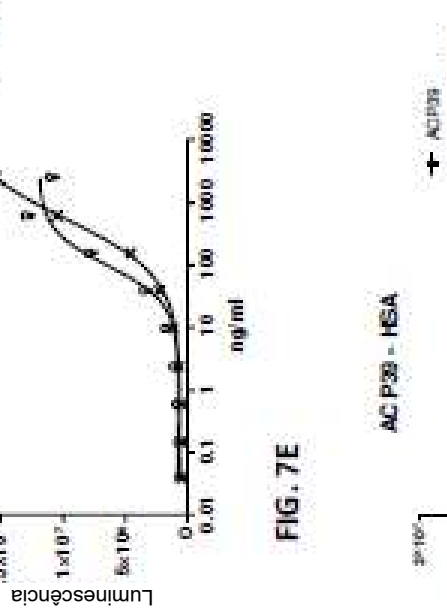


FIG. 7G

FIG. 7H

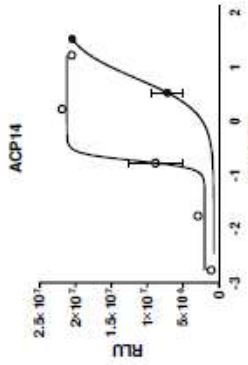
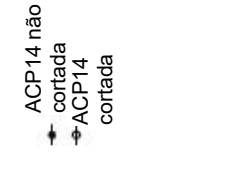


FIG. 8A



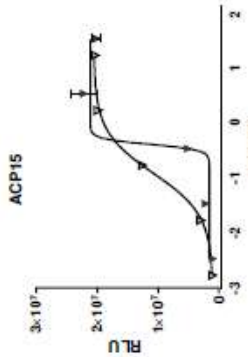


FIG. 8B



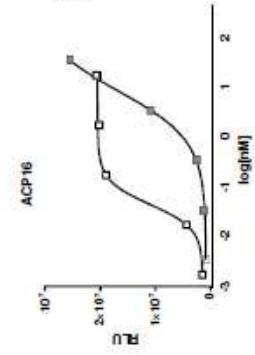


FIG. 8C



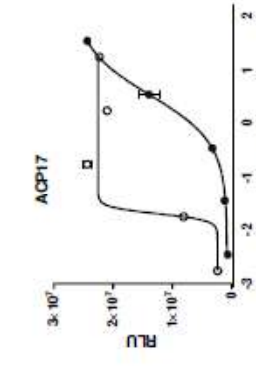
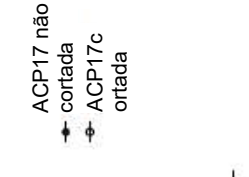


FIG. 8D



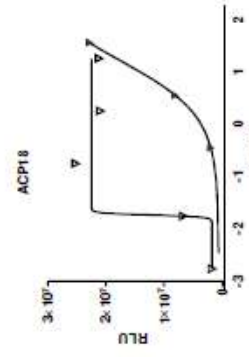


FIG. 8E



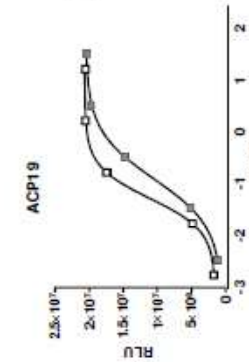


FIG. 8F



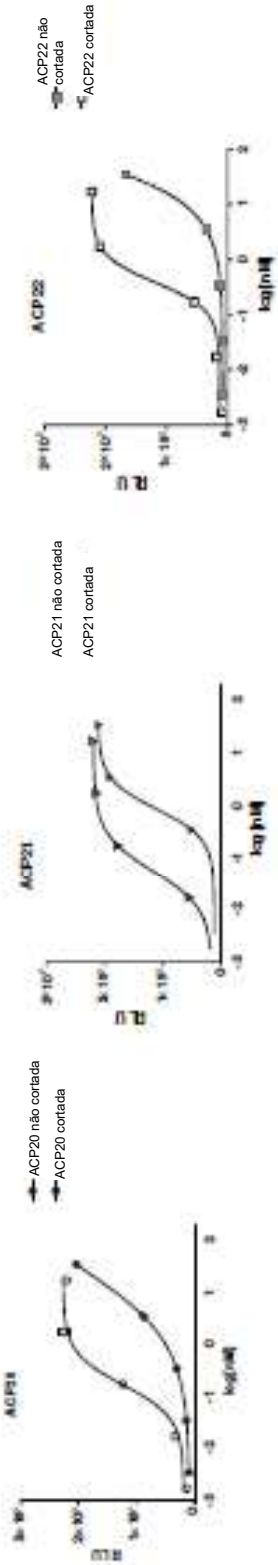


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

FIG. 9D

FIG. 9E

FIG. 9F

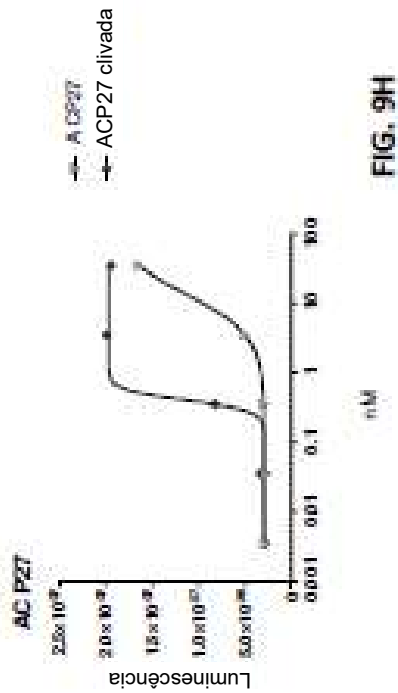


FIG. 9H

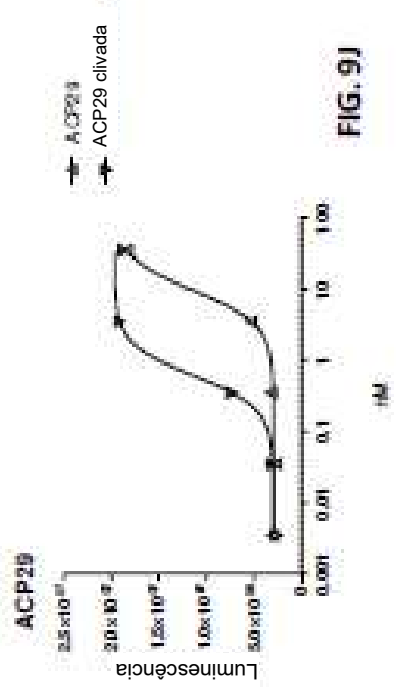


FIG. 9J

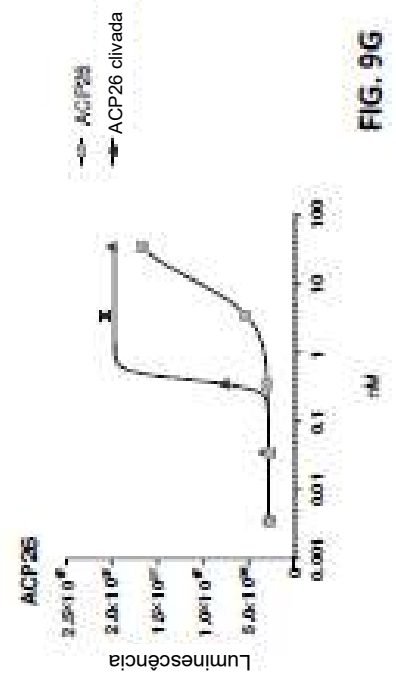


FIG. 9G

FIG. 9I



FIG. 9M

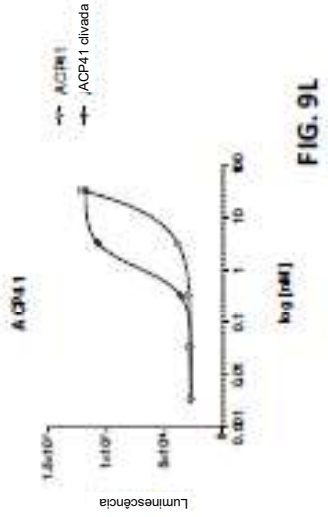


FIG. 9L

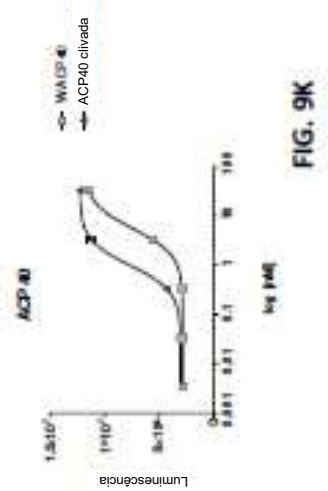


FIG. 9K

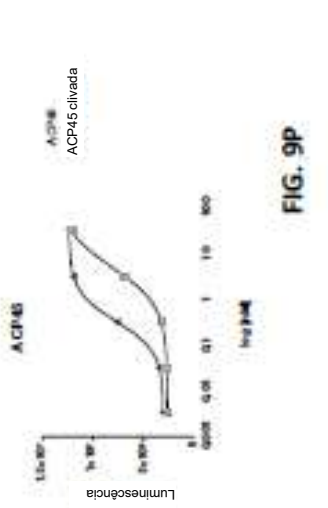


FIG. 9P

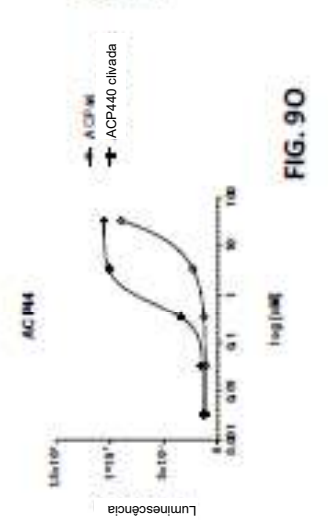


FIG. 9O

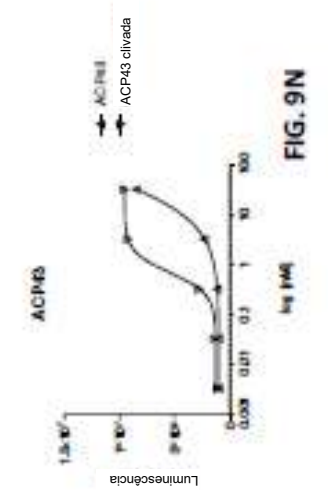


FIG. 9N

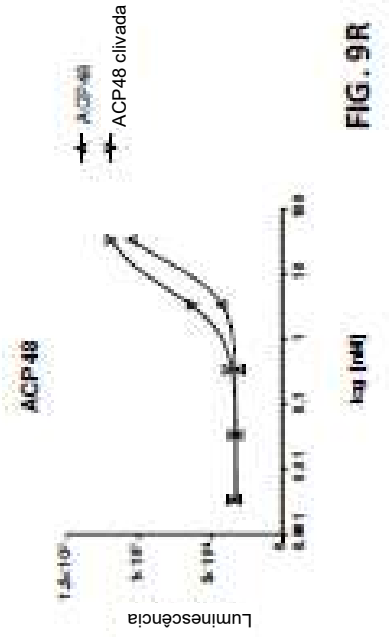


FIG. 9R

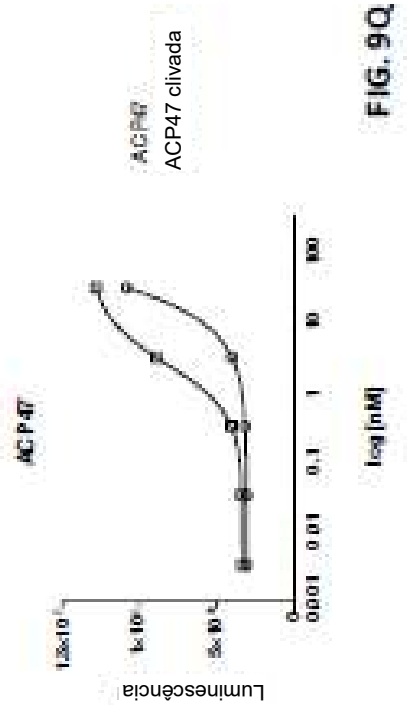


FIG. 9Q

FIG. 9S

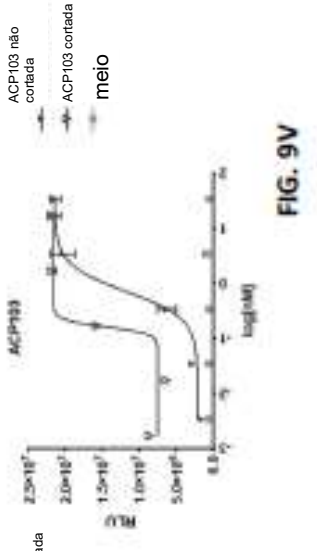


FIG. 9T

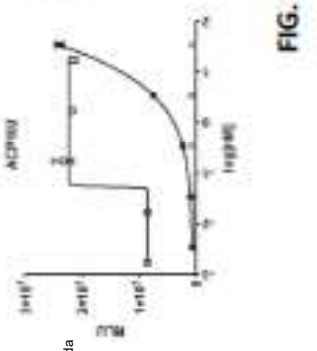


FIG. 9U

FIG. 9V

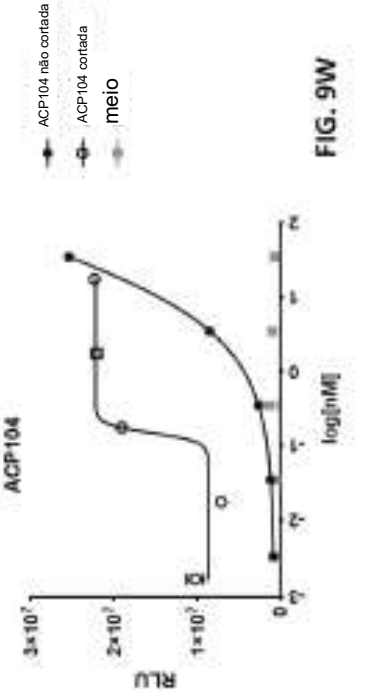


FIG. 9W

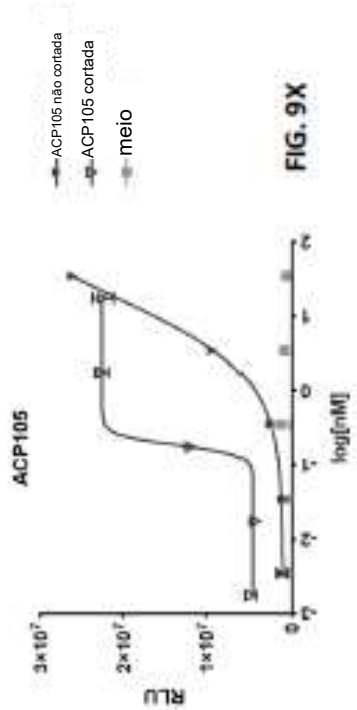


FIG. 9X

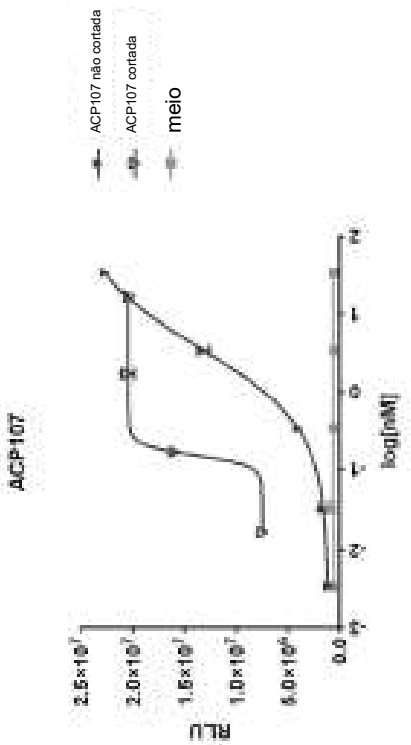

ACP107
ACP107 não cortada
ACP107 cortada
meio
RLU
log[nM]

FIG. 9Z

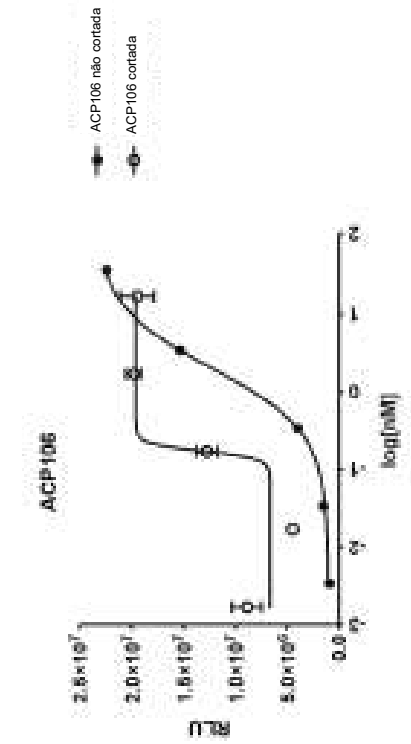

ACP106
ACP106 não cortada
ACP106 cortada
RLU
log[nM]

FIG. 9Y

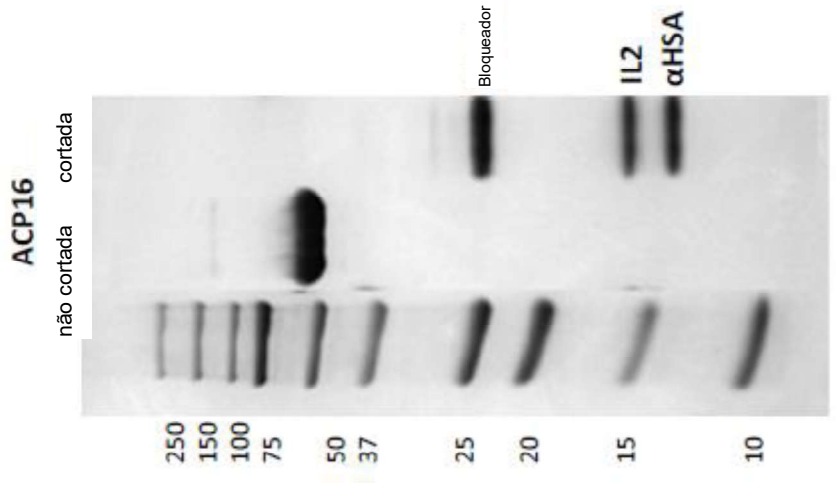

ACP16
não cortada
cortada
Bloqueador
IL2
αHSA
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

FIG. 10

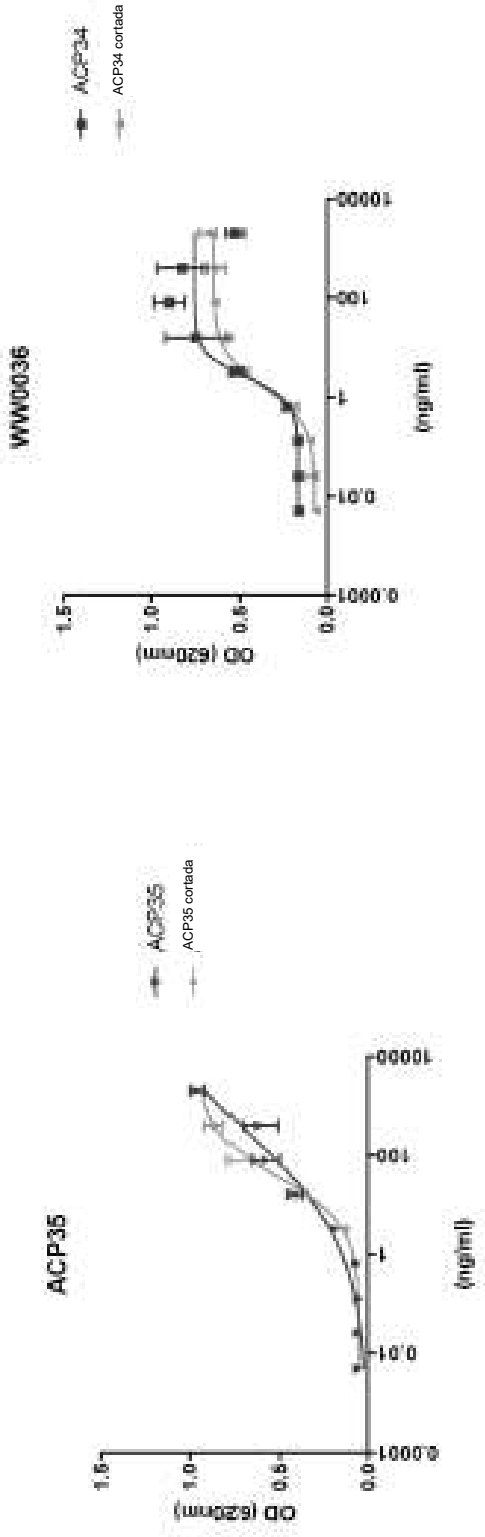

WW0036
ACP34
ACP34 cortada
OD (620nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.01
1
100
10000
(ng/ml)
ACP35
ACP35
ACP35 cortada
OD (620nm)
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0001
0.01
1
100
10000
(ng/ml)

FIG. 11

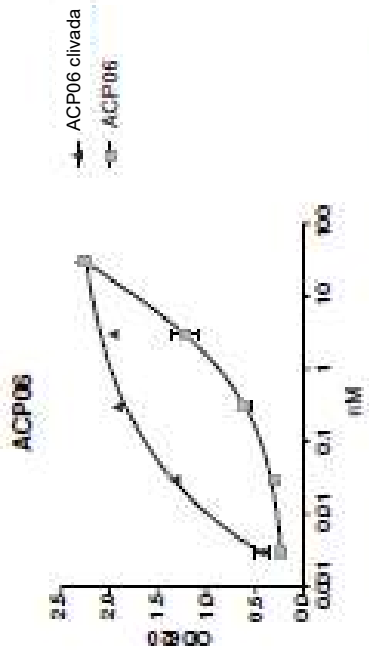


FIG. 12A

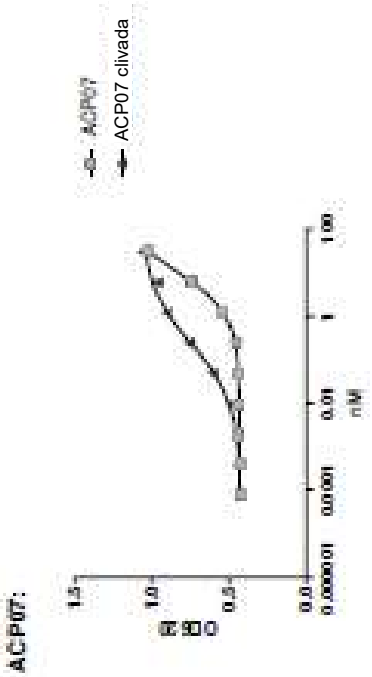


FIG. 12C

FIG. 12B

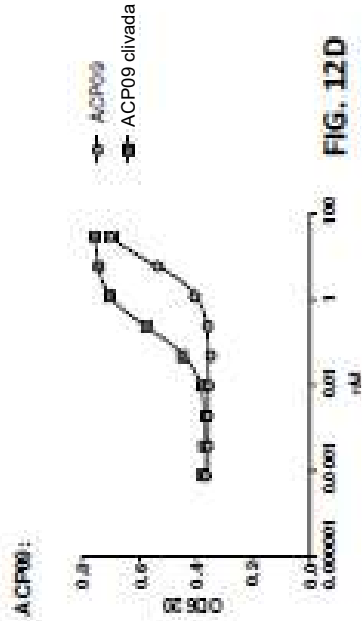


FIG. 12D

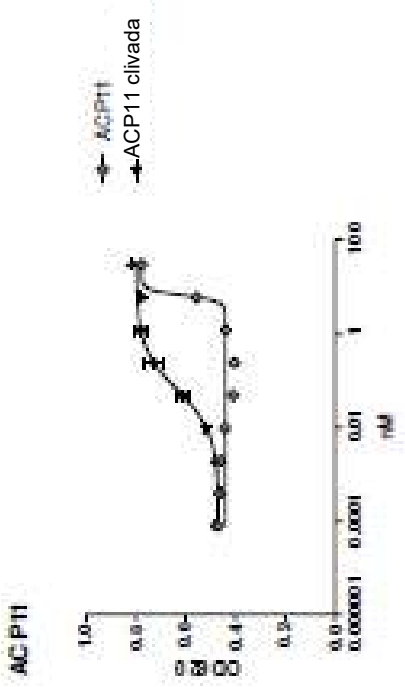


FIG. 12F

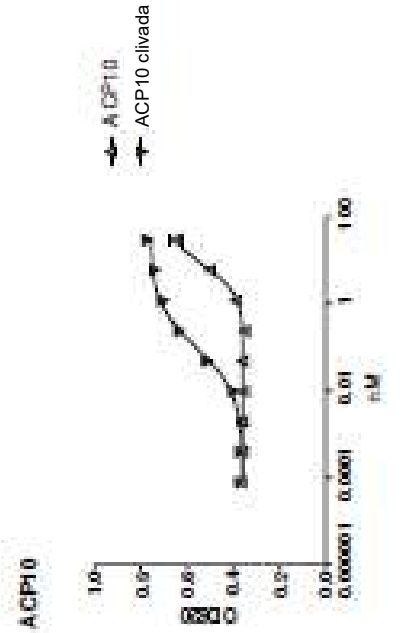


FIG. 12E

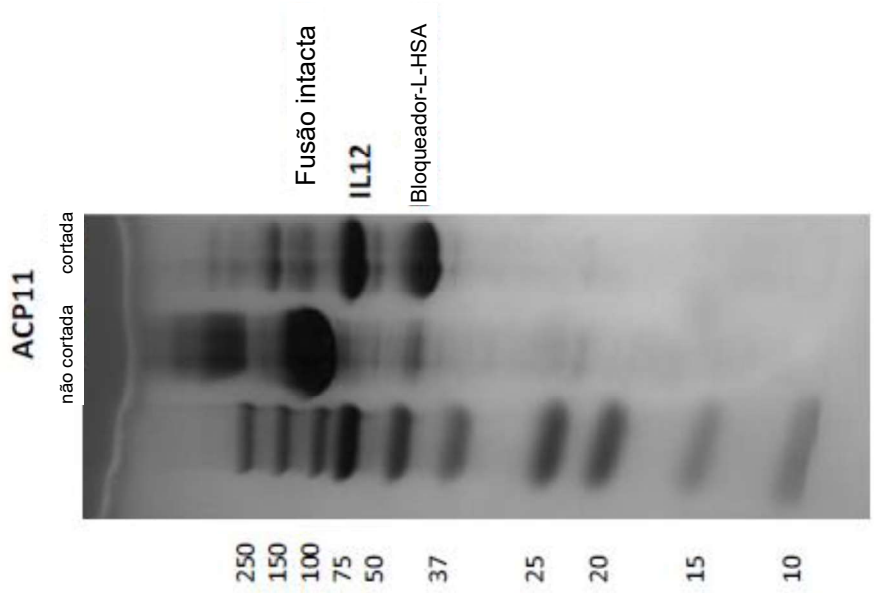
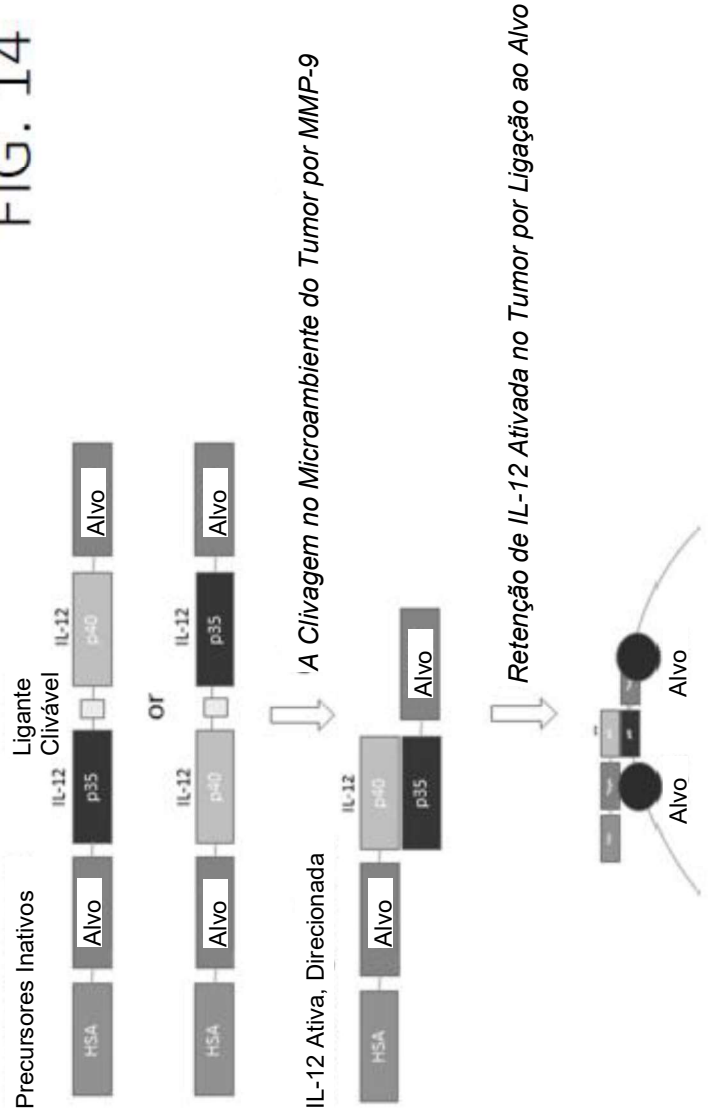

ACP11
não cortada
cortada
Fusão intacta
IL12
Bloqueador-L-HSA
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

FIG. 13

FIG. 14


Precursores Inativos
Ligante Clivável
IL-12
p35
Alvo
HSA
Alvo
IL-12
p40
or
IL-12
p40
Alvo
HSA
Alvo
IL-12
p35
Clivagem no Microambiente do Tumor por MMP-9
IL-12 Ativa, Direcionada
IL-12
p40
p35
Alvo
HSA
Alvo
Retenção de IL-12 Ativada no Tumor por Ligação ao Alvo
Alvo
Alvo

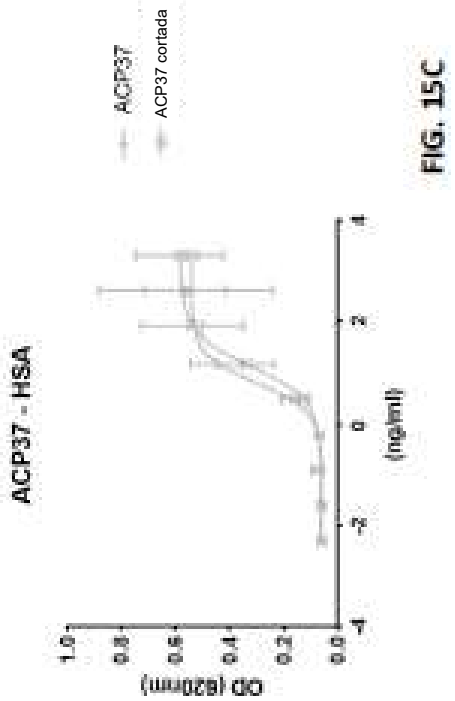


FIG. 15C

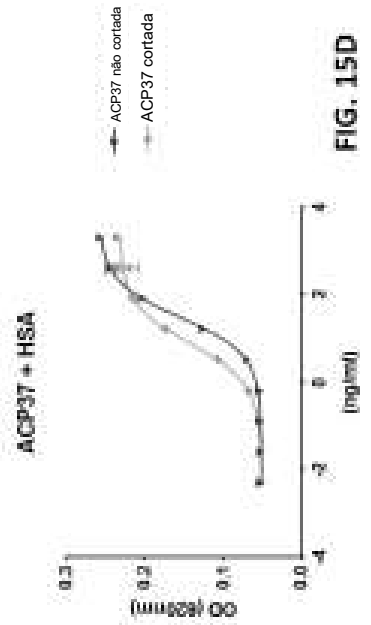


FIG. 15D

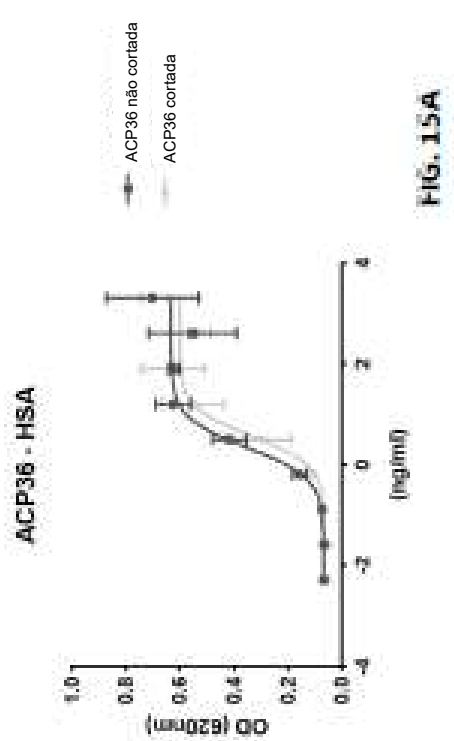


FIG. 15A

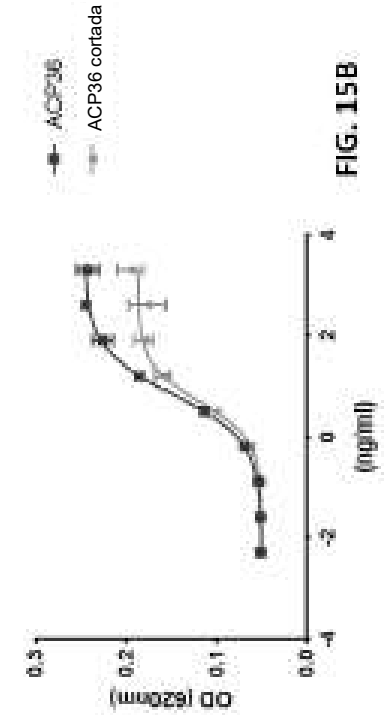


FIG. 15B

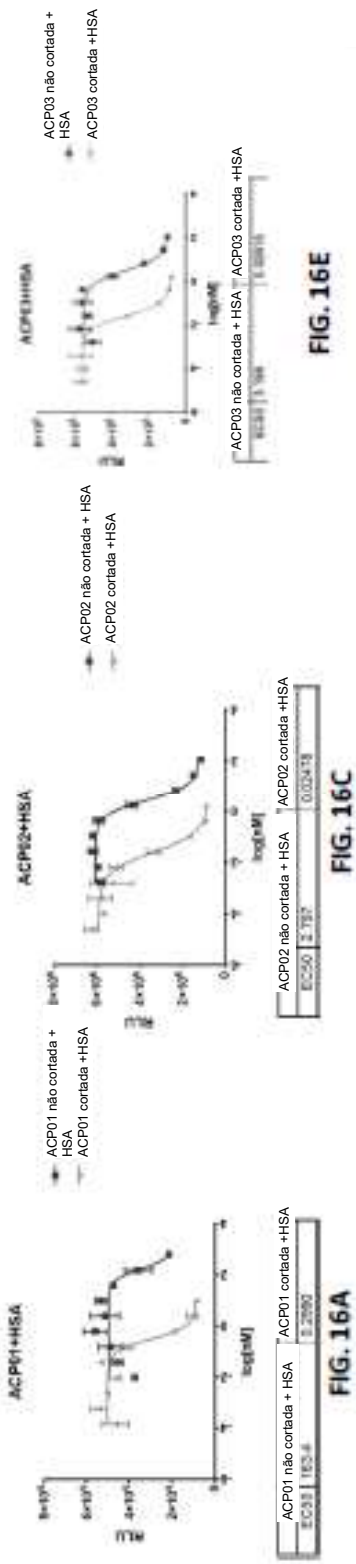


FIG. 16A

FIG. 16B

FIG. 16C

FIG. 16D

FIG. 16E

FIG. 16F

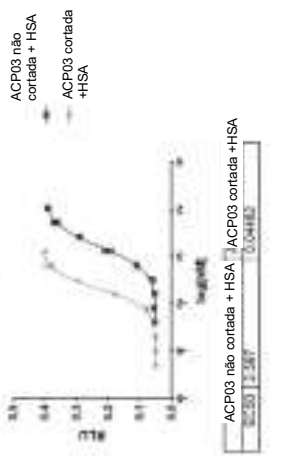


FIG. 17A

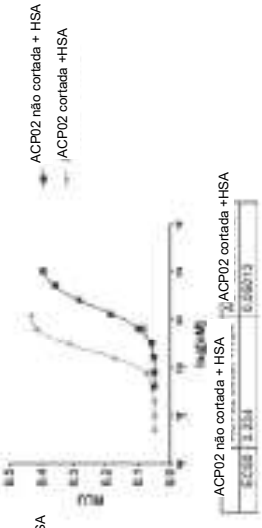


FIG. 17C

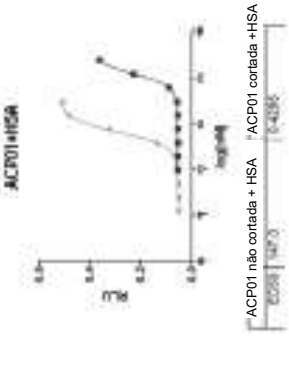


FIG. 17E

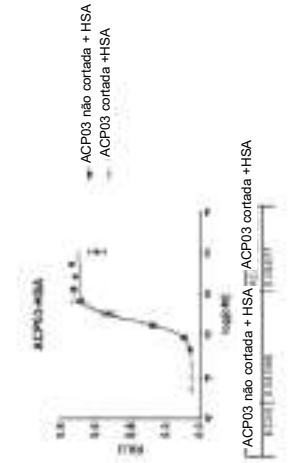


FIG. 17B

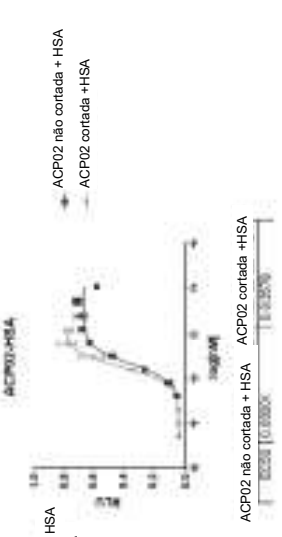


FIG. 17D

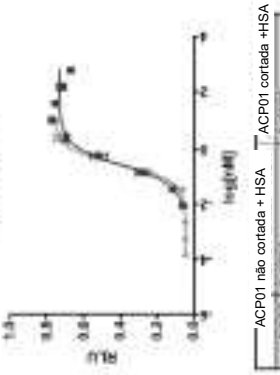


FIG. 17F

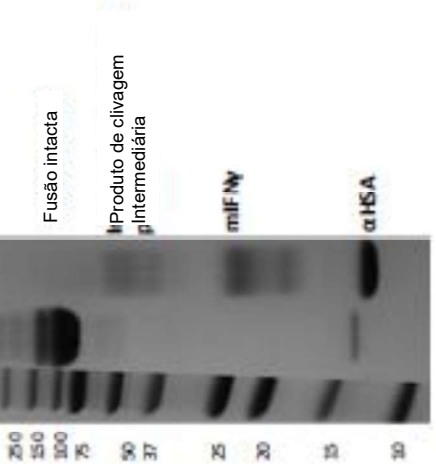


FIG. 18B

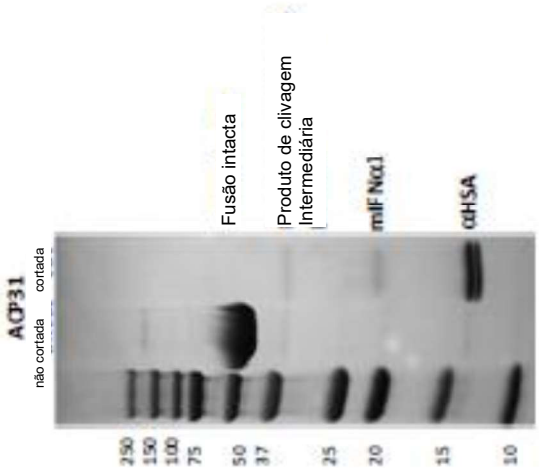


FIG. 18A

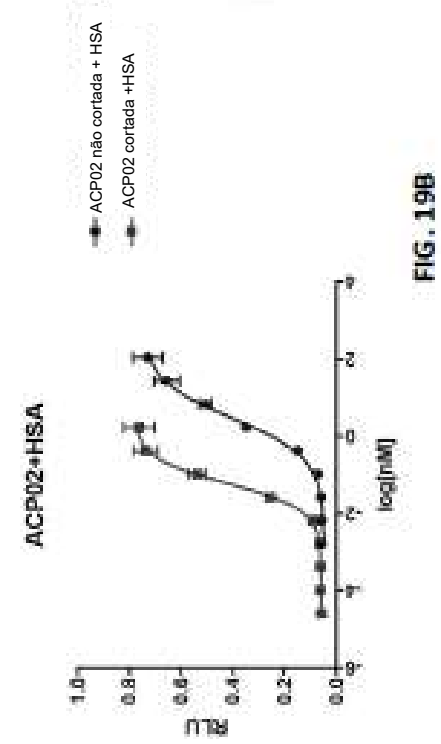


FIG. 19B

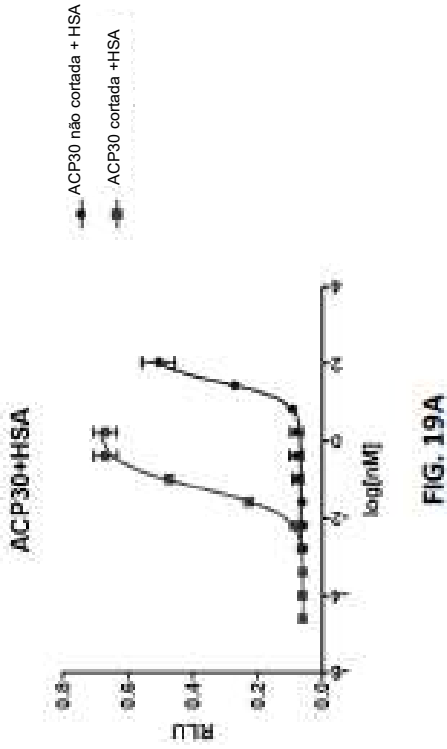


FIG. 19A

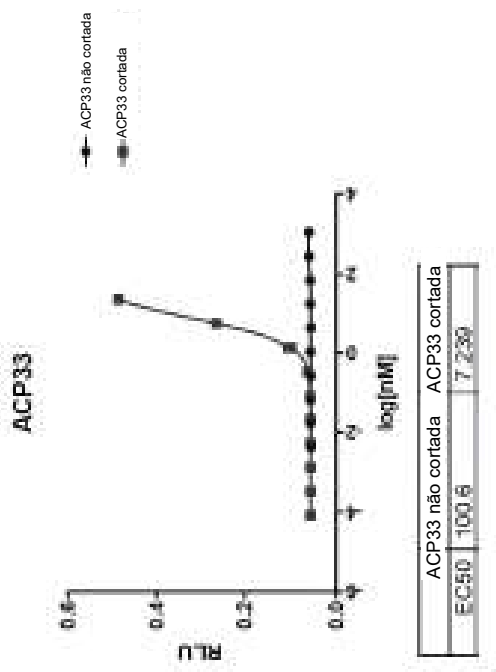


FIG. 20B

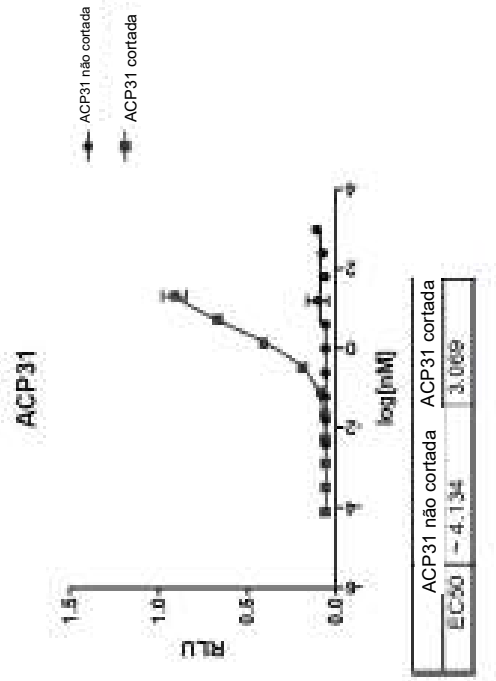


FIG. 20A

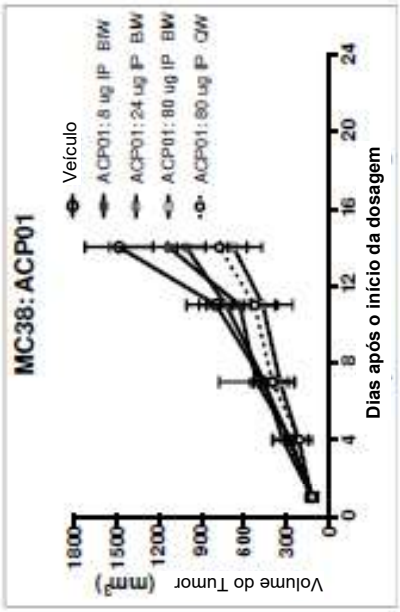


FIG. 21A

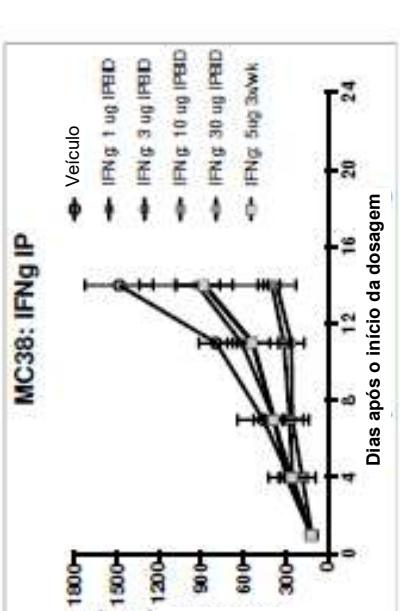


FIG. 21B

FIG. 21C

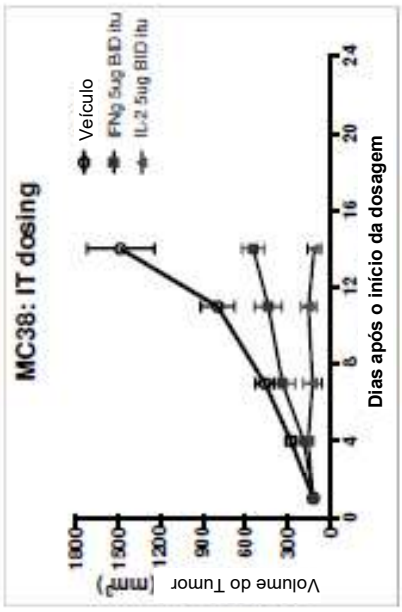


FIG. 21D

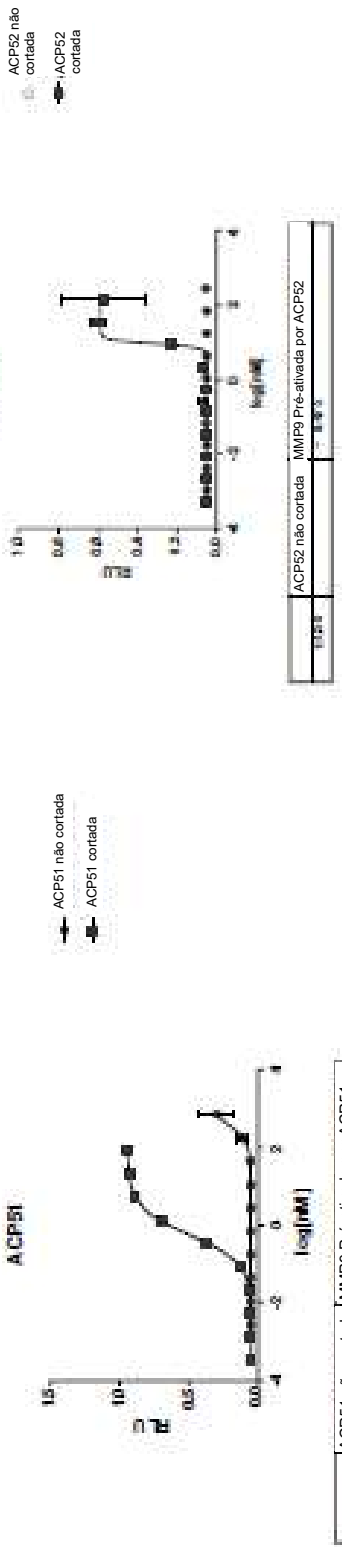
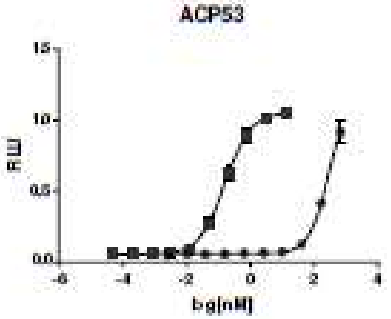


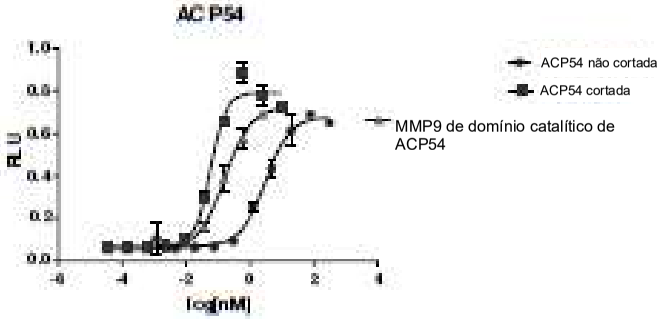
FIG. 22A

FIG. 22B



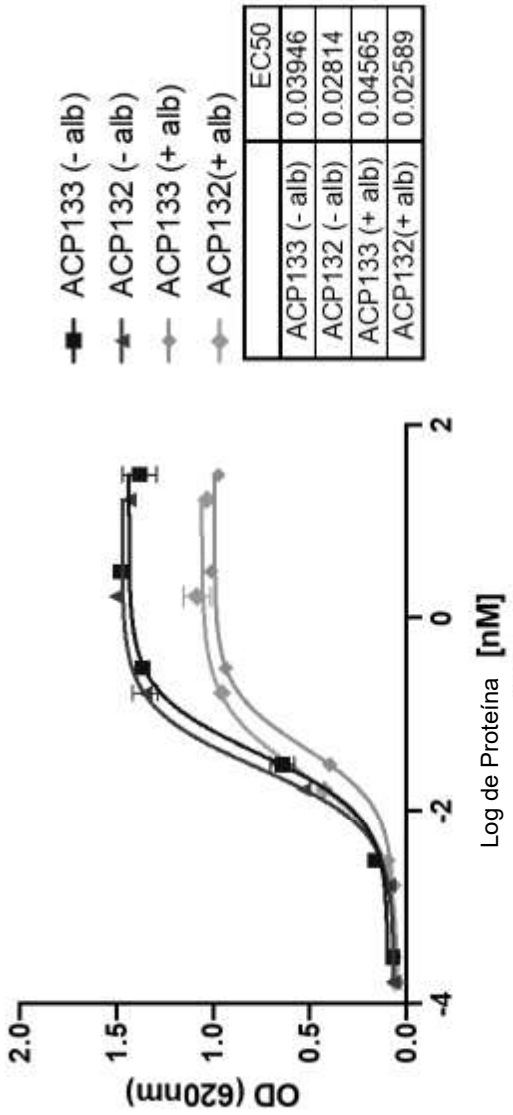
	ACP53 não cortada	MMP9 de domínio catalítico de ACP53
EC50	288.5	0.164

FIG. 23A



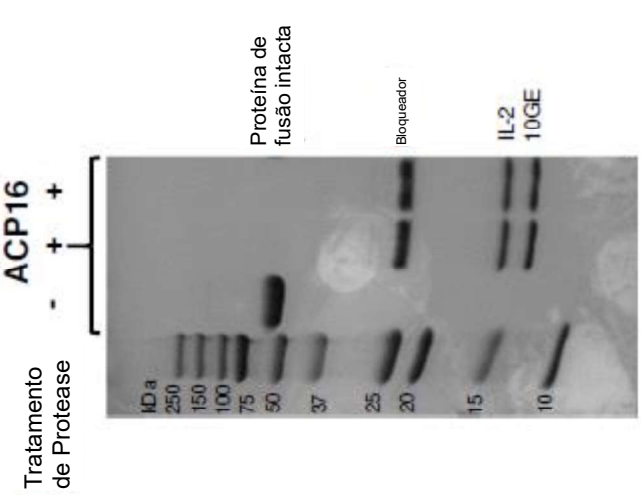
	ACP54 cortada	MMP9 Pré-ativada por ACP54	MMP9 de domínio catalítico de ACP54
EC50	0.03	0.058 (0	0.164?

FIG. 23B



	EC50
ACP133 (- alb)	0.03946
ACP132 (- alb)	0.02814
ACP133 (+ alb)	0.04565
ACP132(+ alb)	0.02589

FIG. 24A


Tratamento de Protease
ACP16
-
+
+
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Proteína de fusão intacta
Bloqueador
IL-2
10GE

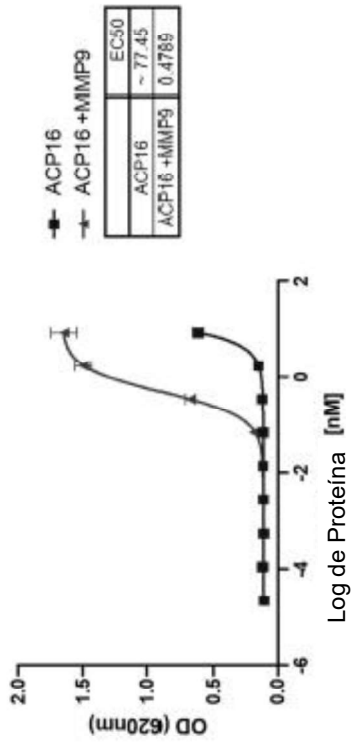

ACP16
ACP16 +MMP9
EC50
ACP16
~ 77.45
ACP16 +MMP9
0.4789
OD (620nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-6
-4
-2
0
2
Log de Proteína [nM]

FIG. 24B

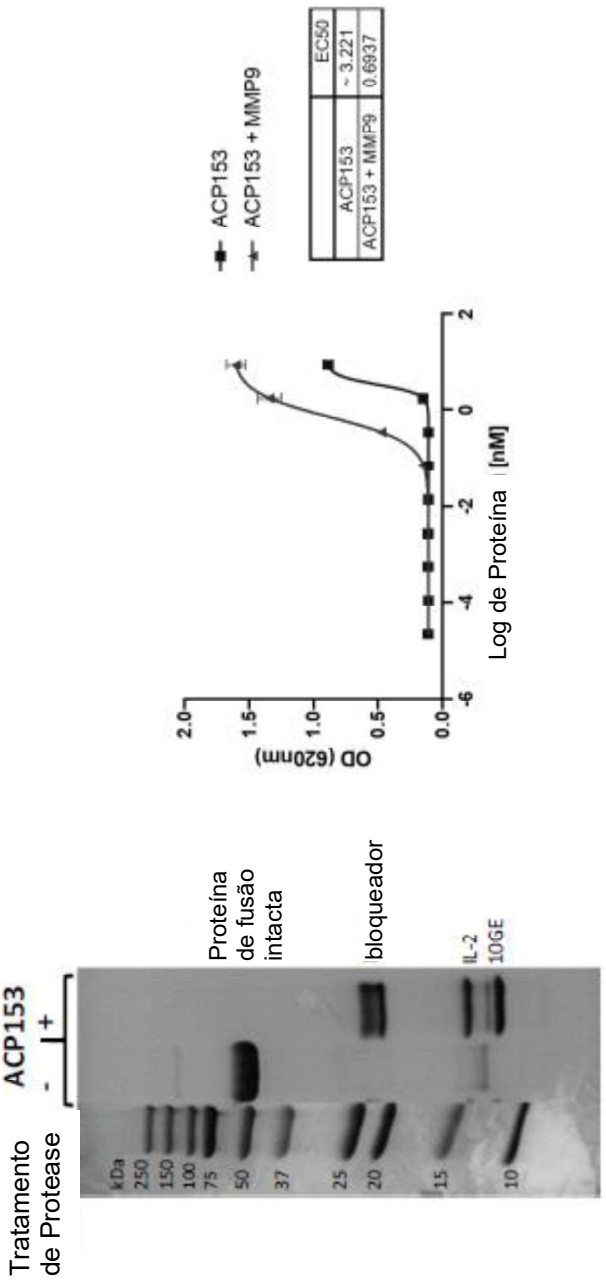
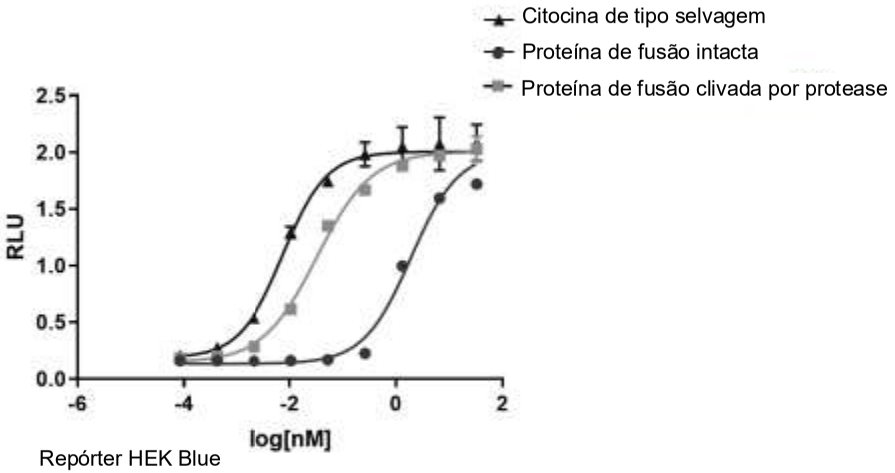

Tratamento de Protease
ACP153
-
+
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Proteína de fusão intacta
bloqueador
IL-2
10GE
OD (620nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-6
-4
-2
0
2
Log de Proteína [nM]
ACP153
ACP153 + MMP9
EC50
ACP153
~ 3.221
ACP153 + MMP9
0.6937

FIG. 24C


Citocina de tipo selvagem
Proteína de fusão intacta
Proteína de fusão clivada por protease
RLU
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-6
-4
-2
0
2
log[nM]
Repórter HEK Blue

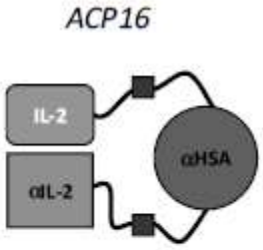
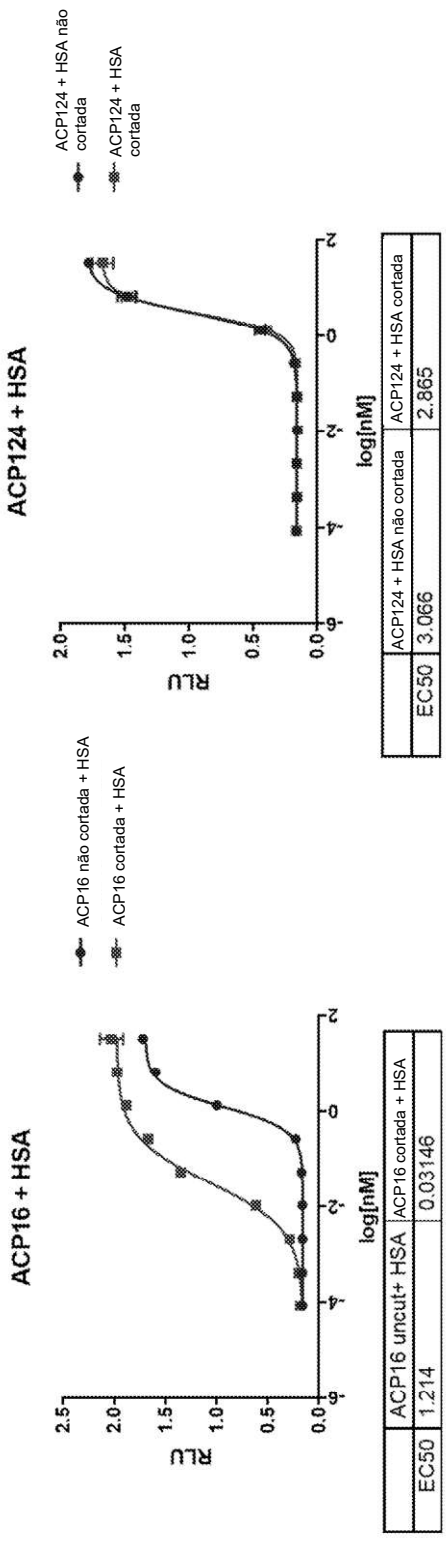

ACP16
IL-2
αIL-2
αHSA

FIG. 24D

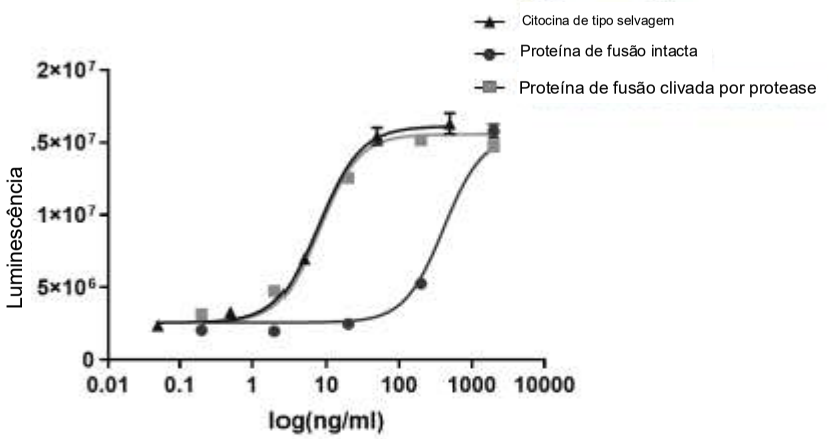


	ACP16 uncut+ HSA	ACP16 cortada + HSA
EC50	1.214	0.03146

FIG. 25A

	ACP124 + HSA não cortada	ACP124 + HSA cortada
EC50	3.066	2.865

FIG. 25B



Ensaio de proliferação CTLL-2

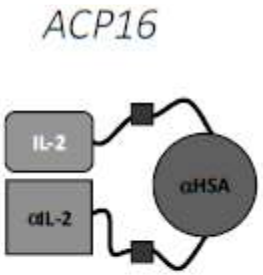
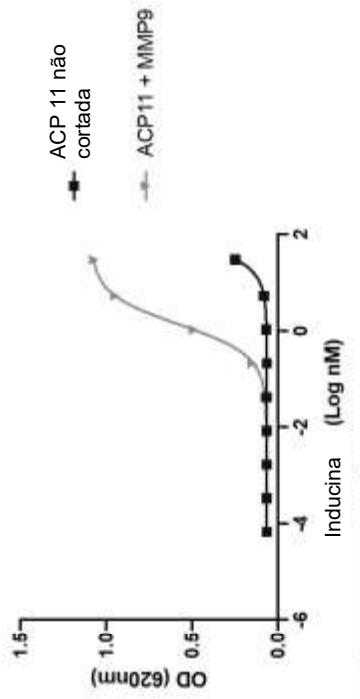
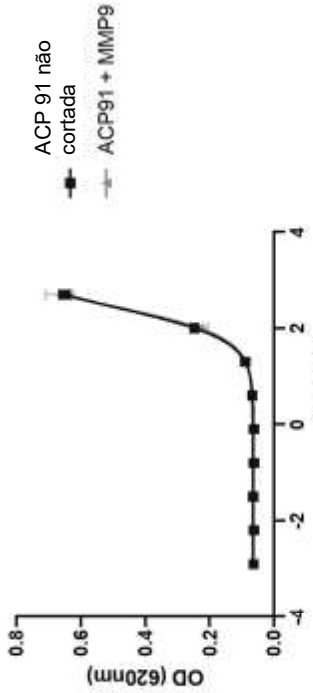


FIG. 25C



	ACP11 não cortada	ACP11 + MMP9
EC50	~ 212.2	1.349

FIG. 26A



	ACP91 não cortada	ACP91 + MMP9
EC50	255.9	288.2

FIG. 26B

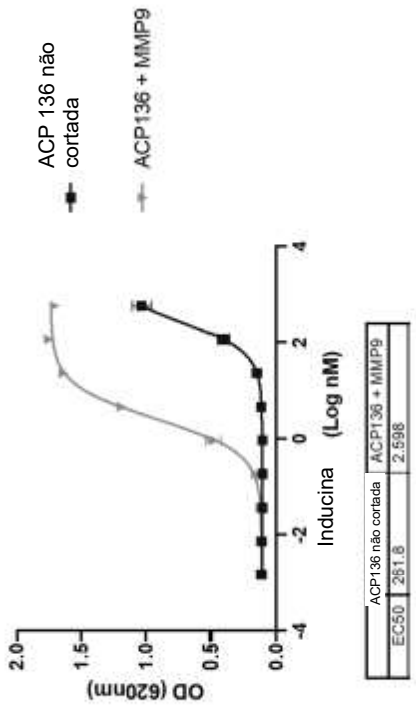
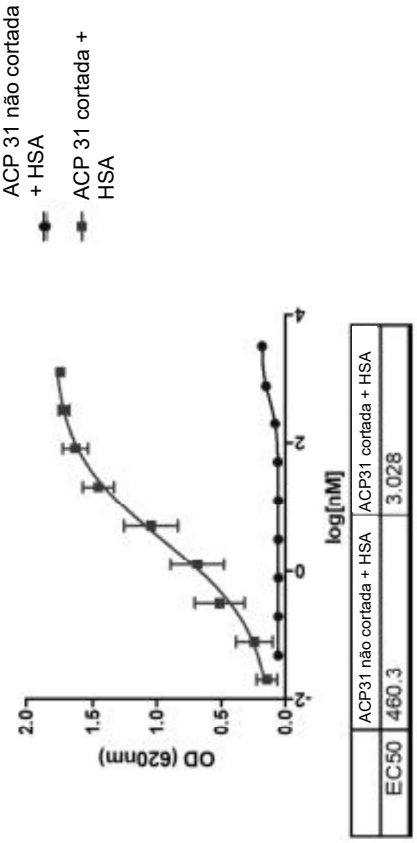
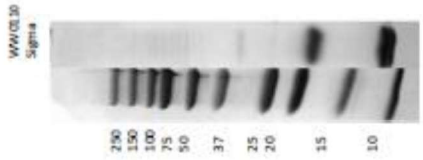

ACP 136 não cortada
ACP136 + MMP9
OD (620nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-4
-2
0
2
4
Indução (Log nM)
ACP136 não cortada
ACP136 + MMP9
EC50
261.8
2.598

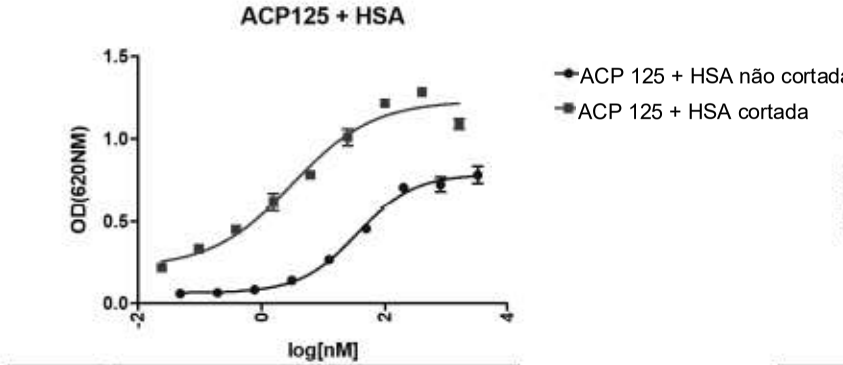
FIG. 26C



	ACP31 não cortada + HSA	ACP31 cortada + HSA
EC50	460.3	3.028

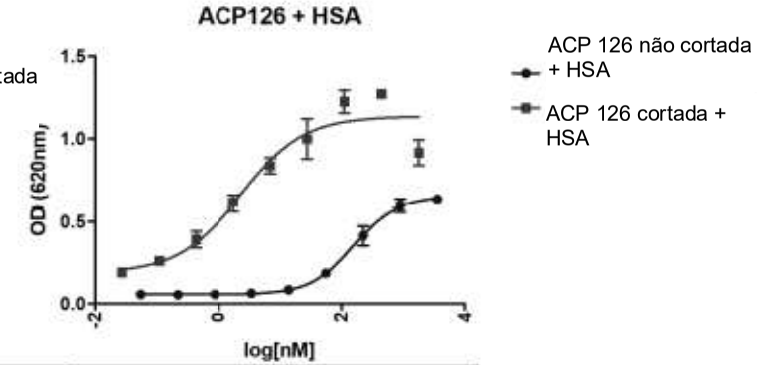
FIG. 27A





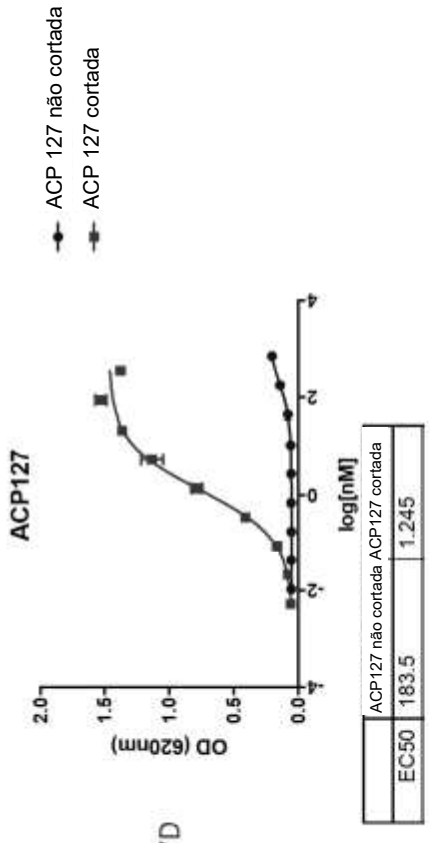
	ACP125 + HSA não cortada	ACP125 + HSA cortada
EC50	35.65	3.175

FIG. 27B



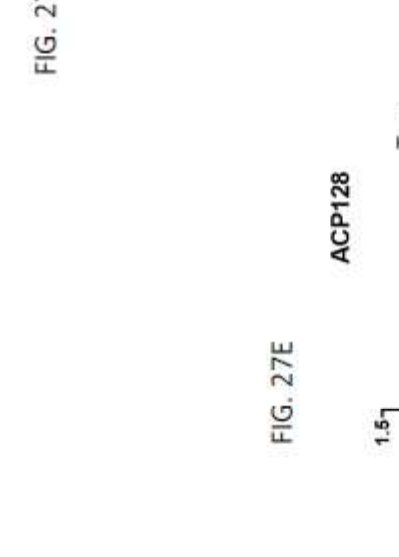
	ACP126 não cortada + HSA	ACP126 cortada + HSA
EC50	156.6	2.352

FIG. 27C



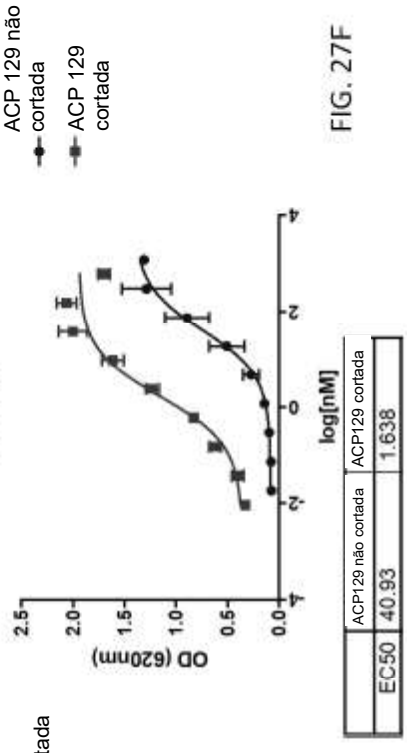
	ACP127 não cortada	ACP127 cortada
EC50	183.5	1.245

FIG. 27D



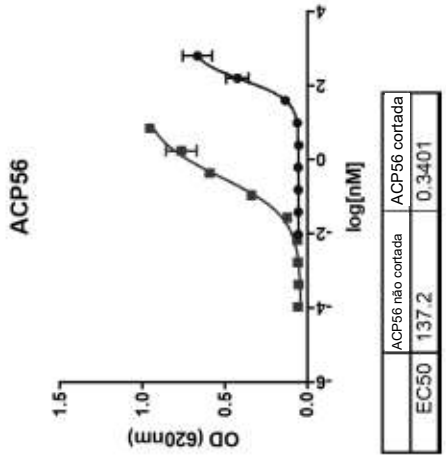
	ACP128 não cortada	ACP128 cortada
EC50	30.71	1.563

FIG. 27E



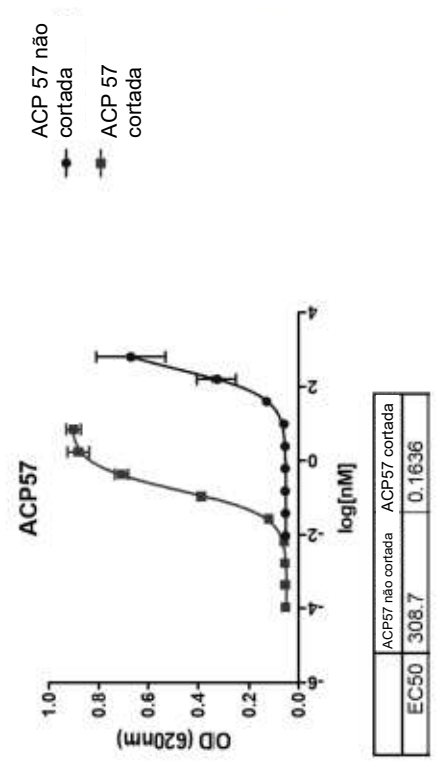
	ACP129 não cortada	ACP129 cortada
EC50	40.93	1.638

FIG. 27F



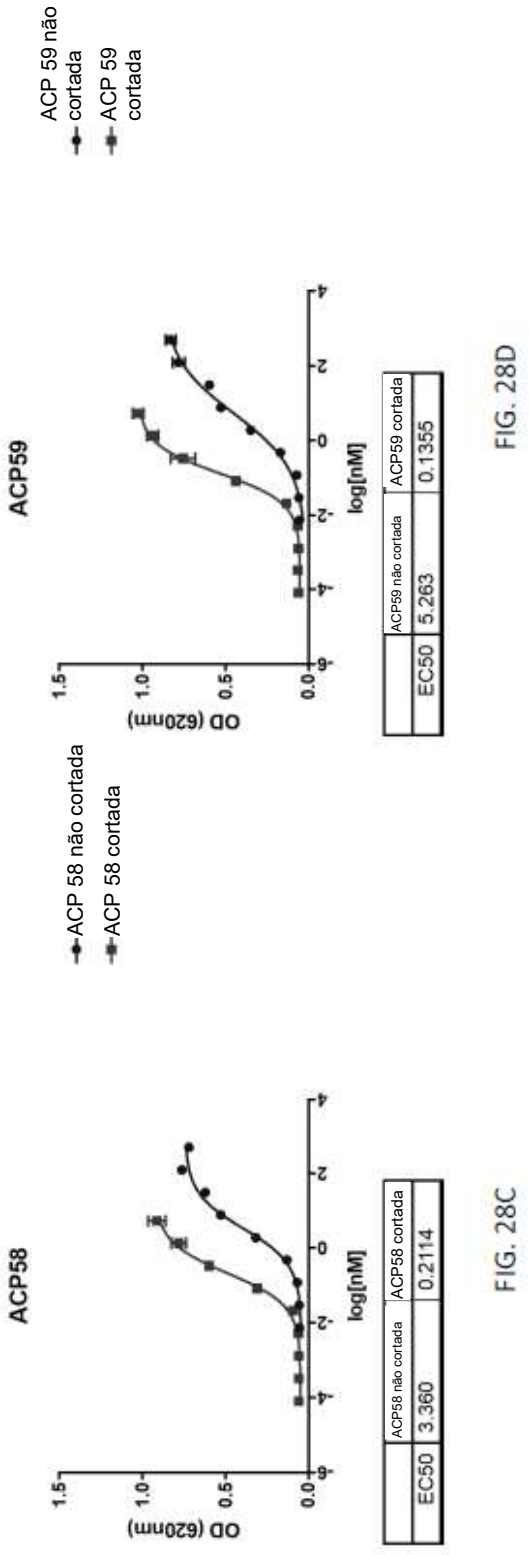
	ACP56 não cortada	ACP56 cortada
EC50	137.2	0.3401

FIG. 28A



	ACP57 não cortada	ACP57 cortada
EC50	308.7	0.1636

FIG. 28B

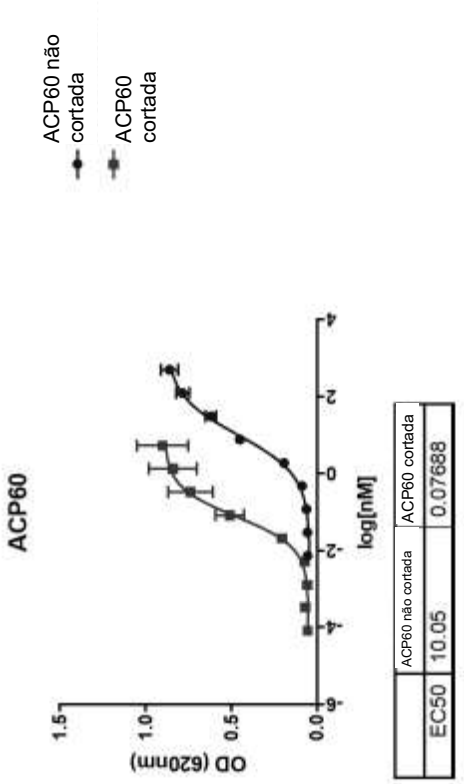


	ACP58 não cortada	ACP58 cortada
EC50	3.360	0.2114

FIG. 28C

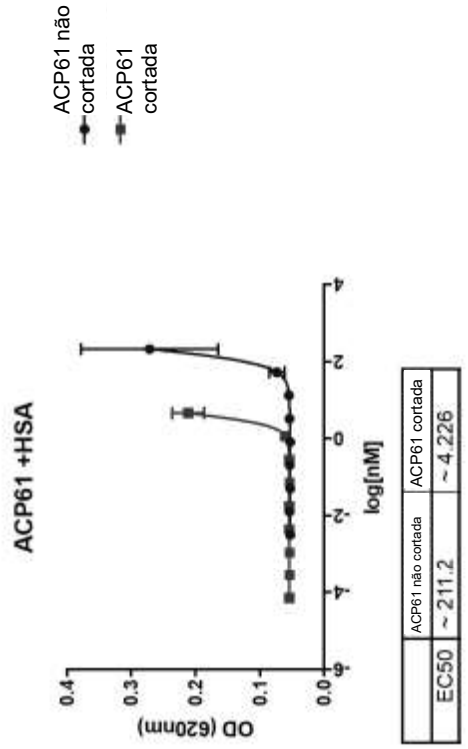
	ACP59 não cortada	ACP59 cortada
EC50	5.263	0.1355

FIG. 28D



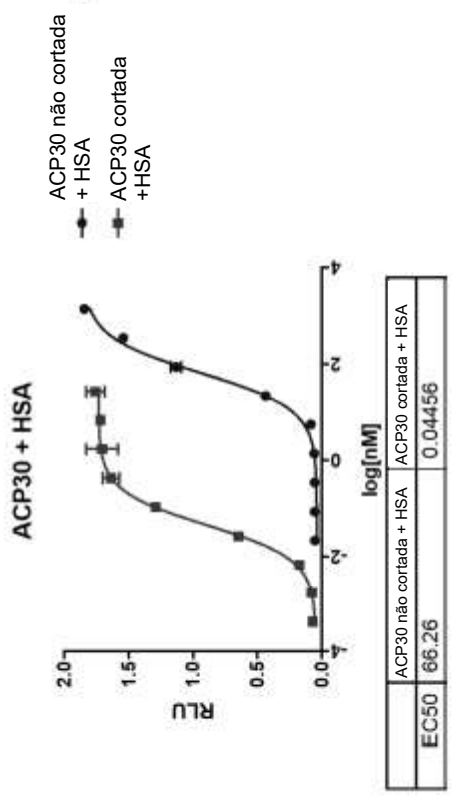
	ACP60 não cortada	ACP60 cortada
EC50	10.05	0.07688

FIG. 28E



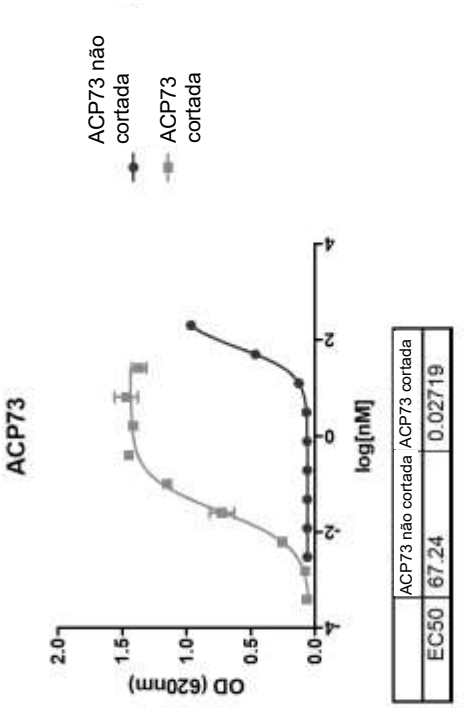
	ACP61 não cortada	ACP61 cortada
EC50	~ 211.2	~ 4.226

FIG. 28F



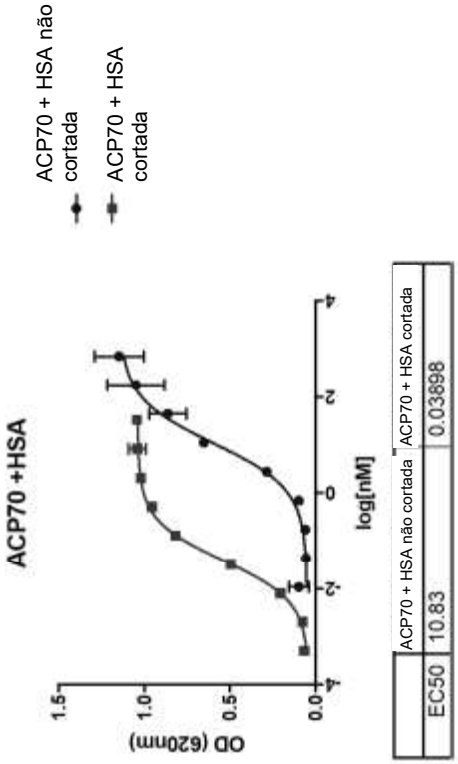
	ACP30 não cortada + HSA	ACP30 cortada + HSA
EC50	66.26	0.04456

FIG. 28G



	ACP73 não cortada	ACP73 cortada
EC50	67.24	0.02719

FIG. 28H



	ACP70 + HSA não cortada	ACP70 + HSA cortada
EC50	10.83	0.03898

FIG. 28i

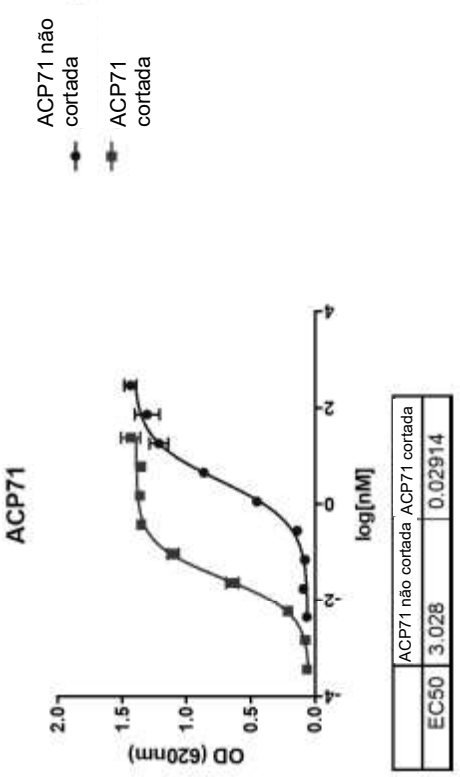
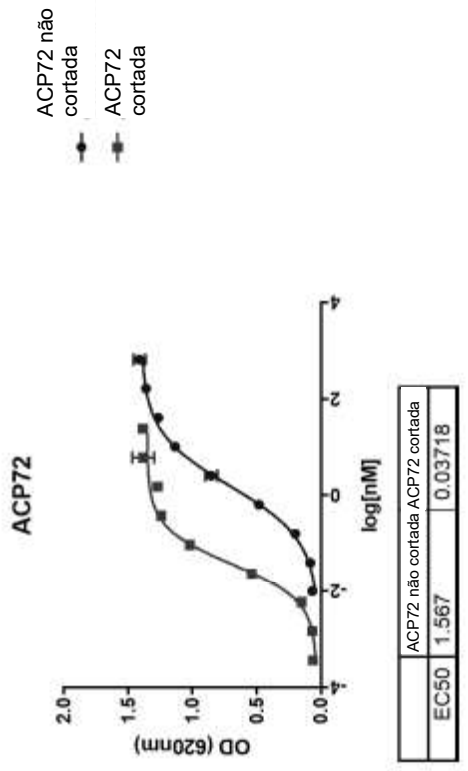
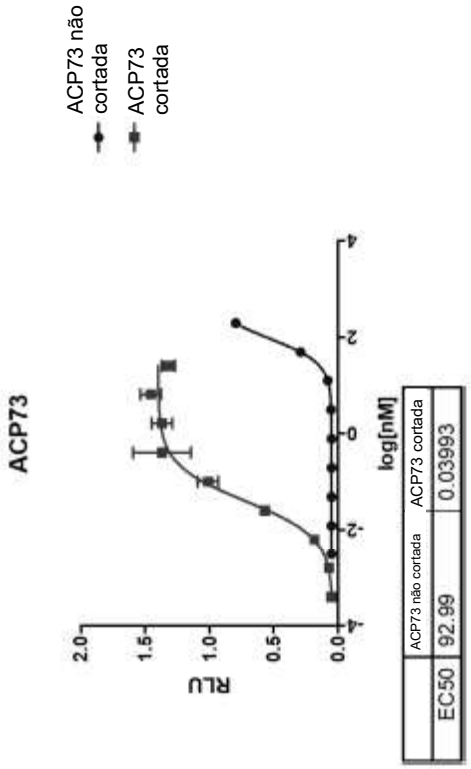

ACP71 não cortada
ACP71 cortada
ACP71
OD (620nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-4
-2
0
2
4
log[nM]
ACP71 não cortada
ACP71 cortada
EC50
3.028
0.02914

FIG. 28J



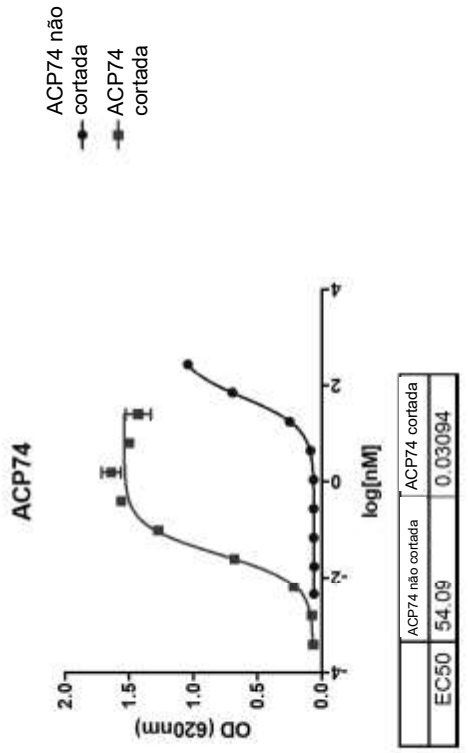
	ACP72 não cortada	ACP72 cortada
EC50	1.567	0.03718

FIG. 28K



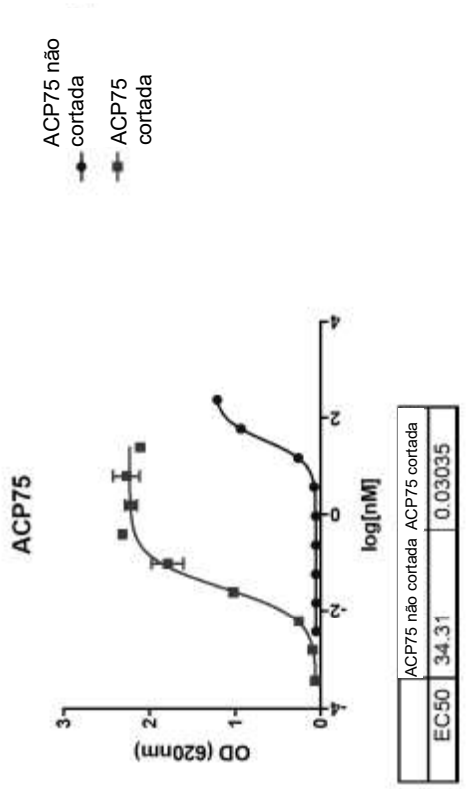
	ACP73 não cortada	ACP73 cortada
EC50	92.99	0.03993

FIG. 28L



	ACP74 não cortada	ACP74 cortada
EC50	54.09	0.03094

FIG. 28M



	ACP75 não cortada	ACP75 cortada
EC50	34.31	0.03035

FIG. 28N

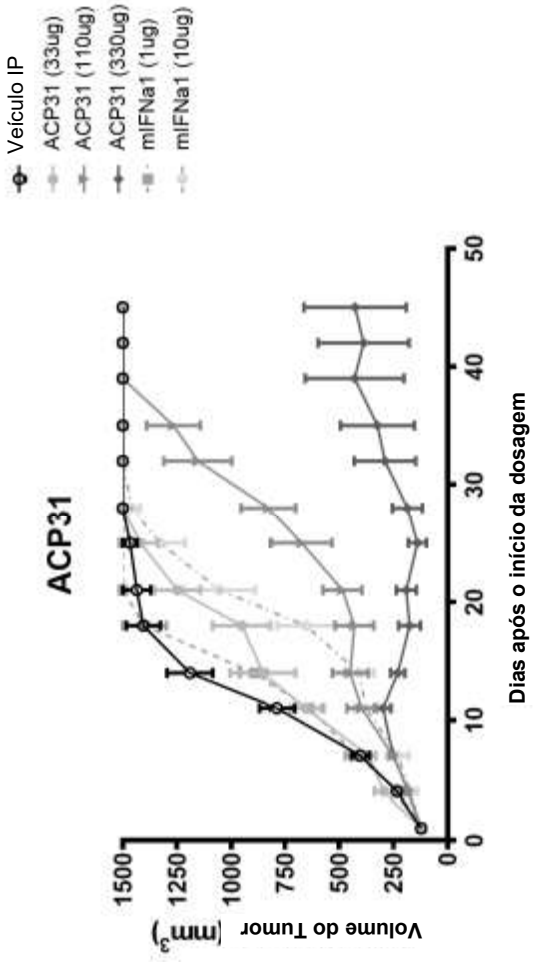

Veículo IP
ACP31 (33ug)
ACP31 (110ug)
ACP31 (330ug)
mIFNa1 (1ug)
mIFNa1 (10ug)
ACP31
Volume do Tumor (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 29A

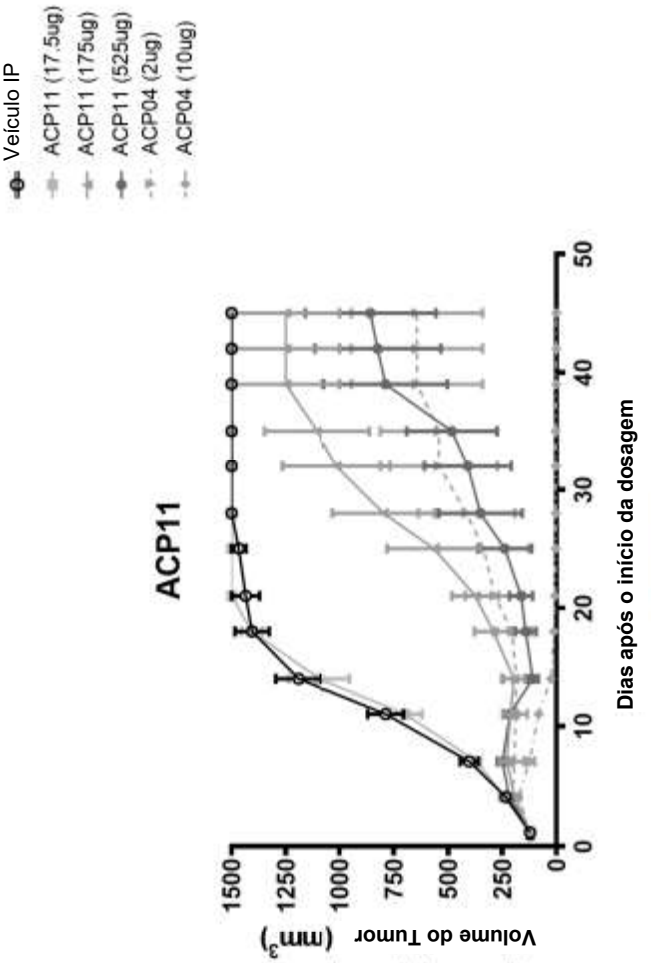

Veículo IP
ACP11 (17.5ug)
ACP11 (175ug)
ACP11 (525ug)
ACP04 (2ug)
ACP04 (10ug)
ACP11
Volume do Tumor (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 29B

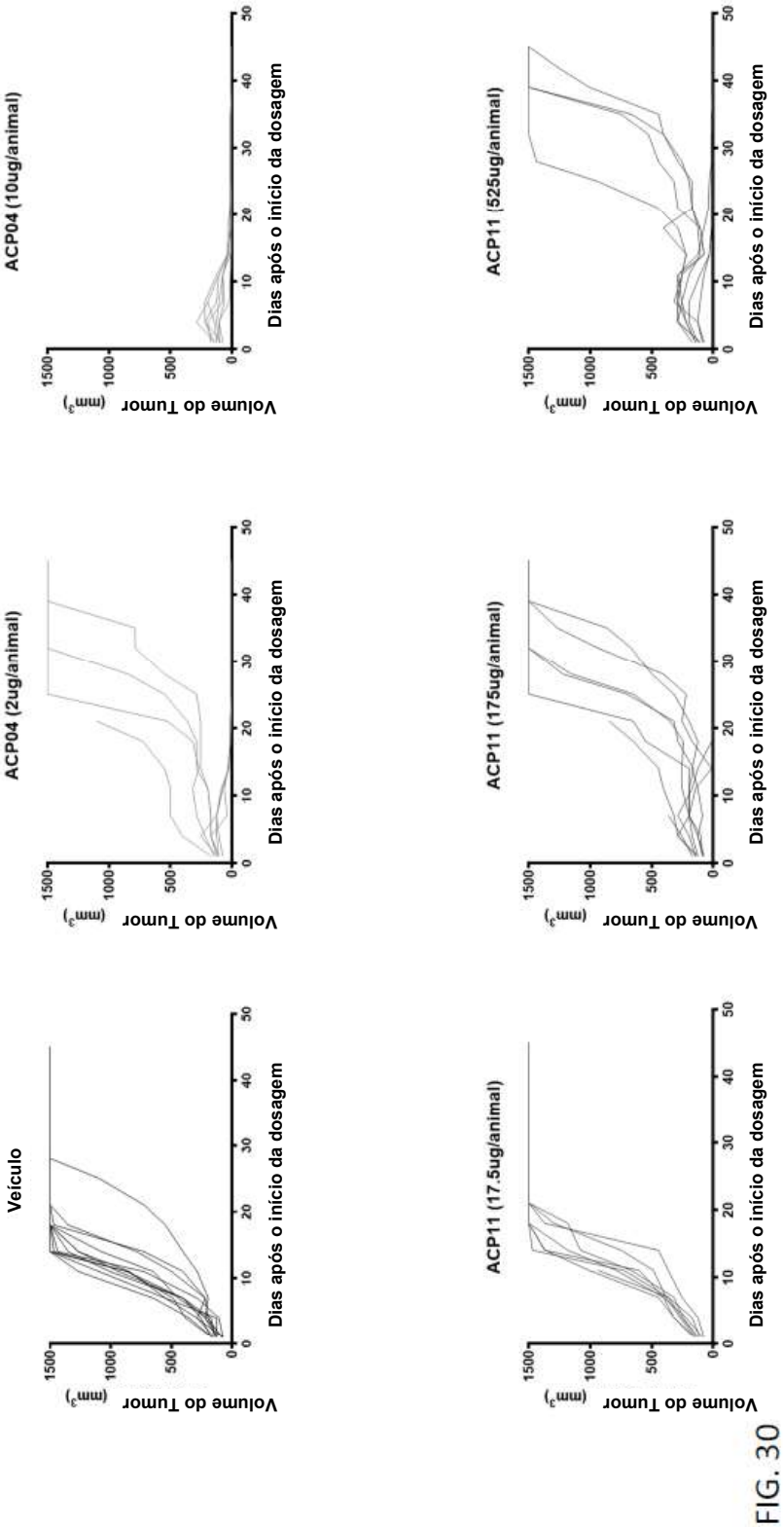

Veículo
ACP04 (2ug/animal)
ACP04 (10ug/animal)
ACP11 (17.5ug/animal)
ACP11 (175ug/animal)
ACP11 (525ug/animal)
Volume do Tumor (mm³)
Dias após o início da dosagem
0
500
1000
1500
0
10
20
30
40
50

FIG. 30

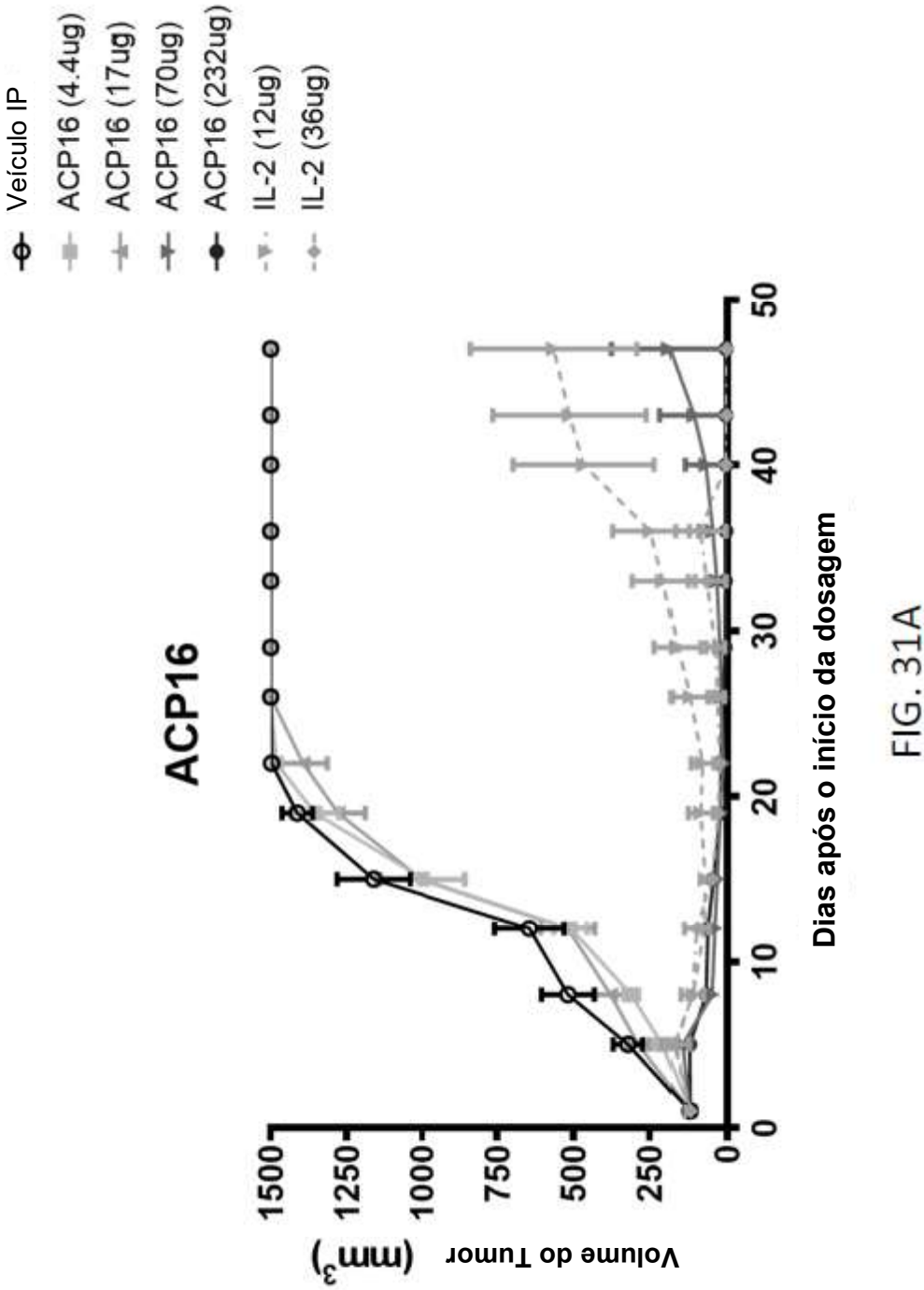

Veículo IP
ACP16 (4.4ug)
ACP16 (17ug)
ACP16 (70ug)
ACP16 (232ug)
IL-2 (12ug)
IL-2 (36ug)
ACP16
Volume do Tumor (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 31A

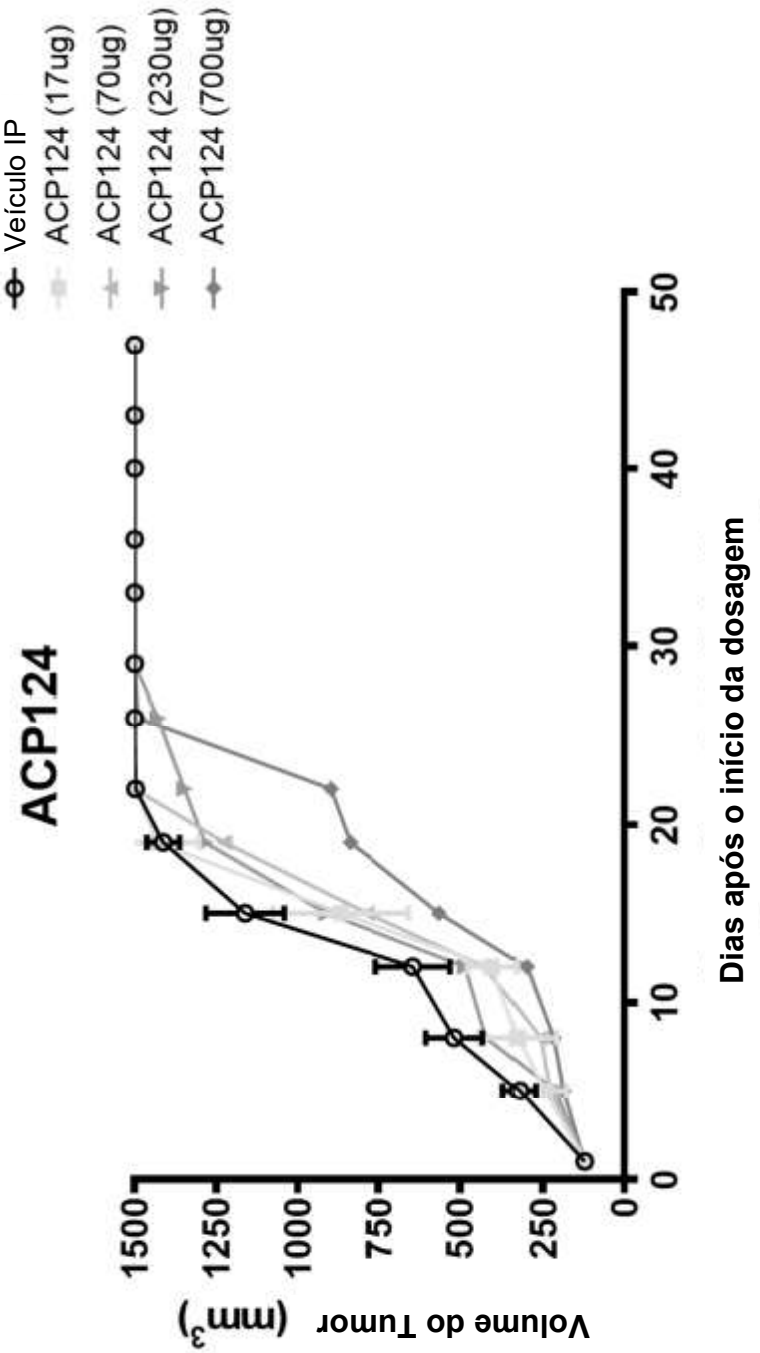

ACP124
Veículo IP
ACP124 (17ug)
ACP124 (70ug)
ACP124 (230ug)
ACP124 (700ug)
Volume do Tumor (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 31B

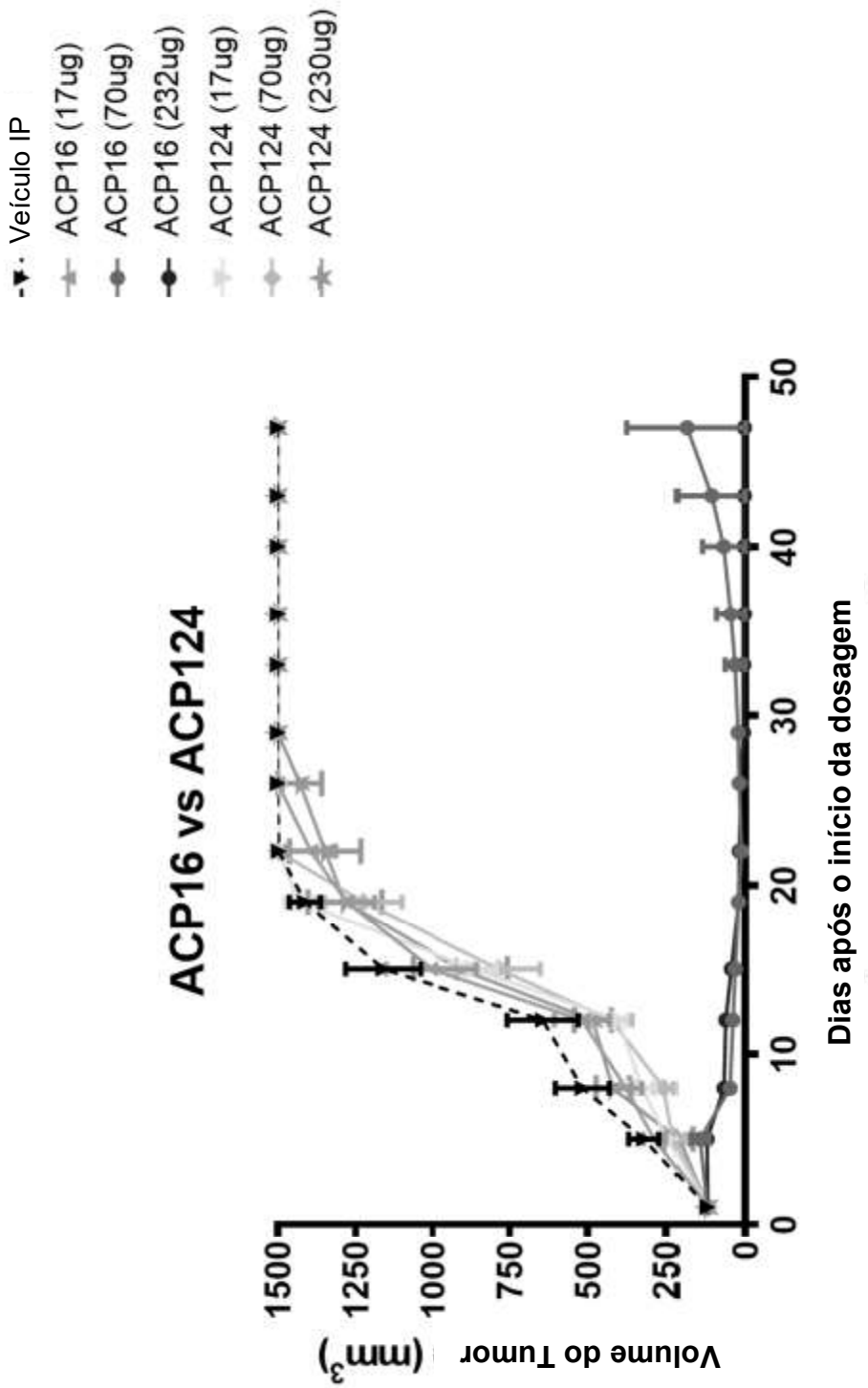

Veículo IP
ACP16 (17ug)
ACP16 (70ug)
ACP16 (232ug)
ACP124 (17ug)
ACP124 (70ug)
ACP124 (230ug)
ACP16 vs ACP124
Volume do Tumor (mm³)
0
250
500
750
1000
1250
1500
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 31C

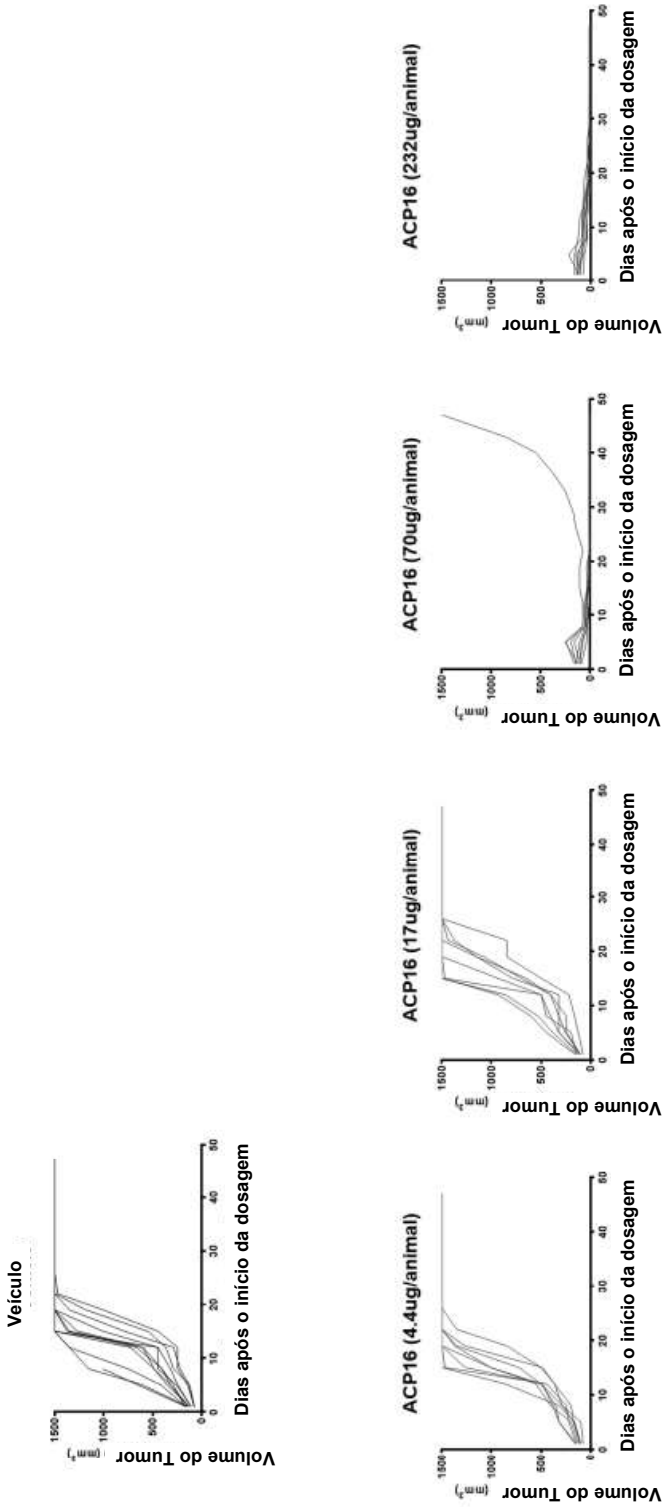
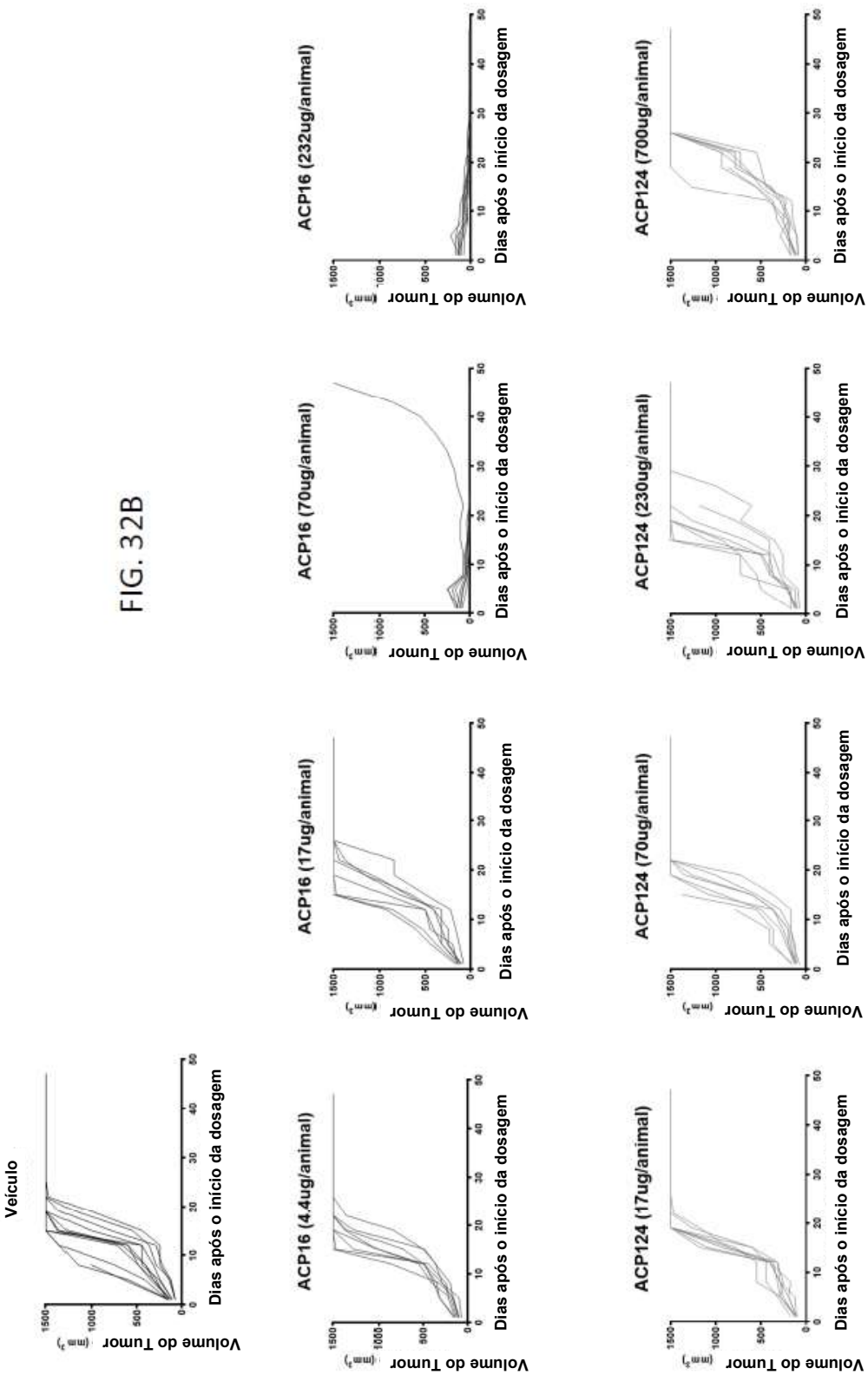

Veículo
ACP16 (4.4ug/animal)
ACP16 (17ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP16 (232ug/animal)
Volume do Tumor
Dias após o início da dosagem

FIG. 32A

FIG. 32B


Veículo
ACP16 (4.4ug/animal)
ACP16 (17ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP16 (232ug/animal)
ACP124 (17ug/animal)
ACP124 (70ug/animal)
ACP124 (230ug/animal)
ACP124 (700ug/animal)
Volume do Tumor
Dias após o início da dosagem

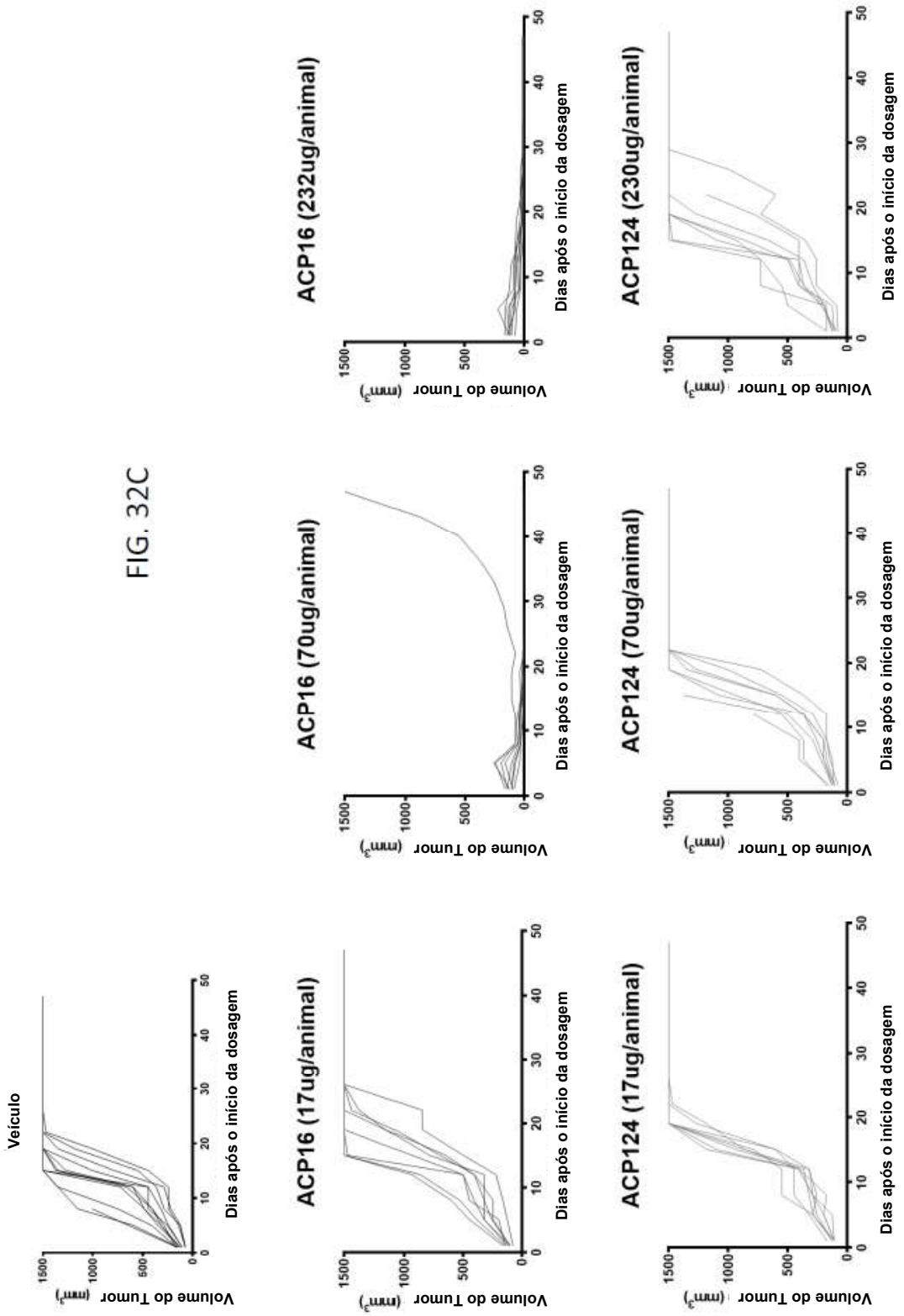

Veículo
ACP16 (232ug/animal)
ACP124 (230ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP124 (70ug/animal)
ACP16 (17ug/animal)
ACP124 (17ug/animal)
Volume do Tumor (mm³)
Dias após o início da dosagem
0
500
1000
1500
10
20
30
40
50

FIG. 32C

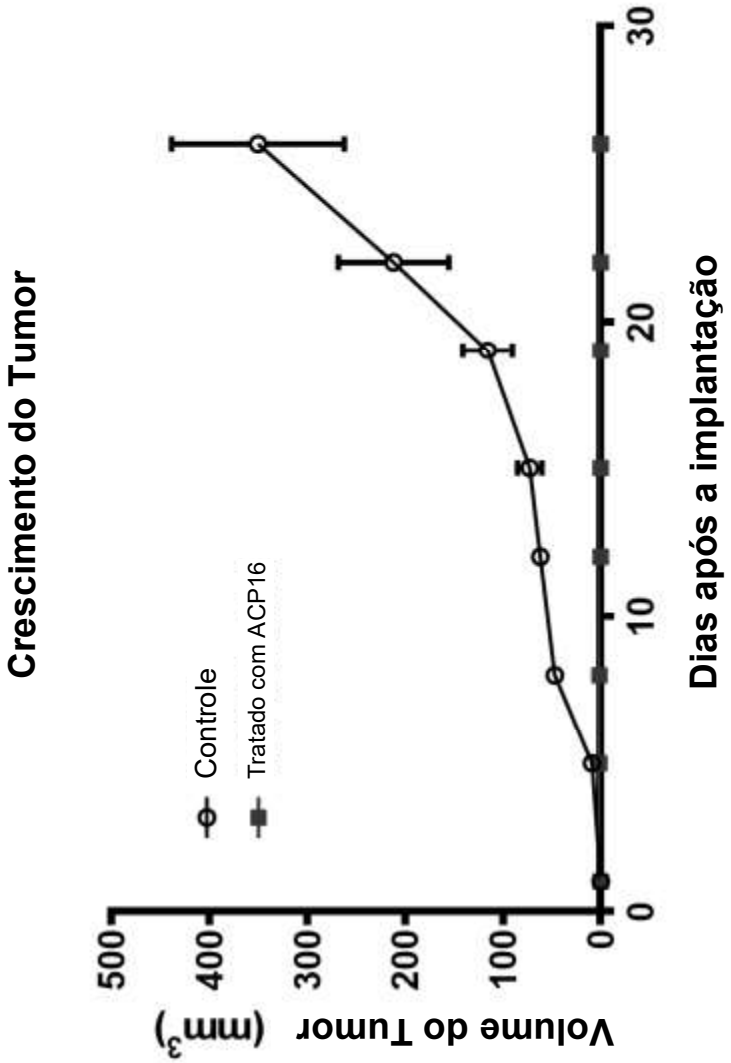

Crescimento do Tumor
Volume do Tumor (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
Dias após a implantação
Controle
Tratado com ACP16

FIG. 33

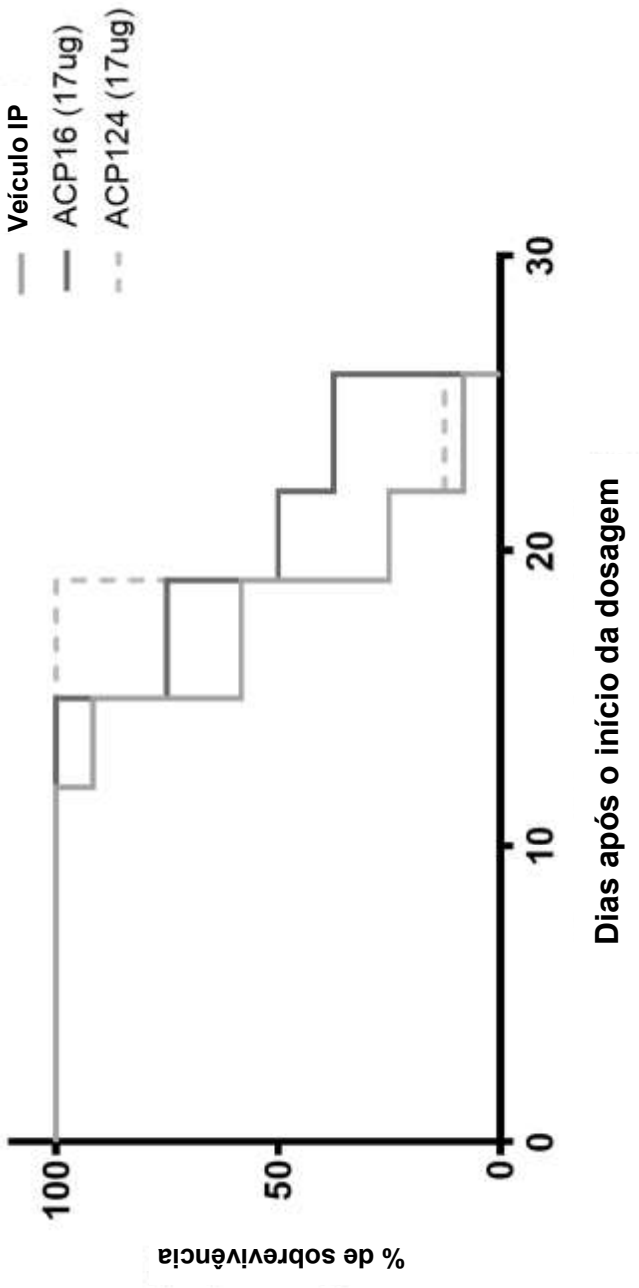

Veículo IP
ACP16 (17ug)
ACP124 (17ug)
% de sobrevivência
100
50
0
0
10
20
30
Dias após o início da dosagem

FIG. 34A

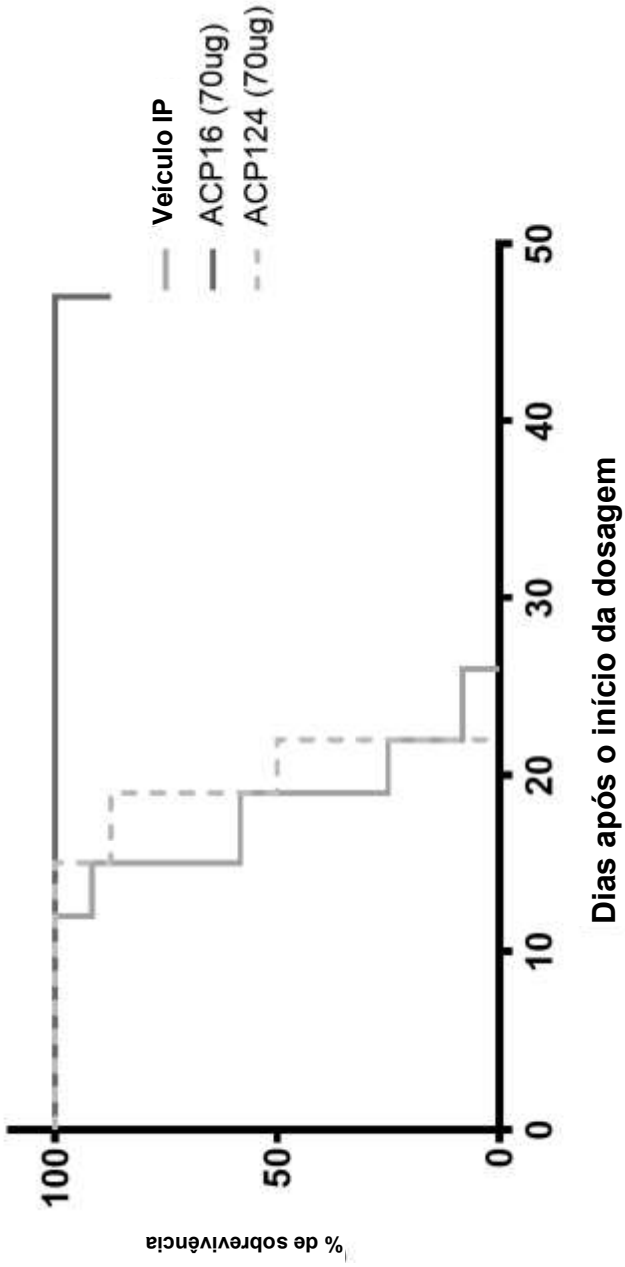

Veículo IP
ACP16 (70ug)
ACP124 (70ug)
% de sobrevivência
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 34B

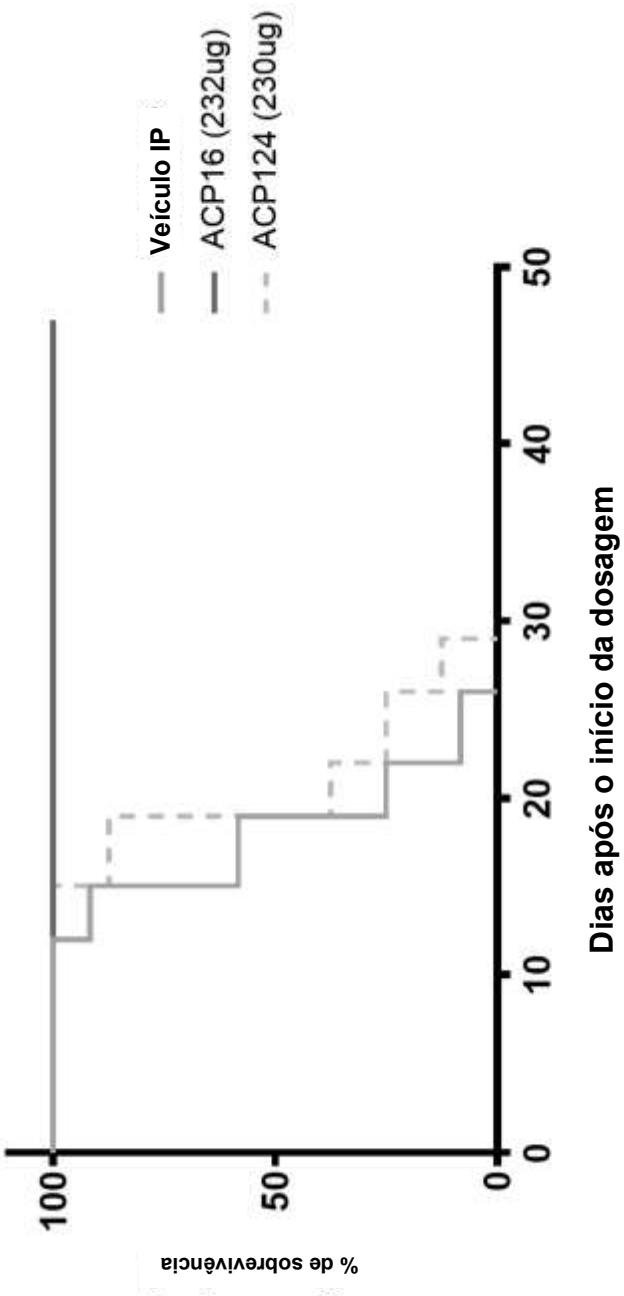

Veículo IP
ACP16 (232ug)
ACP124 (230ug)
% de sobrevivência
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 34C

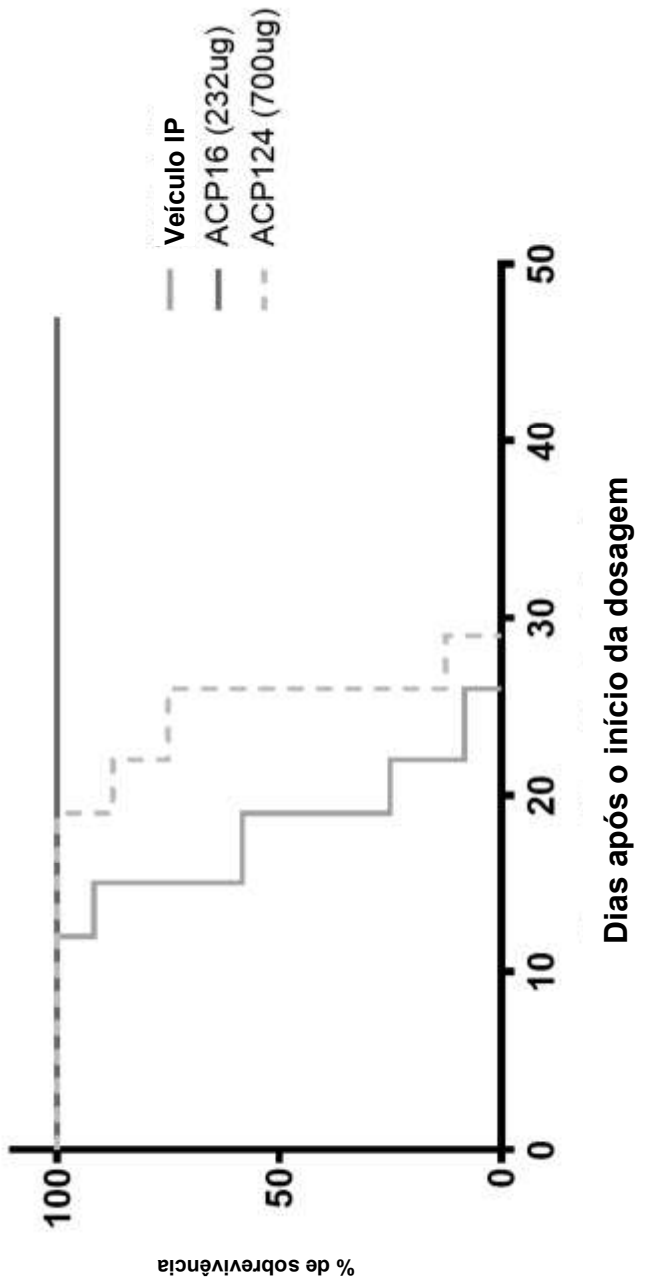

Veículo IP
ACP16 (232ug)
ACP124 (700ug)
% de sobrevivência
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 34D

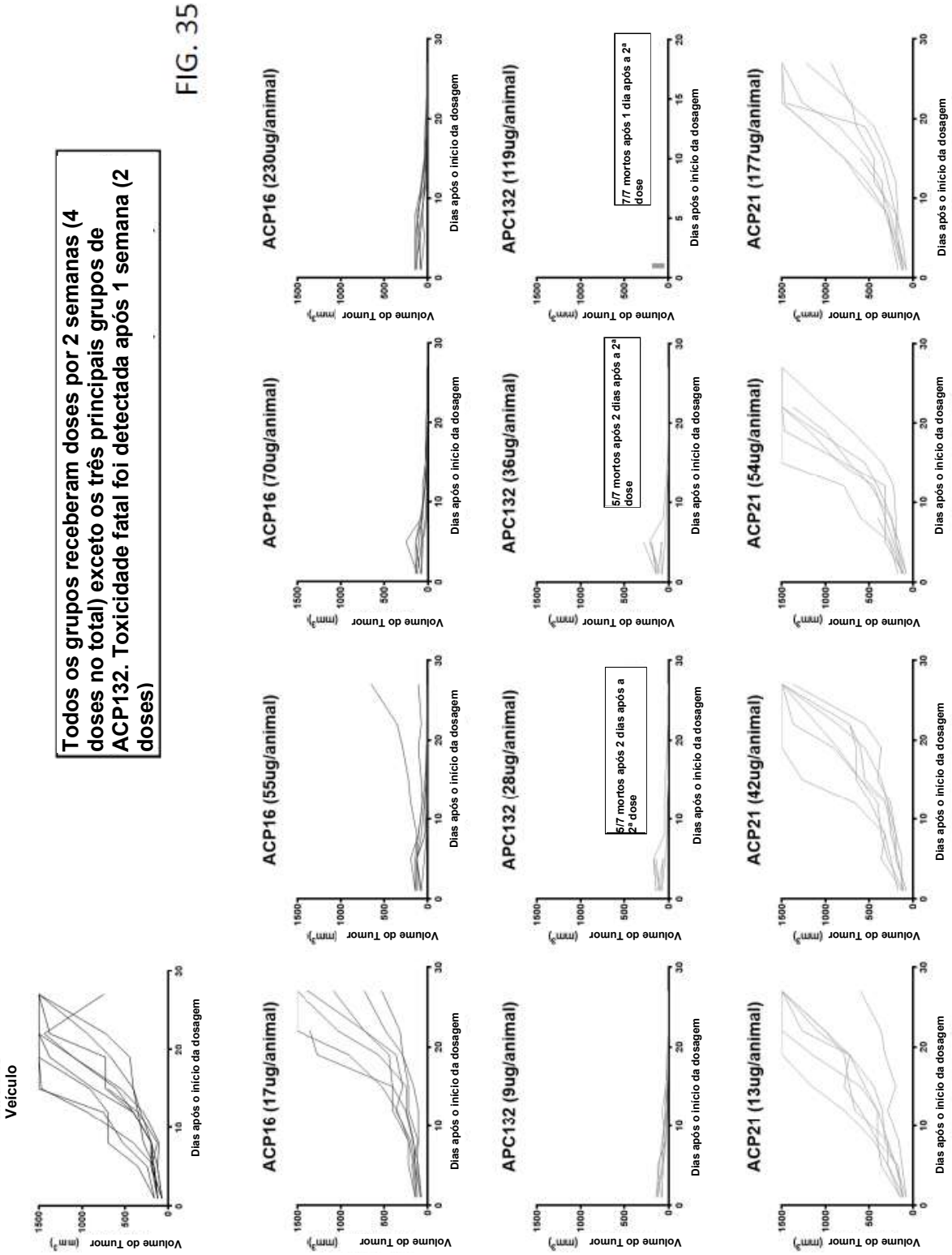
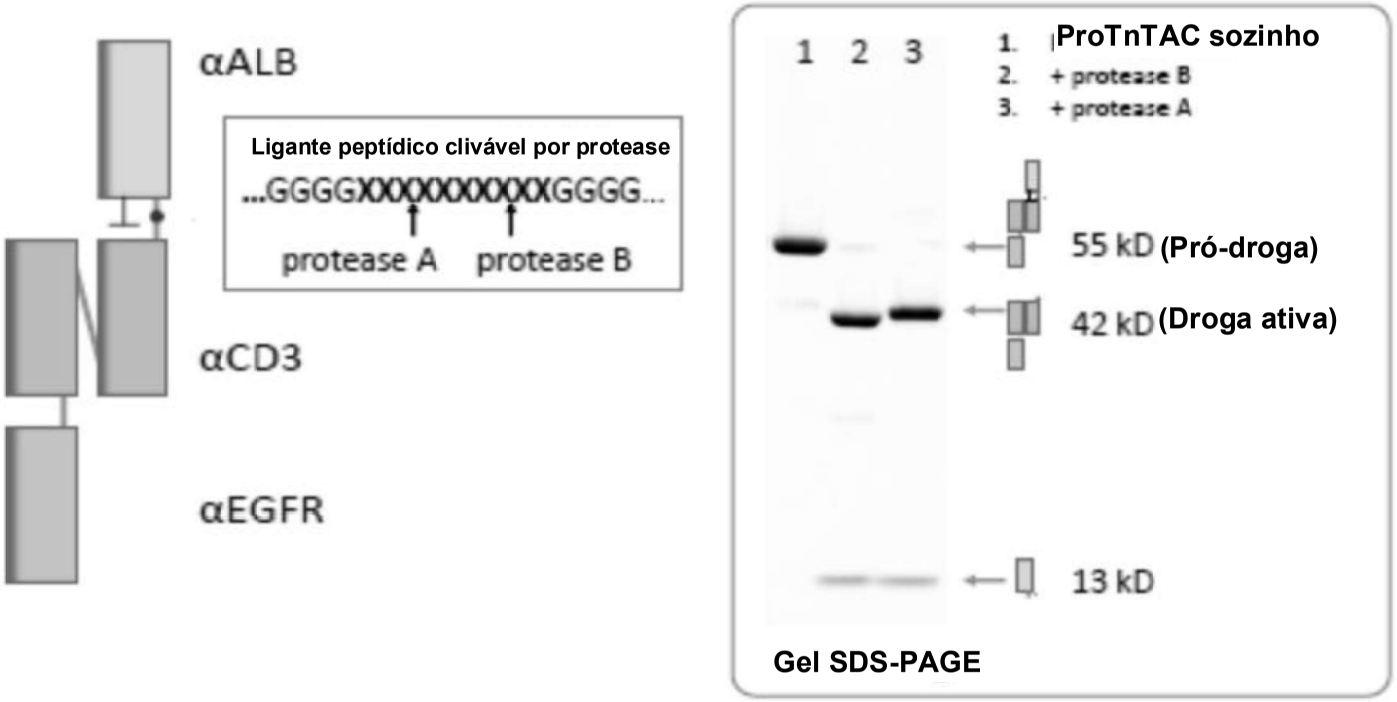

Todos os grupos receberam doses por 2 semanas (4 doses no total) exceto os três principais grupos de ACP132. Toxicidade fatal foi detectada após 1 semana (2 doses)
Veículo
ACP16 (17ug/animal)
ACP16 (55ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP16 (230ug/animal)
APC132 (9ug/animal)
APC132 (28ug/animal)
5/7 mortos após 2 dias após a 2ª dose
APC132 (36ug/animal)
5/7 mortos após 2 dias após a 2ª dose
APC132 (119ug/animal)
7/7 mortos após 1 dia após a 2ª dose
ACP21 (13ug/animal)
ACP21 (42ug/animal)
ACP21 (54ug/animal)
ACP21 (177ug/animal)
Volume do Tumor (mm³)
Dias após o início da dosagem

FIG. 35

ProTriTACs São Ativáveis por Proteases Associadas ao Tumor



- **Biblioteca proprietária do ligantes peptídicos de substrato com diferentes clivabilidades manipuladas**

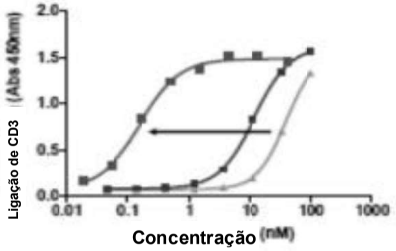
FIG. 36

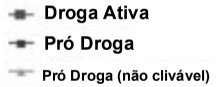
Petição 870210002936, de 11/01/2021, pág. 319/325

FIG. 37

Atividade Diferencial suportada por Diversos Ensaios In Vitro

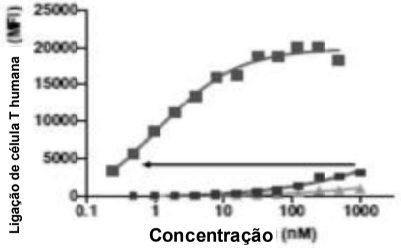
250X Diferencial em Ligação de CD3 (ELISA)

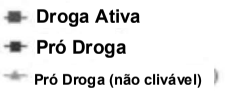




	EC_{50} (nM)	Razão de Mascaramento
Droga Ativa	0.16	-
Pró Droga	11.91	74
Pró Droga (não clivável)	39.44	247

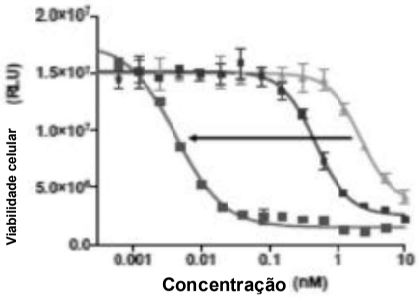
>1000X Diferencial em Ligação de Célula T Humana Primária (FACS)

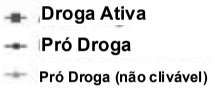




	EC50 (nM)	Razão de Mascaramento
Droga Ativa	1.19	-
Pró Droga	>1000	n/a
Pró Droga (não clivável)	>1000	n/a

550X Diferencial em Atividade de Assassinato de Célula T (TDCC)



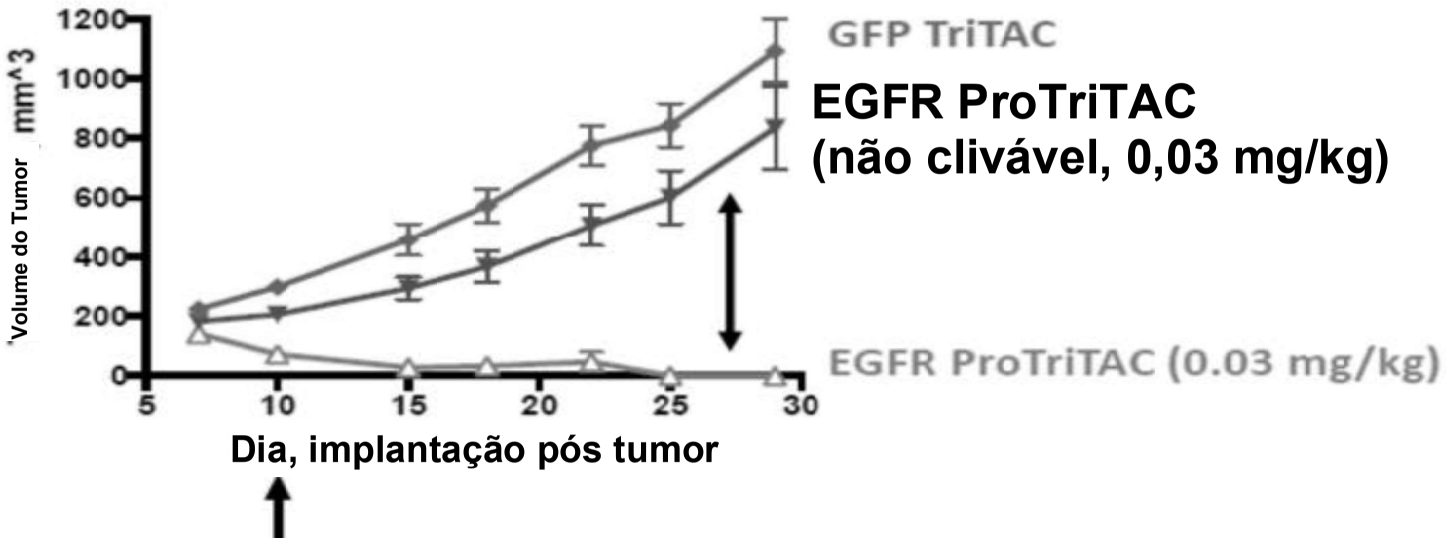


	EC50 (nM)	Razão de Mascaramento
Droga Ativa	0.004	-
Pró Droga	0.485	121
Pró Droga (não clivável)	2.197	549

- Plug-and-Play: mascaramento demonstrado com >20 ligantes peptídicos para 5 alvos diferentes

Petição 870210002936, de 11/01/2021, pág. 320/325

Atividade Anti-Tumor Potente, Dependente de Protease em Modelo de Xenoenxerto Colorretal de HCT116 em camundongos NCG



- ProTriTAC ativada não detectável em circulação
- Consistente com ativação intratumoral de ProTriTAC

FIG. 38

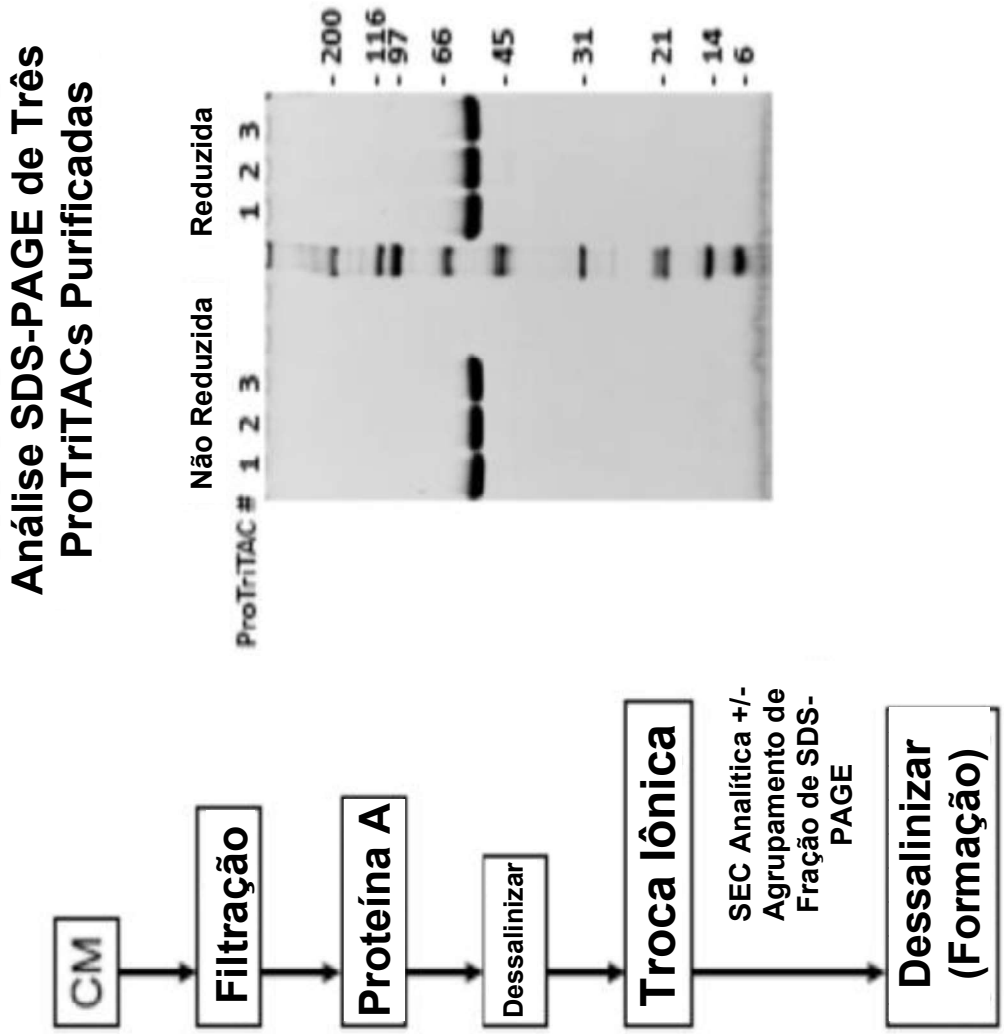
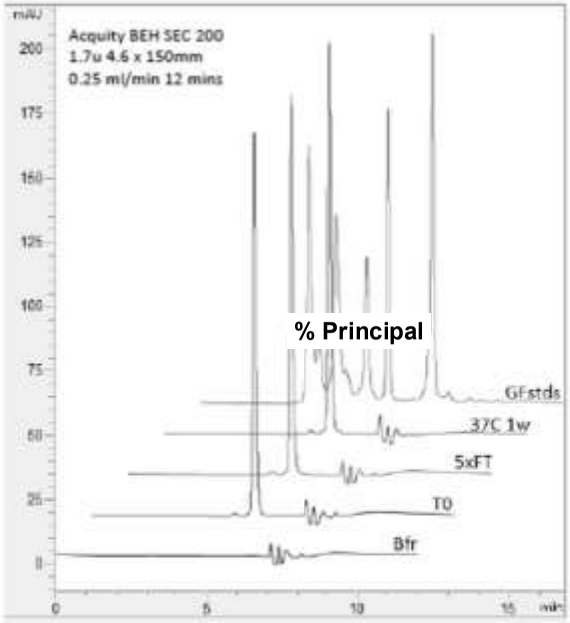

Análise SDS-PAGE de Três ProTriTACs Purificadas
ProTriTAC #
Não Reduzida
1 2 3
Reduzida
1 2 3
- 200
- 116
- 97
- 66
- 45
- 31
- 21
- 14
- 6
CM
Filtração
Proteína A
Dessalinizar
Troca Iônica
SEC Analítica +/- Agrupamento de Fração de SDS-PAGE
Dessalinizar (Formação)

FIG. 39

FIG. 40

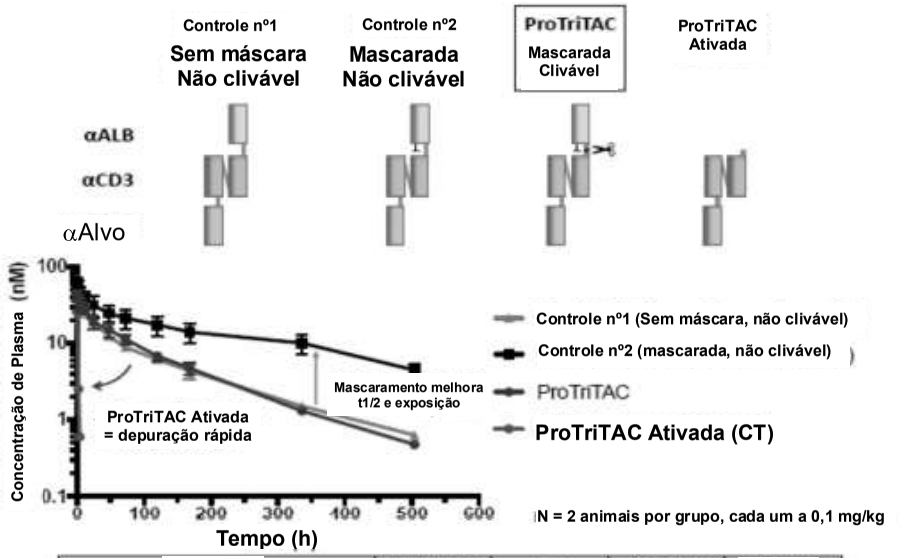
SEC Analítica de uma ProTriTAC Após Diferentes Condições de Estresse



Condição	% HMW	% Principal	% LMW
T0	1.7	96.0	2.3
5x FT	1.6	97.0	1.4
37C 1w	2.6	95.4	2.0

FIG. 41

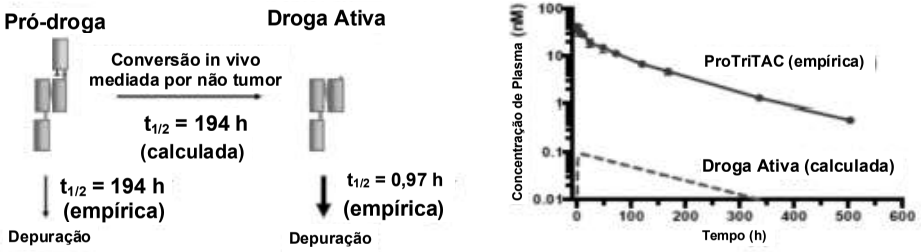
Estudo PK de Dose Única para Investigar Mascaramento Funcional e Estabilidade de ProTriTAC em Macaco Cynomolgus



Artigo de teste	Terminal $t_{1/2}$ (hr)	C_{max} (nM)	AUC, 0-last (hr*nM)	Depuração (mg/h/kg)
Controle nº1 (Sem máscara, não-clivável)	118	48.2	2490	0.735
Controle nº2 (Mascarada, não-clivável)	211	58.0	7000	0.238
ProTriTAC	101	42.7	2670	0.686
ProTriTAC Ativada (CT)	0.969	66.6	41.5	58.5

Proteção Dupla Contra Atividade No Alvo, Fora do Tumor

- Ligação periférica de célula T (conforme demonstrado por PK melhora a partir de mascaramento)
- Depuração rápida de droga ativa em circulação



- Ligante peptídico de substrato suficientemente estável em circulação: 50%de conversão a cada 194 h
- Droga ativa não acumula em circulação: abaixo de 0,5% de pró-droga todo o tempo

RESUMO

“POLIPEPTÍDEOS DE CITOCINA ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DESTES”

A divulgação apresenta proteínas de fusão que são variantes condicionalmente ativas de uma citocina de interesse. Em um aspecto, os polipeptídeos de comprimento total da invenção têm atividade de ativação do receptor de citocina reduzida ou mínima, embora contenham um polipeptídeo de citocina funcional. Após a ativação, por exemplo, por clivagem, de um ligante que se une a uma fração de bloqueio, por exemplo, um polipeptídeo de bloqueio estérico, em sequência à citocina ativa, a citocina pode ligar seu receptor e efetuar a sinalização. Normalmente, as proteínas de fusão compreendem ainda um elemento de prolongamento da meia-vida in vivo, que pode ser clivado a partir da citocina no microambiente tumoral.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.TXT
- Data de Geração do Código: 11/01/2021
- Hora de Geração do Código: 09:52:32
- Código de Controle:
  - Campo 1: 3751466149B18608
  - Campo 2: D5B19E2C0F1C49A0