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

(21) BR 112020023160-6 A2

(22) Data do Depósito: 14/05/2019

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

(54) Título: POLIPEPTÍDEOS DE INTERLEUCINA 2 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; 14/05/2018 US 62/671,225.

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

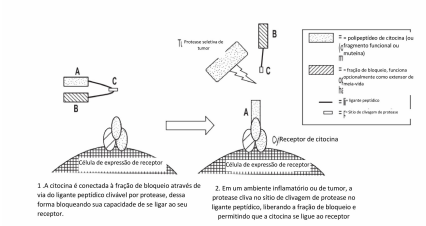
(72) Inventor(es): WILLIAM WINSTON; DANIEL HICKLIN; VINAY BHASKAR; LUKE EVNIN; PATRICK BAEUERLE; JOSE ANDRES SALMERON GARCIA; HEATHER BRODKIN; SHUOYEN JACK LIN; HOLGER WESCHE; CYNTHIA SEIDEL-DUGAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2019032321 de 14/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/222295 de 21/11/2019

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

(57) Resumo: A divulgação apresenta proteínas de fusão que são variantes condicionalmente ativas de IL-2. 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.



“POLIPEPTÍDEOS DE INTERLEUCINA 2 ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS”

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, depositado 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 105365-0021_SL.txt e tem um tamanho de 408.319 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), 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 IL-2. Em um aspecto, os polipeptídeos de comprimento total da invenção têm atividade de ativação do receptor de IL-2

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, IL-2 ou fragmento funcional ou muteína da mesma, 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 IL-2. 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. Preferencialmente, as proteínas de fusão são 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 IL-2, 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 IL-2, 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 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 IL-2 e, assim, bloquear a ativação do receptor cognato da IL-2.

[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, uma 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, 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.

[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 conforme descrito no Exemplo 2. 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] A **FIG. 11a-11c** é uma série de gráficos que retrata os resultados de um ensaio com repórter de IL-2 HEK-Blue realizados em proteínas de fusão de IL2 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).

[0034] A **FIG. 12a - 12b** são dois gráficos que mostram a análise

de ACP16 (12a) e ACP124 (12b) 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. 12c** 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.

[0035] A **FIG. 13a-13c** são três gráficos que mostram os resultados da análise de ACP16, ACP124 em um modelo de xenoenxerto de tumor. A **FIG. 13a** 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. 13b** 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. 13c** 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.

[0036] As **FIGs. 14a-14c** 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. 13. Cada linha nos gráficos é um único camundongo.

[0037] A **FIGs. 15** 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).

[0038] A **FIG. 16a-16d** é 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. 16a** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 17µg ACP16 (linha escura) e 1µg ACP124 (linha tracejada). A **FIG. 16b** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 70µg ACP16 (linha escura) e 70µg ACP124 (linha tracejada). A **FIG. 16c** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 232µg ACP16 (linha escura) e 230µg ACP124 (linha tracejada). A **FIG. 16d** mostra os dados para camundongos tratados apenas com veículo (linha cinza), 232µg ACP16 (linha escura) e 700µg ACP124 (linha tracejada).

[0039] A **FIG. 17** 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.

[0040] As **FIGs. 18-23** ilustram as propriedades dos polipeptídeos TriTac, que servem como proteínas de fusão cliváveis por protease exemplares.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0041] 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.

[0042] 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 a proteína de fusão). A forma da citocina que é liberada após a clivagem da proteína de fusão normalmente tem uma meia-vida curta, que muitas vezes é substancialmente semelhante à meia-vida da citocina de ocorrência natural, restringindo ainda mais a atividade da citocina ao microambiente tumoral. Mesmo que a meia-vida da proteína de fusão seja prolongada, a toxicidade é dramaticamente reduzida ou eliminada porque a proteína de fusão circulante é atenuada e a citocina ativa é direcionada ao microambiente tumoral. As proteínas de fusão descritas neste documento, pela primeira vez, permitem a administração de uma dose terapêutica eficaz de uma citocina para tratar tumores com a atividade da citocina substancialmente limitada ao microambiente tumoral e reduz drasticamente ou elimina efeitos sistêmicos indesejados e toxicidade do citocina.

[0043] 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.

[0044] "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.

[0045] 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 ainda retém a atividade agonista do receptor. Normalmente, um polipeptídeo de citocina com meia-vida curta, tal como um polipeptídeo de IL-2, tem uma meia-vida sérica que é comparável à IL-2 de ocorrência natural, por exemplo, dentro de 5 vezes, 4 vezes, 3 vezes ou 2 vezes da IL-2 de ocorrência natural. 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.

[0046] "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 (SEQ ID NO: 125) (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.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] 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.

[0050] 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.

[0051] 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.

[0052] 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.

[0053] 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.

[0054] 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.

[0055] 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.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 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.

[0059] 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.

[0060] 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.

[0061] 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*.

[0062] 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.

[0063] 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.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 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).

[0067] 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.

[0068] 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 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).

[0069] 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.

[0070] 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 lL2Rαβγ, 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.

[0071] 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 forte evidência 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.

[0072] 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.)

[0073] 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.

[0074] 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).

[0075] 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: 125) (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.

[0076] 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: 125). A fração de bloqueio ou outro elemento tem respectivos peptídeos anexados que servem como sítios aceptores para os polipeptídeos marcados. Para a conjugação com domínios que transportam um peptídeo aceptor LPXTG (SEQ ID NO: 125) 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: 125). Reconhecendo as sequências de poliglicina e LPXTG (SEQ ID NO: 125), 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.

[0077] 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 um polipeptídeo de IL-2 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 o polipeptídeo de IL-2 e a fração de bloqueio de IL-2 ou dentro da fração de bloqueio de IL-2. 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.

[0078] 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: 126) ou $(Gly_3Ser)_n$, (SEQ ID NO.: 127) 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: 125), 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.

[0079] Por conseguinte, conforme descrito em detalhes neste documento, as frações de bloqueio de citocina (por exemplo, frações de bloqueio de IL-2) 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.

[0080] 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.

[0081] 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.

[0082] 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.

[0083] 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).

[0084] 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 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. 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.

[0085] 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.

[0086] 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). 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.

[0087] 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.

[0088] 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.

[0089] 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.

[0090] 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.

[0091] 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: 128), IPVSLRSG (SEQ ID NO: 129), VPLSLYSG (SEQ ID NO. 130) ou SGESPAYYTA (SEQ ID NO. 131). 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.

[0092] 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.

[0093] 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.

Ligação de CD25

[0094] A ligação de CD25 é geralmente desencorajada em construtos de IL-2 modificada. Em contraste, os polipeptídeos de IL-2 descritos neste documento preferencialmente não são modificados para evitar a ligação do CD25. Preferencialmente, os polipeptídeos de IL-2 descritods neste documento se ligam ao CD25. Normalmente, as proteínas de fusão de IL-2 descritas neste documento são capazes de se ligar ao CD25 e o bloqueio é direcionado a interações com o IL-2R beta e gama (CD122 e CD132).

Fração de Bloqueio

[0095] 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.

[0096] 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

[0097] 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.

[0098] 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.

[0099] 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.

[00100] 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.

[00101] 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.

[00102] 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.

[00103] Em algumas modalidades, o elemento de prolongamento da meia-vida sérica se liga de forma não covalente diretamente à citocina e inibe sua atividade.

[00104] 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.

[00105] 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.

[00106] 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.

[00107] 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.

[00108] 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.

[00109] 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), uma 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

[00110] 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.

[00111] 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.

[00112] 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.

[00113] 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 dentre proteína alfa de ativação de fibroblastos (FAPa), glicoproteína de trofoblastos (5T4), transdutor 2 de sinal de cálcio associado a tumor (Trop2), fibronectina EDB (EDB-FN), domínio de fibronectina EIIIB, CGS-2, de EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA e FOLR1.

[00114] 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.

[00115] 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.

[00116] 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.

[00117] 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

[00118] 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.

[00119] 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, 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.

[00120] 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.

[00121] 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).

[00122] 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, osteopontina, PDGF, VEGF	Tipo de serina protease; modula a atividade de fatores de 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,	Tipo de serina protease específica de mastócitos

	clivando proteínas após resíduos de aminoácidos aromáticos	
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**

[00123] 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.

[00124] As composições fornecidas neste documento têm uma função desejada. As composições são constituídas por pelo menos um polipeptídeo de IL-2, 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.

[00125] 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.

[00126] 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: 126) ou $(Gly_3Ser)_n$, (SEQ ID NO: 127), 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: 125), 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

[00127] 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.

[00128] 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

[00129] 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.

[00130] 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.

[00131] 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.

[00132] 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

[00133] 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.

[00134] 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.

[00135] 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

[00136] 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.

[00137] Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um polipeptídeo de IL-2, uma fração de bloqueio e um elemento de prolongamento da meia-vida. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de IL-2 é posicionado entre o elemento de prolongamento da meia-vida e a fração de bloqueio. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de IL-2 é do terminal N para a fração de bloqueio e o elemento de prolongamento da meia-vida. Em algumas dessas modalidades, o polipeptídeo de IL-2 é proximal à fração de bloqueio; em algumas de tais modalidades, o polipeptídeo de IL-2 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 o polipeptídeo de IL-2 possa ser ativo após a clivagem. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de IL-2 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. Em algumas modalidades, é benéfico incluir duas da mesma citocina para facilitar a dimerização.

[00138] Em algumas modalidades, os domínios de bloqueio usados são capazes de prolongar a meia-vida e o polipeptídeo de IL-2 é posicionado entre dois desses domínios de bloqueio. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de IL-2 é posicionado entre dois domínios de bloqueio, um dos quais é capaz de prolongar a meia-vida.

[00139] Em algumas modalidades, duas citocinas estão incluídas no mesmo construto, com pelo menos uma sendo a IL-2. 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.

[00140] 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.

[00141] 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

[00142] 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.

[00143] 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.

[00144] 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: 132), GSGSGS (SEQ ID NO: 133) ou G $(SGGG)_2$SGGT (SEQ ID NO: 134). 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: 128), IPVSLRSG (SEQ ID NO: 129), VPLSLYSG (SEQ ID NO: 130) e SGESPAYYTA (SEQ ID NO: 131).

[00145] 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.

[00146] 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, 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.

[00147] 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.

[00148] 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.

[00149] 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.

[00150] 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.

[00151] 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.

[00152] 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.

[00153] 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.

[00154] 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.

[00155] 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.

[00156] 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.

[00157] 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).

[00158] 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).

[00159] 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.

[00160] 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.

[00161] 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.

[00162] 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.

[00163] 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).

[00164] 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.

[00165] 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.

[00166] 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.

[00167] 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.

[00168] 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.

[00169] 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.

[00170] 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.

[00171] 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 IL2Rβ. Como IL-2 tem afinidade indetectável para IL2Rγ, 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 IL2Rα e a capacidade de ligar e ativar o complexo de receptor IL2Rαβγ.

[00172] 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).

[00173] Além disso, podem ser feitos mutantes que alteram seletivamente a afinidade para a cadeia de CD25 em relação à IL-2 nativa.

[00174] 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).

[00175] 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.

[00176] 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.

[00177] 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).

[00178] 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.

[00179] As publicações citadas neste documento e os materiais citados são especificamente incorporados por referência, em sua totalidade, neste documento.

EXEMPLOS

[00180] 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 IL-2Rγ em Proteínas de Fusão por ELISA

[00181] 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 IL-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 lavagem, um anticorpo marcado com biotina 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

[00182] 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 **FIG. 10,** uma clivagem total das proteínas de fusão pela protease MMP9 é observada.

Exemplo 3: Ensaio de CTLL-2

[00183] 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. 7-9.**

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

[00184] 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

[00185] 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

[00186] 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 IL-2 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 IL-2 na presença de uma protease.

Geração de um domínio de ligação scFv CD20

[00187] 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.

[00188] 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" ou “G_4S” subunidade $(G_4S)_3$ 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

[00189] 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). 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 para facilitar a secreção e purificação de proteínas, respectivamente.

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

[00190] 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.

[00191] 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.

[00192] 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.

[00193] 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.

[00194] 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

[00195] 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

[00196] As proteínas IL2 ativáveis do Exemplo 6 são testadas quanto às suas afinidades de ligação a células $CD20^+$ humanas e células $CD20^+$ de cynomolgus.

[00197] As células $CD20^+$ são incubadas com 100 µL de diluições em série das proteínas interleucina ativáveis do Exemplo 6 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).

[00198] 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

[00199] A proteína IL2 ativável do Exemplo 6 é avaliada *in vitro* na sua mediação da resposta imune a células-alvo CD20$^+$.

[00200] 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.

[00201] 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 IL2 ativáveis

[00202] A proteína IL2 ativável do Exemplo 6 é avaliada quanto à

meia-vida de eliminação em estudos com animais.

[00203] 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.

[00204] 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.

[00205] 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

[00206] Espera-se que a proteína IL2 ativável do Exemplo 6 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

[00207] A proteína IL2 ativável do Exemplo 6 é avaliada em um modelo de xenoenxerto.

[00208] 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.

[00209] Espera-se que os animais tratados com a proteína IL2 ativável do Exemplo 6 tenham um atraso estatisticamente significativo no crescimento tumoral em comparação com o respectivo grupo de controle tratado com veículo.

[00210] 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 HEK Blue

[00211] 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. 11**.

Exemplo 12: Experimentos de MC38

[00212] 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 12a: 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
5	7	ACP16	55ug/animal	ip	bissemanalmente x 3
6	7	ACP16	17µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
7	7	ACP132	361 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
8	7	ACP132	119µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
9	7	ACP132	36 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
10	7	ACP132	28µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
11	7	ACP132	9 µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
12	7	ACP21	540µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
13	7	ACP21	177µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
14	7	ACP21	54µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
15	7	ACP21	42µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
16	7	ACP21	13µg/animal	ip	bissemanalmente x 3
17	7	ACP133	210µg/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
18	7	ACP133	105µg/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
19	7	ACP133	40µg/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
20	7	ACP133	3µg/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

Exemplo 12b: 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

Exemplo 12c: 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 17.

Exemplo 12d: Re-exposição a MC38

Camundongos curados (tratados com ACP16) do Exemplo 12b 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 12b) 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 12b). 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. 15.

Exemplo 13. Proteínas de Fusão Condicionalmente Ativas Que Contêm Uma Fração Bloqueadora Que É Um Domínio de Ligação à Albumina Sérica

[00213] 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: 137)

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

[00214] 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.

[00215] 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).

[00216] 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).

[00217] 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

[00218] 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

[00219] 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: 136). 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

[00220] 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.

[00221] 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

[00222] Dose única de ProTriTAC direcionado a PSMA (SEQ ID NO: 119), ProTriTAC não clivável (SEQ ID NO: 120), TriTAC não mascarado/não clivável (SEQ ID NO: 123) e ProTriTAC ativado por protease que mimetiza o fármaco ativa (SEQ ID NO: 121) 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.

[00223] 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.

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

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

[00224] 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.

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

[00225] 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

[00226] Os resultados do Exemplo 13 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.

[00227] As sequências de aminoácidos das proteínas de fusão utilizadas no Exemplo 13 são fornecidas como SEQ ID NO: 116-123.

[00228] 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**
ACP63	**anti-FN CGS-2 scFv (Vh/Vl)-6xHis**
ACP12	**(anti-EpCAM)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-bloqueador-6xHis**
ACP13	**(anti-EpCAM)-Bloqueador2-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-IL2-6xHis**
ACP14	**Bloqueador2-Ligante peptídico-(lig. cliv.)-IL2- (lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis**
ACP15	**Bloqueador2-Ligante peptídico-(anti-HSA)-Ligante peptídico-(lig. cliv.)- IL2 -6xHis**
ACP16	**IL2-(ligante peptídico clivável)-(anti-HSA)-Ligante peptídico-(lig. cliv.)-Bloqueador2-6xHis**

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

ACP43	**IL2-(lig. cliv.)-Ligante peptídico-CD25ecd-Ligante peptídico-(anti-HSA)-6xHis**
ACP44	**IL2-(lig. cliv.)-Ligante peptídico-CD25ecd-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis**
ACP45	**(anti-HSA)-(lig. cliv.)-Bloqueador2-Ligante peptídico-(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)-Ligante peptídico-IL2-(Ligante peptídico clivável)-(anti-HSA)-Ligante peptídico-Bloqueador2-6xHis**
ACP48	**IL2-(lig. cliv.)-Bloqueador2-Ligante peptídico-(anti-HSA)-6xHis**
ACP49	**IL2-(lig. cliv.)-Ligante peptídico-Bloqueador2-Ligante peptídico-(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)-Ligante peptídico-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis**
ACP100	**(anti-EpCAM)-Ligante peptídico-IL2-6xHis**
ACP101	**IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-6xHis**
ACP102	**(anti-EpCAM)-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Ligante peptídico-bloqueador-6xHis**
ACP103	**IL2-(lig. cliv.)-Ligante peptídico-Bloqueador2-Ligante peptídico-(anti-HSA)-Ligante peptídico-(antiI-FOLR1)-6xHis**

ACP104	**(anti-FOLR1)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Ligante peptídico-Bloqueador2-6xHis**
ACP105	**Bloqueador2-Ligante peptídico-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-(anti-HSA)-Ligante peptídico-(anti-FOLR1)-6xHis**
ACP106	**(anti-FOLR1)-Ligante peptídico-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-bloqueador-Ligante peptídico-(lig. cliv.)-IL2 -6xHis**
ACP107	**Bloqueador2-Ligante peptídico-(anti-HSA)-(lig. cliv.)-IL2-Ligante peptídico-(anti-FOLR1)-6xHis**
ACP108	**(anti-EpCAM)-IL2-(lig. Duplamente cliv.)-(anti-HSA)-Ligante peptídico-bloqueador-6xHis**
ACP117	**anti-FN CGS-2 scFv (Vh/Vl)-6xHis**
ACP118	**NARA1 Vh/Vl não clivável**
ACP119	**NARA1 Vh/Vl clivável**
ACP120	**NARA1 Vl/Vh não clivável**
ACP121	**NARA1 Vl/Vh clivável**
ACP124	**IL2-Ligante peptídico-(anti-HSA)-Ligante peptídico-Ligante peptídico-bloqueador_(controle_não clivável)**
ACP132	**IL2-L-HSA**
ACP141	**IL2-L-hAlb**
ACP142	**IL2-(lig. cliv.)-hAlb**
ACP144	**IL2-(lig. cliv.)-HSA-LX-bloqueador-L-FOLR1**
ACP145	**FOLR1-L-IL2-(lig. cliv.)-HSA-LX-bloqueador**
ACP146	**FOLR1-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-HSA-LX-bloqueador**
ACP133	**IL-2-6x His**
ACP147	**IL2-(lig. cliv.)-HSA-LX-bloqueador-L-TAA**
ACP148	**TAA-L-IL2-(lig. cliv.)-HSA-LX-bloqueador**
ACP149	**TAA-(lig. cliv.)-IL2-(lig. cliv.)-HSA-LX-bloqueador**
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 CTESLVNGRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALV ELVKHK PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKET CFAEEGKKLVAASQAALGL
45	ACP12 (Proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlldlqmilngin nyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrpr dlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPG PAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPG KGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSAS FRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
46	ACP13 (Proteína	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT

	de fusão de IL2)	QVTVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDS SSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ NVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFG GGTKVEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGN SLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGM KGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfym pkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettf mceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
47	ACP14 (Proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAP KALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggg gsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkkt qlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpl eevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwi tfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH

48	ACP15 (Proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAP KALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggg gsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsSGG PGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpklt rmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninviv lelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
49	ACP16 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgg ggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLP GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTL AWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALD YWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGK APKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH

50	ACP17 (Proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilngin nyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrpr dlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPG PAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggg gsggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVA AIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYP YTFGGGTKVEIKHHHHHH
51	ACP18 (Proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilngin nyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrpr dlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPG PAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggg gsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

		SYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWD ALDYWGQGTTVTVSSsggpgpagmkglpgsDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAP KALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
52	ACP19 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggs ggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSS YTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV GTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGT KVEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggs QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSHHHHHH**
53	ACP20 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGK GLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYL

		QMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASF RYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
54	ACP21 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggs ggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSS YTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV GTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGT KVEIKHHHHHH
55	ACP22 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggs ggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSS YTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV GTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGT KVEIKSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR

		PEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsg gggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDI MSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYW GKGTQVTVSSHHHHHH
56	ACP23 (Proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNSVMA WYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYWGQG TQVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWV AAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTY PYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsgggg sSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGL PGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkat elkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmcey adetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
57	ACP24 (Proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAP KALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE

		DFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKSGGPGPAGMK GLPGSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympk katelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfm ceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
58	ACP25 (Proteína de fusão de IL2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAW VRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAP KALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggg gsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkkt qlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpl eevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwi tfcqsiistltHHHHHH
59	ACP26 (Proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehllldlqmilngin nyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrpr dlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPG PAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsQV QLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVK QRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFD VWGAGTTVTVSSggggsggggsggggsDIVLTQSPASLA

		VSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQP PKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEE DAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKHHHHHHHEPEA
60	ACP27 (Proteína de fusão de IL2)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSggggsggggsggggsaptssstkktqlqlehlllldlqmilngin nyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrpr dlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPG PAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLY AESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsDIV LTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNW YQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFT LNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKgg ggsggggsggggsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKAS GYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYN EKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCA RWRGDGYYAYFDVWGAGTTVTVSSHHHHHHHEPEA
61	ACP28 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggs ggggsggggsggggsQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCK ASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTN YNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYF CARWRGDGYYAYFDVWGAGTTVTVSSggggsggggsg gggsDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSG

		SGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGT KLEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggs QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSW YRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGT QVTVSSHHHHHHEPEA
62	ACP29 (Proteína de fusão de IL2)	aptssstkktqlqlehlldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhl qcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadet ativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggs ggggsggggsggggsDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKA SQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNE DPYTFGGGTKLEIKggggsggggsggggsQVQLQQSGAE LVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLE WIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQ LSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFDVWGAGTTV TVSSggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG RDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQ VQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWY RQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQ VTVSSHHHHHHEPEA
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	ACP63 Anti-FN CGS-2 scFv	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGVGAFRPYRKHEWGQGTLVTVSRggggsgggg sggggsSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYA SWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGN TASLTTTGAQAEDEADYYCNSSPFEHNLVVFGGGTK LTVLHHHHHHEPEA
67	ACP38 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVR GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSN WDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQ QKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggs ggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFT FSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGG GLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQR ELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHH HHH
68	ACP39 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSSGGPGPAGMKGLPG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ GTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEW VAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTY PYTFGGGTKVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktql qlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkple

		evlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitf cqsiistltHHHHHH**
69	ACP40 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcelcdddppeiphatfkamaykegtmlnce ckrgfrriksgslymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqk erkttemqspmqpvdqaslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvy yqcvqgyralhrgpaesvckmthgktrwtqpqlictgemetsqfpgeekp qaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatmetsiftteyqgggsgggs ggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptsss tkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleee lkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefln rwitfcqsiistltHHHHHH
70	ACP41 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggselcddd ppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksgslymlctgnsshsswd nqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdqaslpghcr epppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthgk trwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtem aatmetsiftteyqHHHHHH
71	ACP42 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGR DTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggselcd ddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksgslymlctgnsshss wdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdqaslpg hcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmt hgktrwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqt emaatmetsiftteyqggggsggggsggggsggggsggggsggggs SGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyk npkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlis ninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
72	ACP43 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggselcddd ppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksgslymlctgnsshsswd nqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdqaslpghcr epppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthgk trwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtem aatmetsiftteyqggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH

73	ACP44 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggselcdddppeiphatfkamaykegtmlnceckrgfrriksgslymlctgnsshsswdnqcqctssatrnttkqvtpqpeeqkerkttemqspmqpvdqaslpghcrepppweneateriyhfvvgqmvyyqcvqgyralhrgpaesvckmthgktrwtqpqlictgemetsqfpgeekpqaspegrpesetsclvtttdfqiqtemaatmetsiftteyqSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
74	ACP45 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
75	ACP46 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSsggpgpagmkglpgsDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYD

		DSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCN ALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHH
76	ACP47 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptss stkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqclee elkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefl nrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGL VQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsg gggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAID SSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTF GGGTKVEIKHHHHHH
77	ACP48 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVR GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSN WDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQ QKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggs ggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFT FSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
78	ACP49 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQ APGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIY SASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY

		YCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSHHHHHH
79	ACP92 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGR DTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSSGGPGPAGMKGLPG Saptssstkktqlqlehlllqlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelk hlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyad etativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS HHHHHH
80	ACP93 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSgsgsgsgsgsgsgsgsQVQLQESGGGLVQAGGSLR LSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTI SYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVY YCNALYGTDYWGKGTQVTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVR QAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALI YSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKSGGPGPAGMKGLP GSaptssstkktqlqlehlllqlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkate lkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceya detativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
81	ACP94 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV

		TVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSS YTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV GTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGT KVEIKSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmil nginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknf hlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHH HHHH
82	ACP95 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSgsgsgsgsgsgsgsgsEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmiln ginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhl rprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHH HHH
83	ACP96 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSSGGPGPAGMKGLPG Saptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelk hlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyad etativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS HHHHHH
84	ACP97 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSSGGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmiln ginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhl rprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGG PGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA

		ASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDT LYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
85	ACP99 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptss stkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqclee elkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefl nrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGL VQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSHHHH HH
86	ACP100 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptss stkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqclee elkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefl nrwitfcqsiistltHHHHHH
87	ACP101 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFT FSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSHHHHHH
88	ACP102 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSSGGPGPAGMKGLPG Saptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelk hlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyad etativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSg gggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEW VAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSG

		VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTY PYTFGGGTKVEIKHHHHHH
89	ACP103 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQ APGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIY SASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAGGSLS LSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVG STNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTA VYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHHHHH
90	ACP104 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLS CAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGST NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVY VCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSaptssstkktqlqlehlllqlqm ilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknf hlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSG GPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSC AASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRD TLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVY YCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsgggg sggggsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTV RGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS NWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWY QQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHH HHHH
91	ACP105 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYT YSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGT NVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSG

		SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTK VEIKggggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAG MKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfy mpkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgse ttfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGS EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ GTLVTVSSggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQAG GSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAII NSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKP EDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHHHHH
92	ACP106 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLS CAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGST NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVY VCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSggggsggggsggggsEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWV RQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRD NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTL VTVSSSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAI DSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYT FGGGTKVEIKggggsggggsggggsggggsggggsggggsSG GPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknp kltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisnin vivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH
93	ACP107 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYT YSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGT NVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTK VEIKggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSS GGPGPAGMKGLPGSaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsg

		gggsQVQLQESGGGLAQAGGSLSLSCAASGFTVSNS VMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGSTNYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYVCNRNFDRIYW GQGTQVTVSSHHHHHH
94	ACP108 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptss stkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqclee elkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativefl nrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSrgetgpaaPGSEVQ LVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV TVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggsEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGK GLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASF RYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHH
95	ACP117 Anti-FN CGS-2 scFv	mdmrvpaqllgllllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGVGAFRPYRKHEWGQGTLVTVSRggggsgggg sggggsSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYA SWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGN TASLTTTGAQAEDEADYYCNSSPFEHNLVVFGGGTK LTVLHHHHHHHEPEA
96	ACP118 NARA1 Vh/Vl não clivável	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQQSGAELVRPGTSVKVS CKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGG TNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAV YFCARWRGDGYYAYFDVWGAGTTVTVSSggggsggg gsggggsDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDY DGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPARFS GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFG GGTKLEIKHHHHHHHEPEA
97	ACP119 NARA1 Vh/Vl clivável	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQQSGAELVRPGTSVKVS CKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGG TNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAV YFCARWRGDGYYAYFDVWGAGTTVTVSSSGGPGP AGMKGLPGSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQS VDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGIPA

		RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPY TFGGGTKLEIKHHHHHHHEPEA
98	ACP120 NARA1 Vl/Vh não clivável	mdmrvpaqllglllwlrgarcDIVLTQSPASLAVSLGQRATISC KASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNL ESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQS NEDPYTFGGGTKLEIKggggsggggsggggsQVQLQQSG AELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQG LEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFDVWGAGT TVTVSSHHHHHHHEPEA
99	ACP121 NARA1 Vl/Vh clivável	mdmrvpaqllglllwlrgarcDIVLTQSPASLAVSLGQRATISC KASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNL ESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQS NEDPYTFGGGTKLEIKSGGPGPAGMKGLPGSQVQL QQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQR PGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYYAYFDVW GAGTTVTVSSHHHHHHHEPEA
100	ACP124 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsg gggsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVS SQGTLVTVSSHHHHHHEPEA
101	ACP132 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsg gggsdahksevahrfkdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvklvnevte faktcvadesaencdkslhtlfgdklctvatlretygemadccakqepern ecflqhkddnpnlprlvrpevdvmctafhdneetflkkylyeiarrhpyfyap ellffakrykaafteccqaadkaacllpkldelrdegkassakqrlkcaslqkf gerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdllecaddra dlakyicenqdsissklkeccekpllekshciaevendempadlpslaadf veskdvcknyaeakdvflgmflyeyarrhpdysvvllrlaktyettlekcca aadphecyakvfdefkplveepqnlikqncelfeqlgeykfqnallvrytkk vpqvstptlvevsrnlgkvgskcckhpeakrmpcaedylsvvlnqlcvlhe ktpvsdrvtkccteslvnrrpcfsalevdetyvpkefnaetftfhadictlseke rqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekcckaddketcfaee gkklvaasqaalglHHHHHHEPEA
102	ACP141	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltggggsggggsg gggsdahksevahrfkdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvklvnevte

	Proteína de fusão de IL-2	faktcvadesaencdkslhtlfgdklctvatlretygemadccakqepern ecflqhkddnpnlprlvrpevdvmctafhdneetflkkylyeiarrhpyfyap ellffakrykaafteccqaadkaacllpkldelrdegkassakqrlkcaslqkf gerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdllecaddra dlakyicenqdsissklkeccekpllekshciaevendempadlpslaadf veskdvcknyaeakdvflgmflyeyarrhpdysvvlllrlaktyettlekcca aadphecyakvfdefkplveepqnlikqncelfeqlgeykfqnallvrytkk vpqvstptlvevsrnlgkvgskcckhpeakrmpcaedylsvvlnqlcvlhe ktpvsdrvtkcctеslvnrrpcfsalevdetyvpkefnaetftfhadictlseke rqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekcckaddketcfaee gkklvaasqaalglHHHHHHEPEA
103	ACP142 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSdahksevahrfkdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvkl vnevtefaktcvadesaencdkslhtlfgdklctvatlretygemadccakq epernecflqhkddnpnlprlvrpevdvmctafhdneetflkkylyeiarrh pyfyapellffakrykaafteccqaadkaacllpkldelrdegkassakqrlk caslqkfgerafkawavarlsqrfpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdlle caddradlakyicenqdsissklkeccekpllekshciaevendempadl pslaadfveskdvcknyaeakdvflgmflyeyarrhpdysvvlllrlaktyet tlekccaaadphecyakvfdefkplveepqnlikqncelfeqlgeykfqnal lvrytkkvpqvstptlvevsrnlgkvgskcckhpeakrmpcaedylsvvln qlcvlhektpvsdrvtkcctеslvnrrpcfsalevdetyvpkefnaetftfhadi ctlsekerqikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekcckaddk etcfaeegkklvaasqaalglHHHHHHEPEA
104	ACP144 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAG MKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFT FSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAES VKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGG SLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsgg gggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAID SSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTF GGGTKVEIKggggsggggsggggsQVQLQESGGGLAQA GGSLSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAI INSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKP

		EDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSHHHHHHHEP EA
105	ACP145 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLS CAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGST NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVY VCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSggggsggggsggggsapts sstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcle eelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativ eflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSgggg sggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLA WVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKA PKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHEPE A
106	ACP146 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLAQAGGSLSLS CAASGFTVSNSVMAWYRQTPGKQREFVAIINSVGST NYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVY VCNRNFDRIYWGQGTQVTVSSSGGPGPAGMKGLPG Saptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelk hlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyad etativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSg gggsggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGL PGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT LAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDAL DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPG KAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHE PEA
107	ACP133	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltHHHHHH

	IL-2-6xHis (“6xHis” divulgada como SEQ ID NO: 136)	
108	ACP147 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsgggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKggggsggggsggggsQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSHHHHHHEPEA
109	ACP148 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTISYDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCNALYGTDYWGKGTQVTVSSggggsggggsggggsaptsstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWG

		QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPK ALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
110	ACP149 Proteína de fusão de IL-2	mdmrvpaqllgllllwlrgarcQVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRIFSIDIMSWYRQAPGKQRELVARITRGGTIS YDDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYY CNALYGTDYWGKGTQVTVSSSGGPGPAGMKGLPG Saptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelk hlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyad etativeflnrwitfcqsiistltSGGPGPAGMKGLPGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSg gggsggggsggggsggggsggggsSGGPGPAGMKGL PGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYT LAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDAL DYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPG KAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHE PEA
111	ACP153 (conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllgllllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllldlqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpGPAGL YAQpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS KFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL SVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsgggg ssggpGPAGLYAQpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYT YSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGT NVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSG

		SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTK VEIKHHHHHHHEPEA
112	ACP154 (conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpPGGPAGIGpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggssggpPGGPAGIGpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
113	ACP155 (conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpALFKSSFPpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggssggpALFKSSFPpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHHHHEPEA
114	ACP156 (conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehllldlqmilnginnyknpkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisninvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpPLAQKLKSSpgsEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsggggsggggsggggsggggssggpPLAQKLKSSpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS

		GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGT NVGWYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTK VEIKHHHHHHHEPEA
115	ACP157 (conjugado de IL-2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcaptssstkktqlqlehlllqmilnginnykn pkltrmltfkfympkkatelkhlqcleeelkpleevlnlaqsknfhlrprdlisni nvivlelkgsettfmceyadetativeflnrwitfcqsiistltsggpPGGPA GIGalfkssfpPLAQKLKSSpgsEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSggggsggggsgg ggsggggsggggsggggssggpPGGPAGIGalfkssfpPLAQK LKSSpgsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYTYSPDTVRGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSNWD ALDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVGWYQQK PGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIKHHHHH HEPEA
116	EGFR (G8) Pró-droga C1486	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGKPLGLQARVVGGG GTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWASGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS*HHH HHH

117	EGFR (G8) Pró-droga não clivável C1756	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGG GTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWASGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLVTVSS*HHH HHH
118	EGFR (G8) Droga ativa C1300	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG SLTLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAIN WASGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTLV TVSS*HHHHHH

119	PSMA Pró-droga C1872	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGKPLGLQARVVGGG GTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYA ESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCD SYGYRGQGTQVTVSS*HHHHHH
120	PSMA Pró-droga não clivável C1873	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGRDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGG GTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY PNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYA*

		*ESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCD SYGYRGQGTQVTVSS*HHHHHH
121	PSMA Droga ativa C1875	VVGGGGTQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWV FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGS*EVQLVESGGGLVQPGG SLTLSCAASRFMISEYHMHWVRQAPGKGLEWVSTIN PAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYCDSYGYRGQGTQVTVSS*HHHHHH
122	GFP TriTAC C646	*QVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMR WYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTI SRDDARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFEYW GQGTQVTVSS*GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAIN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGN SYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLT VLHHHHHH

123	TriTAC não mascarado/não clivável C1874	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGVVGGGGTQTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGS GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEYH MHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDSYGYRGQG TQVTVSSHHHHHH	
124	Bloqueador 2 (bloqueador de IL2)	mdmrvpaqllglllwlrgarcEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYTLAWVRQAPGKGLEWVAAIDSSSYT YSPDTVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDSNWDALDYWGQGTTVTVSSggggsggggsggg gsDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVG WYQQKPGKAPKALIYSASFRYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQYYTYPYTFGGGTKVEIK HHHHHH

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00229] 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

[00230] 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 da fórmula:

[A]-[L1]-[B]-[L2]-[D] ou [A]-[L1]-[D]-[L2]-[B] ou [D]-[L2]-[B]-[L1]-[A] ou [B]-[L2]-[D]-[L1]-[A] ou [D]-[L1]-[B]-[L1]-[A] ou [B]-[L1]-[D]-[L1]-[A]

caracterizado pelo fato de que

A é um polipeptídeo de interleucina 2 (IL-2);

B é um elemento de prolongamento da meia-vida;

L1 e L2 são, independentemente, um ligante polipeptídico, em que L1 é um ligante polipeptídico clivável por protease e L2 é um ligante polipeptídico opcionalmente clivável por protease;

D é uma fração de bloqueio de IL-2; e

em que o polipeptídeo de fusão atenuou a atividade de ativação do receptor de IL-2, em que a atividade de ativação do receptor de IL-2 do polipeptídeo de fusão é pelo menos cerca 10X menor do que a atividade de ativação do receptor de IL-2 do polipeptídeo que contém o polipeptídeo de IL-2 que é produzido por clivagem do ligante clivável por protease L1.

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

a) um polipeptídeo de interleucina 2 (IL-2) [A];

b) uma fração de bloqueio de IL-2 [D]; e

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

em que o polipeptídeo de IL-2 e a fração de bloqueio de IL-2 estão operacionalmente ligados pelo ligante polipeptídico clivável por protease e o polipeptídeo de fusão atenuou a atividade de ativação do receptor de citocina, 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.

3. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a atividade do agonista do

fragmento contendo polipeptídeo de IL-2 do polipeptídeo clivado aumenta em pelo menos cerca 50X em comparação com o polipeptídeo de fusão não clivado.

4. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a atividade do agonista é avaliada usando um ensaio de proliferação CTLL-2, phospho STAT ELISA ou ensaio de células repórter HEK Blue.

5. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão não clivado se liga ao receptor alfa de IL-2 (IL-2Rα) de uma maneira substancialmente similar à IL-2 de ocorrência natural.

6. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio inibe a ativação do receptor alfa/beta/gama de IL-2 (IL-2R$\alpha\beta\gamma$) e receptor beta/gama de IL-2 (IL-2R$\beta\gamma$) pelo polipeptídeo de IL-2 no polipeptídeo de fusão não clivado.

7. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que cada 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), uma proteína de ativação de fibroblastos, uma metaloproteinase ADAM, um ativador de plasminogênio, uma catepsina, uma caspase, uma triptase e uma protease de superfície de células tumorais.

8. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **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.

9. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de IL-2 se liga não covalentemente ao polipeptídeo de IL-2.

10. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a ligação não covalente é dependente do pH.

11. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de IL-2 compreende um domínio de ligação ao ligante ou fragmento de um receptor cognato para IL-2, um anticorpo de domínio único, Fab ou scFv que se liga ao polipeptídeo de IL-2 ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, Fab, anticorpo de domínio único, scFv) que se liga a um receptor de IL-2.

12. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de IL-2 também é um elemento de prolongamento da meia-vida.

13. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8 ou 12, **caracterizado** pelo fato de que a porção de bloqueio de IL-2 bloqueia estericamente a atividade agonista do polipeptídeo de IL-2.

14. Polipeptídeo de fusão , de acordo com a reivindicação 12 ou 13, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de IL-2 é albumina sérica humana, ou um polipeptídeo de ligação ao antígeno que se liga à albumina sérica humana.

15. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, **caracterizado** pelo fato de que a IL-2 está livre para se dissociar da fração de bloqueio da IL-2 após o ligante polipeptídico clivável por protease ser clivado por uma protease.

16. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de fusão se liga a IL-2Rα.

17. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda pelo menos um elemento de prolongamento da meia-vida.

18. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida é albumina sérica humana ou um polipeptídeo de ligação ao antígeno que se liga à albumina sérica humana.

19. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o elemento de prolongamento da meia-vida é Fc de imunoglobulina.

20. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que a fração de bloqueio de IL-2 é albumina sérica humana, uma IgG humana, uma IgG humanizada, um sdAb, um Fab e scFv ou um fragmento destes.

21. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, **caracterizado** pelo fato de que a ativação do receptor de IL-2 é determinada usando um ensaio de ativação do receptor *in vitro* padrão e quantidades iguais em uma base molar do polipeptídeo de IL-2 e do polipeptídeo de fusão.

22. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, **caracterizado** pelo fato de que IL-2 está livre para se dissociar da fração de bloqueio de IL-2 e/ou do elemento de prolongamento da meia-vida após a sequência clivável por protease ser clivada por uma protease.

23. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19, **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.

24. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 23, **caracterizado** pelo fato de que L2 é um ligante polipeptídico clivável por protease.

25. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 24, **caracterizado** pelo fato de que L1 é um substrato para uma primeira protease e L2 é um substrato para uma segunda protease.

26. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 25, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um peptídeo de ligação ao antígeno tumoral específico.

27. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação ao antígeno tumoral específico está ligado ao polipeptídeo de IL-2 por um ligante não clivável.

28. Polipeptídeo de fusão, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação ao antígeno tumoral específico está ligado ao polipeptídeo de IL-2, ao elemento de prolongamento da meia-vida ou à fração de bloqueio de IL-2 por um ligante clivável.

29. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, **caracterizado** pelo fato de que a meia-vida sérica do polipeptídeo de IL-2 que é produzido por clivagem do ligante clivável por protease é comparável à meia-vida de IL-2 de ocorrência natural.

30. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 29, **caracterizado** pelo fato de que o polipeptídeo de IL-2 compreende uma deleção ou substituição do resíduo de cistina que corresponde a Cys125 da SEQ ID NO:.

31. Ácido nucleico **caracterizado** pelo fato de que codifica o polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30.

32. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende o ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 31.

33. Célula hospedeira **caracterizada** pelo fato de que compreende o vetor, de acordo com a reivindicação 32.

34. Método de preparação de uma composição farmacêutica **caracterizado** pelo fato de que compreende a cultura da célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 33, em condições adequadas para expressão e

coleta dos polipeptídeos desejados.

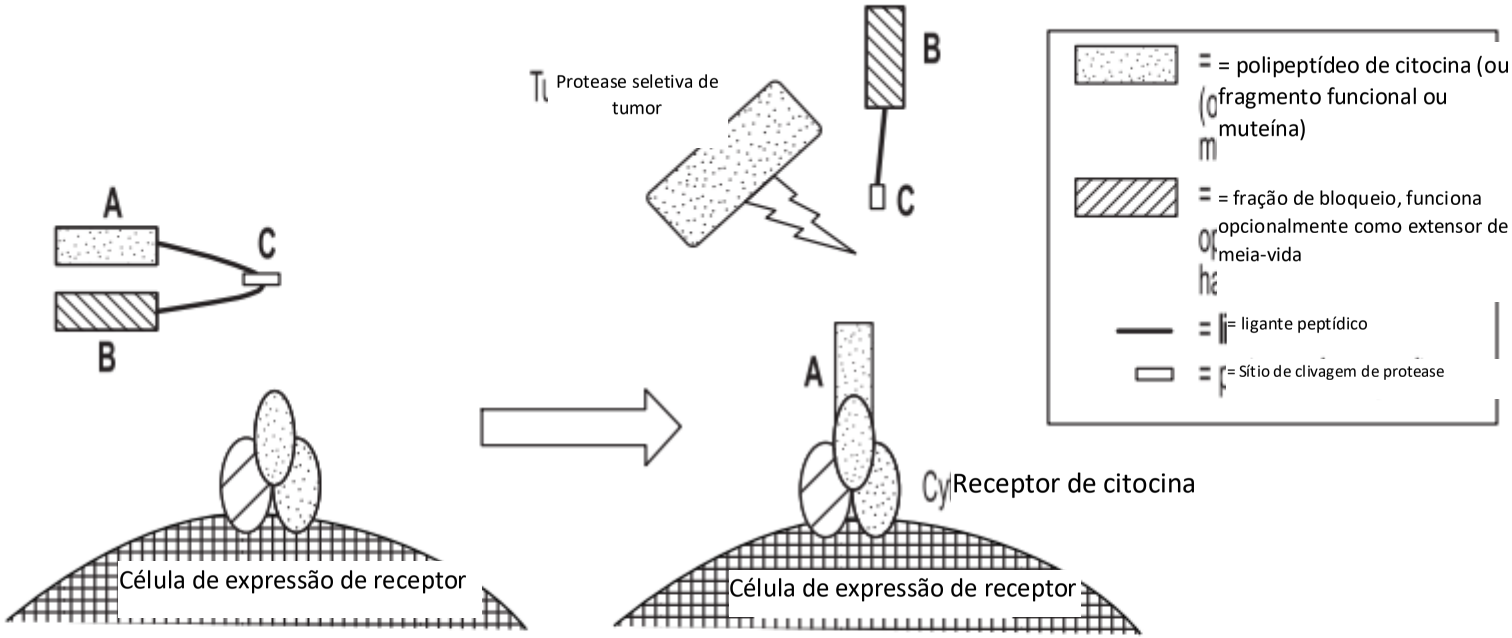
35. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende i) uma quantidade eficaz do polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30 e ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

36. Método para 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 de 1 a 30.

37. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30 , **caracterizado** pelo fato de que é para uso como um medicamento.

38. Polipeptídeo de fusão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30, **caracterizado** pelo fato de que é para uso no tratamento de um tumor em um sujeito em necessidade.

39. Composição farmacêutica para 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 de 1 a 30.

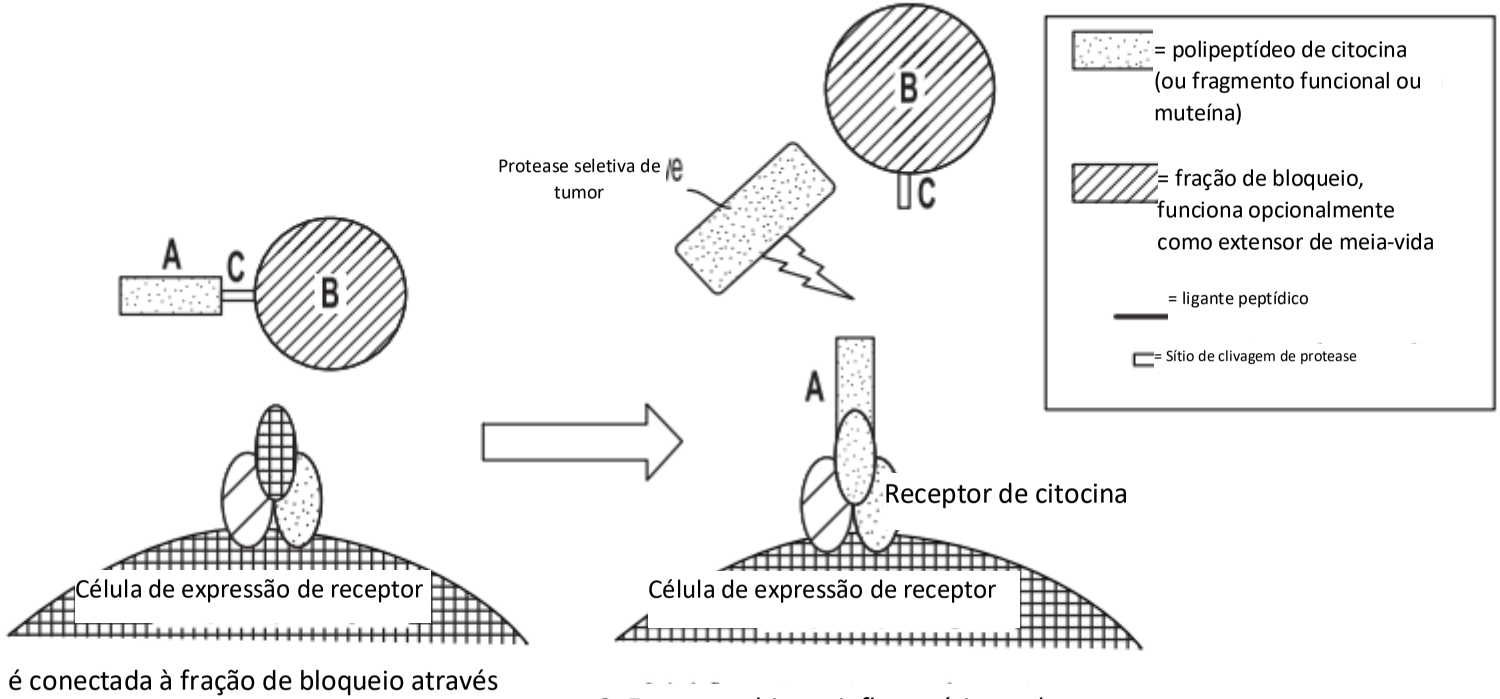


1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídico clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

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 se ligue ao receptor

FIG. 1a

HSA diretamente ligado

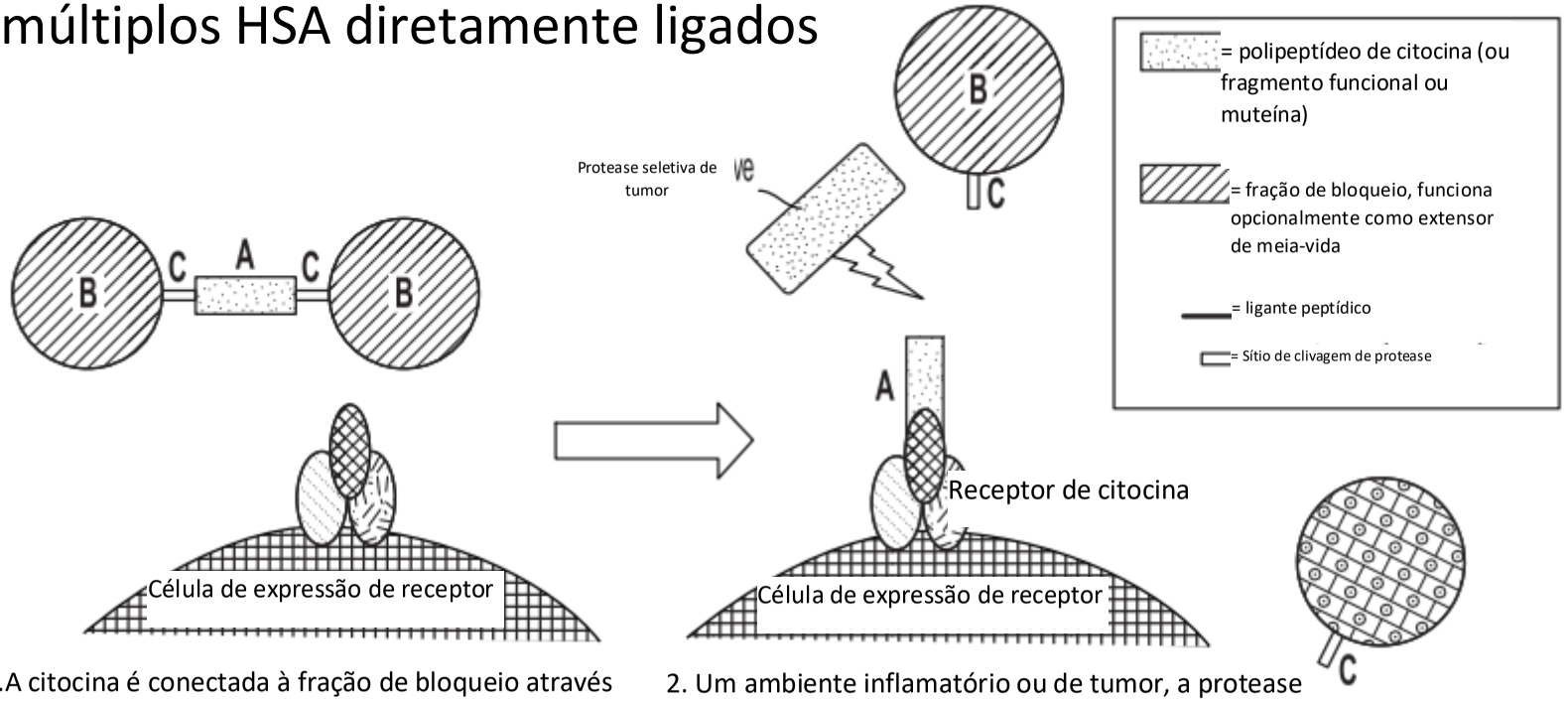


1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídeo clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

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 se ligue ao receptor

FIG. 1b

múltiplos HSA diretamente ligados

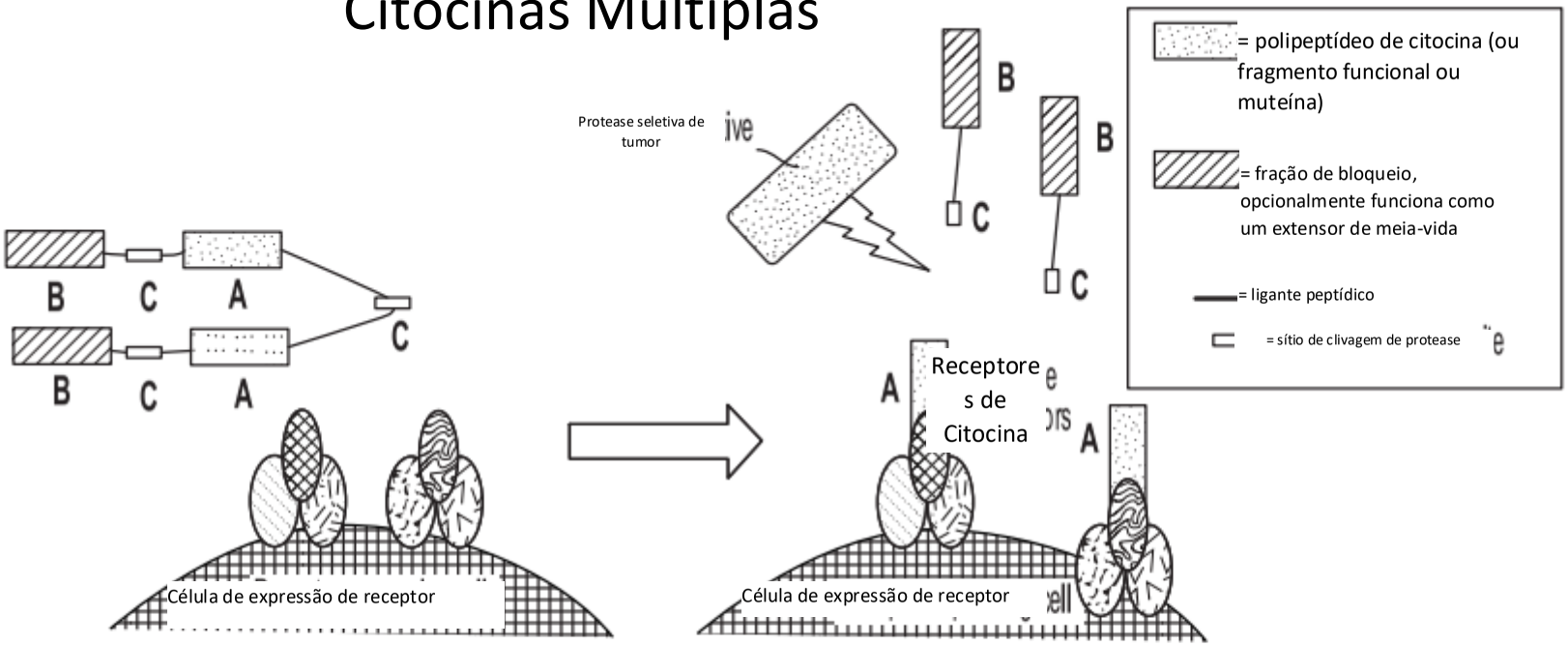


1 .A citocina é conectada à fração de bloqueio através de via do ligante peptídico clivável por protease, dessa forma bloqueando sua capacidade de se ligar ao seu receptor.

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. 1c

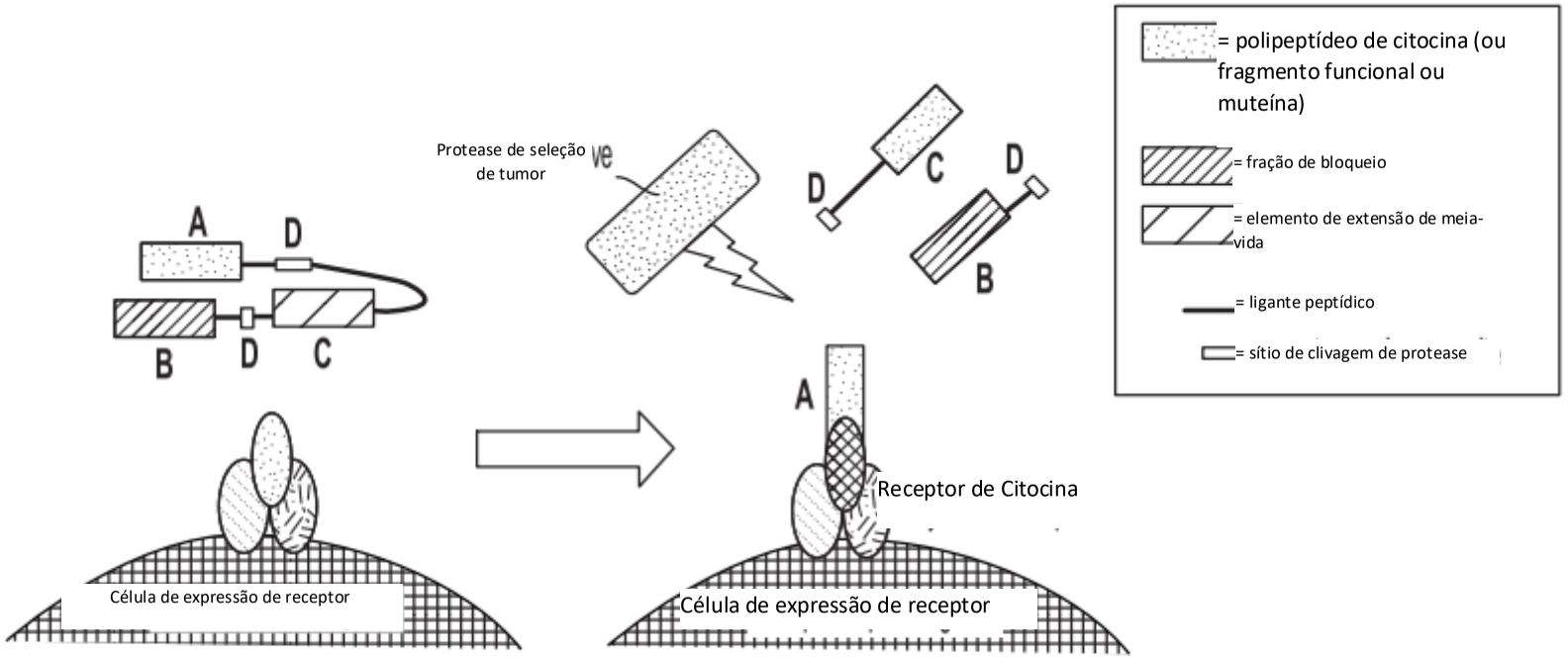
Citocinas Múltiplas



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.

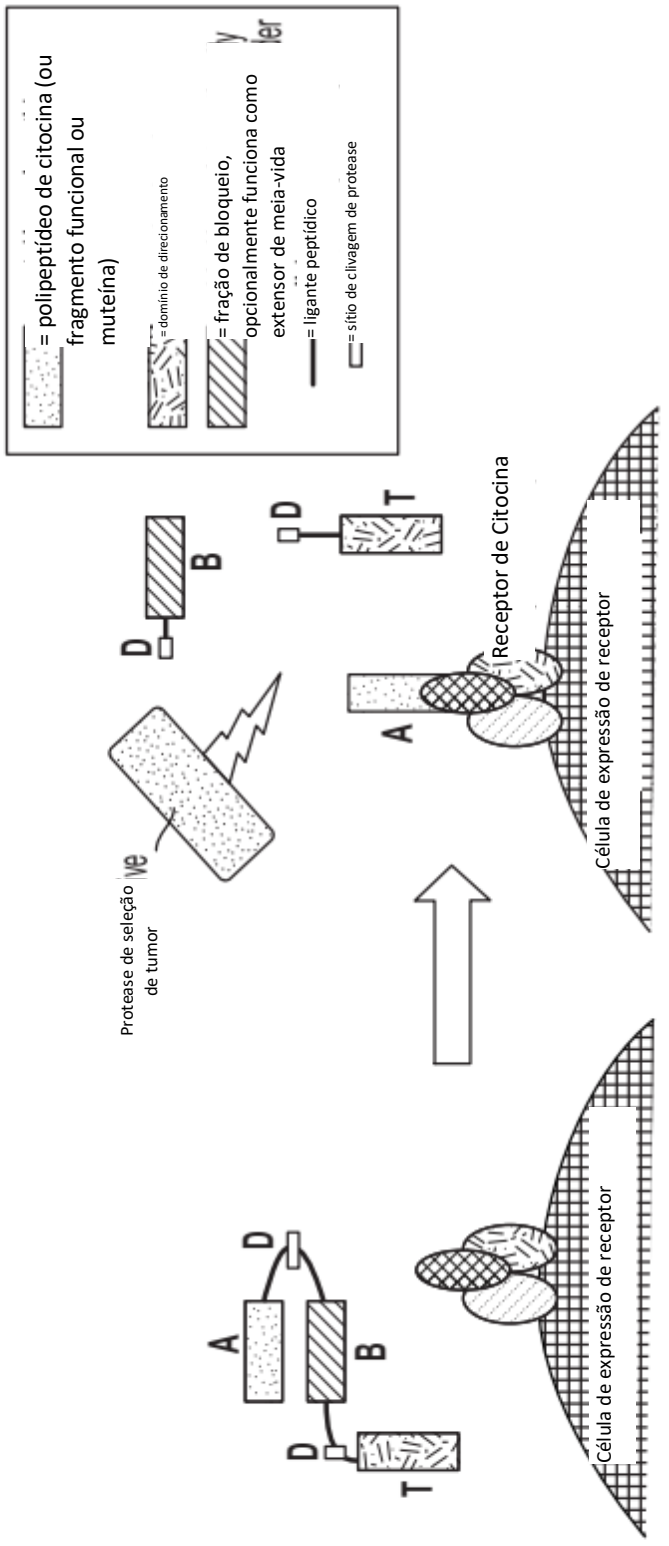
FIG. 1d



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 no soro.

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)

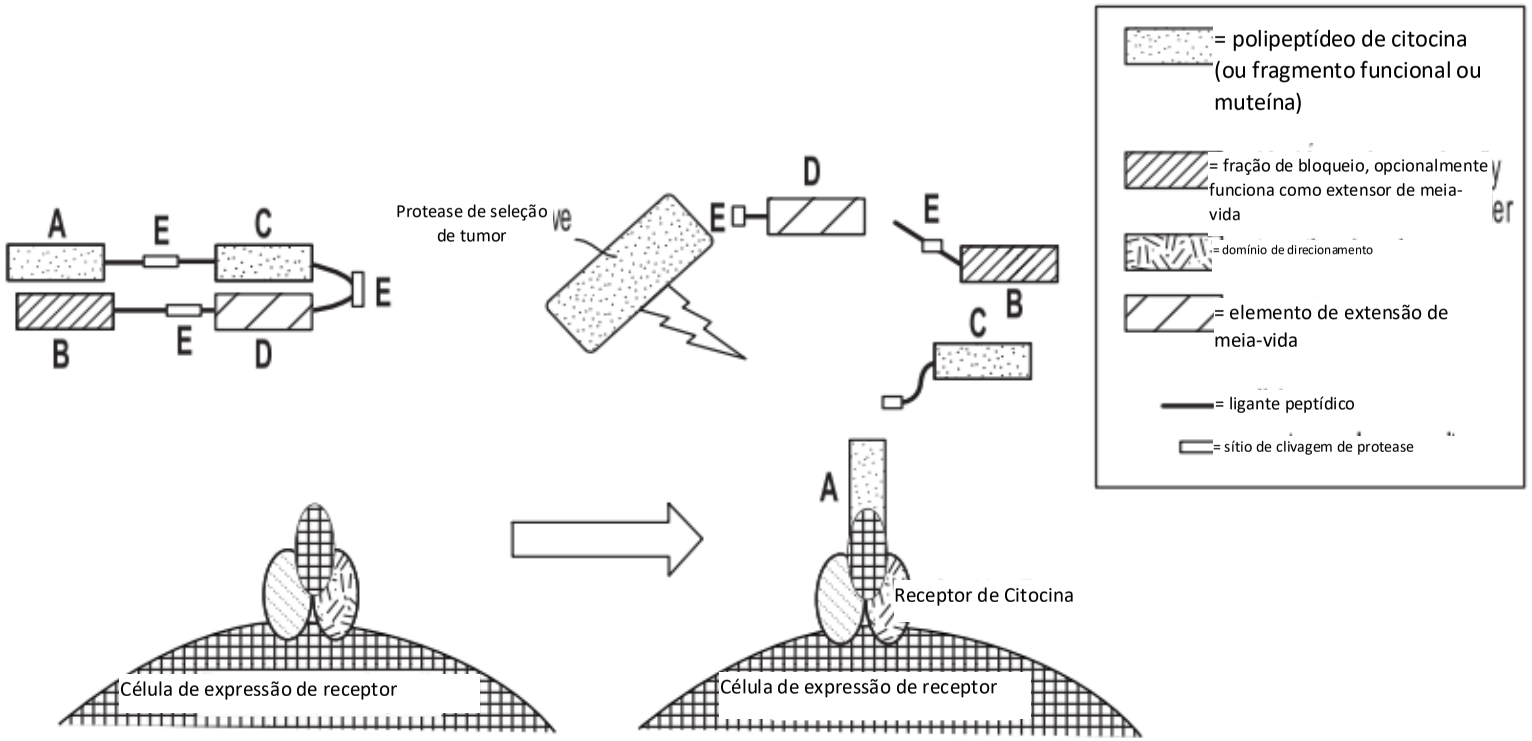
FIG. 2



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.

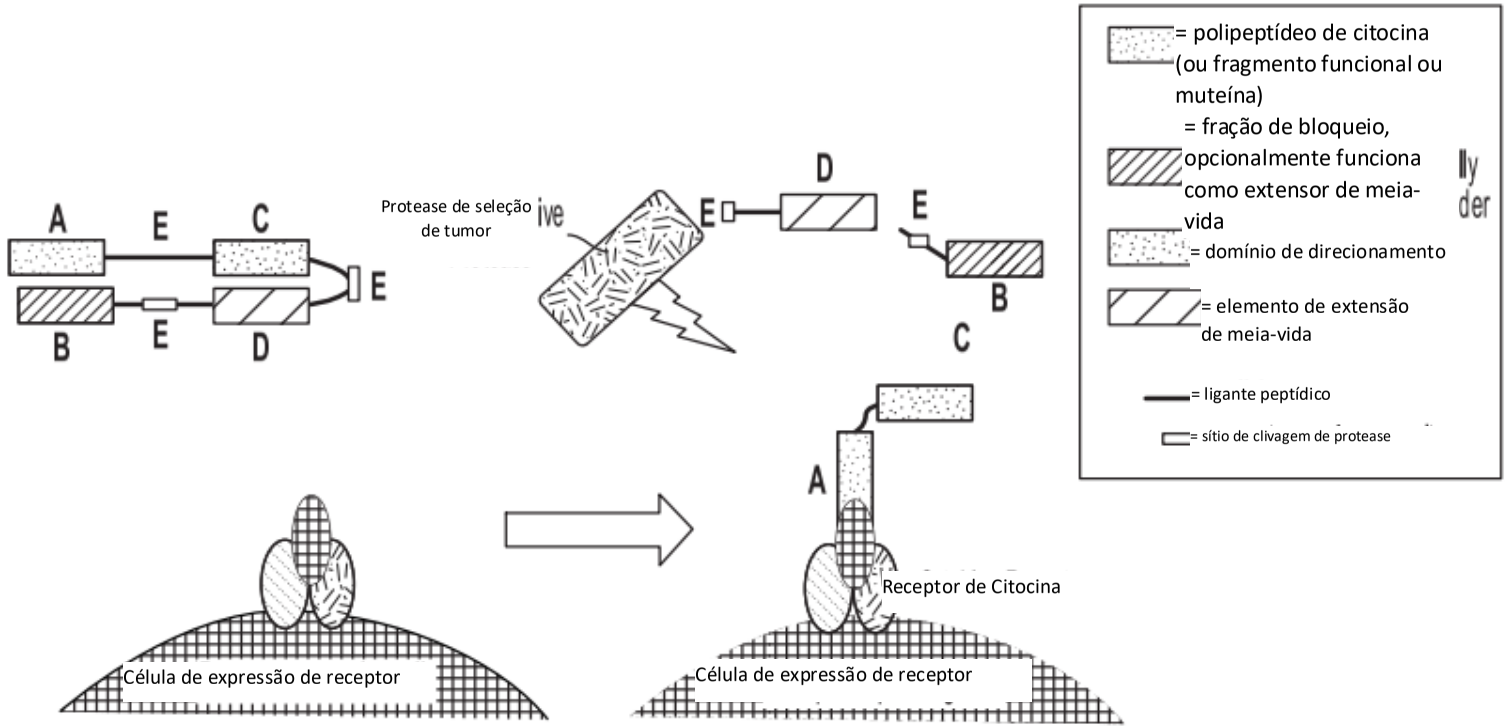
FIG. 3



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. 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 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. 4b

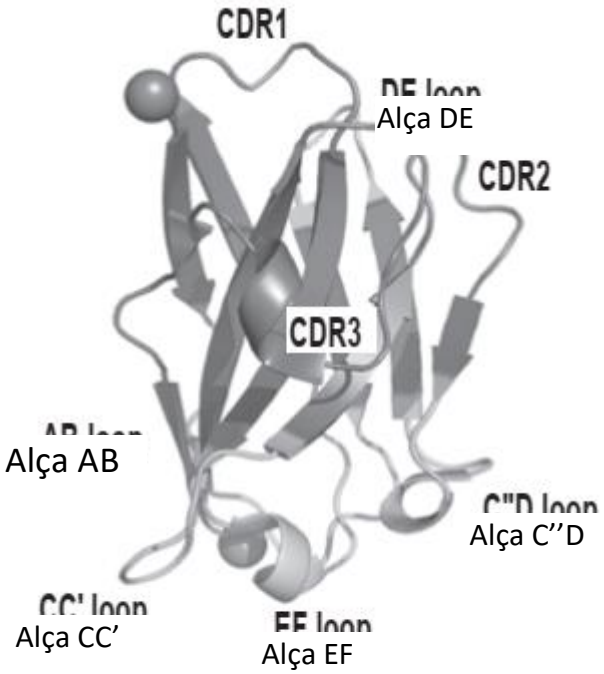


FIG. 5

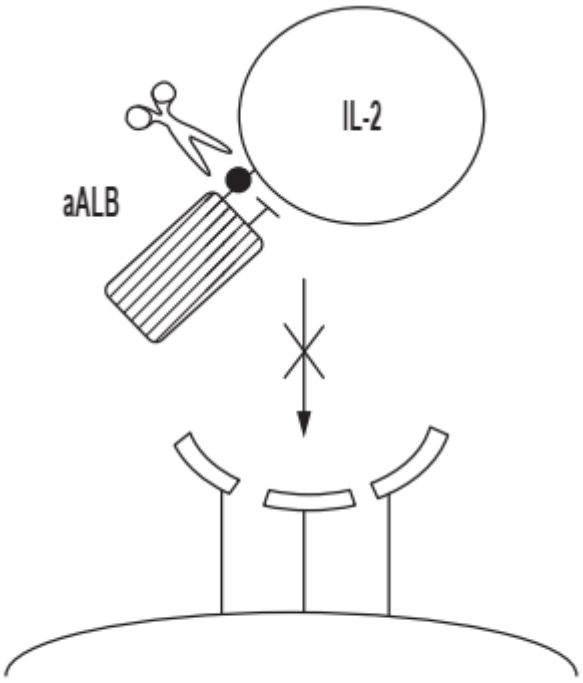


FIG. 6

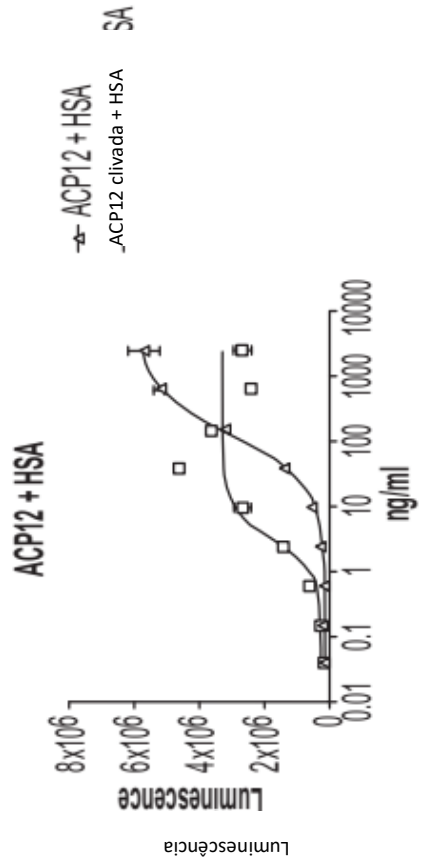


FIG. 7b

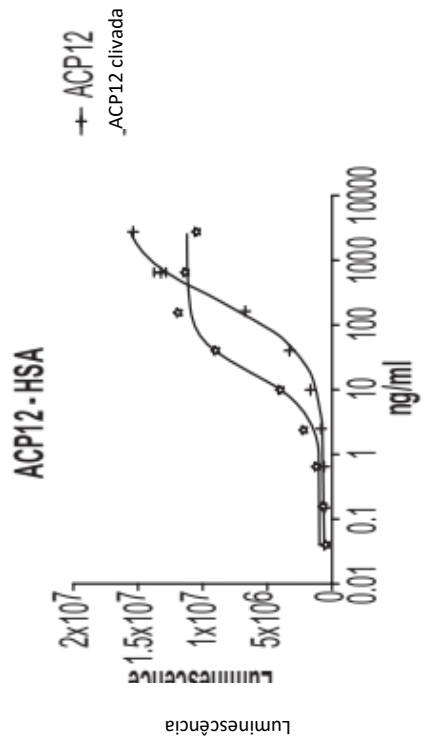


FIG. 7a

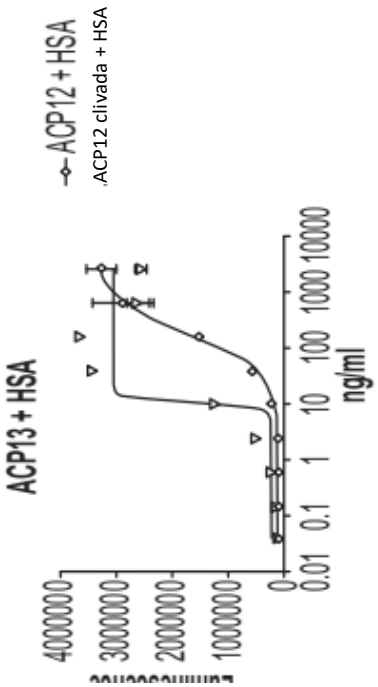


FIG. 7d

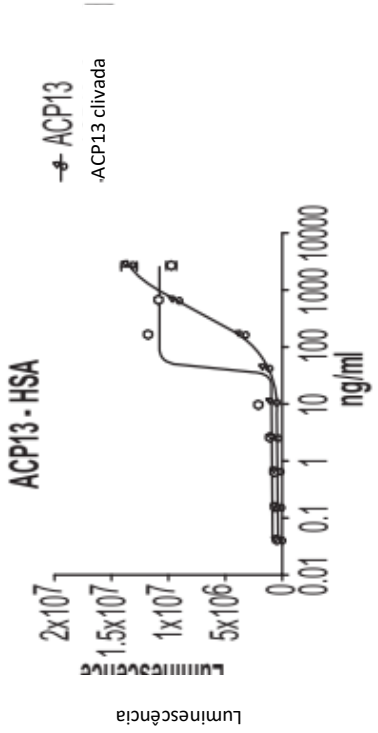


FIG. 7c

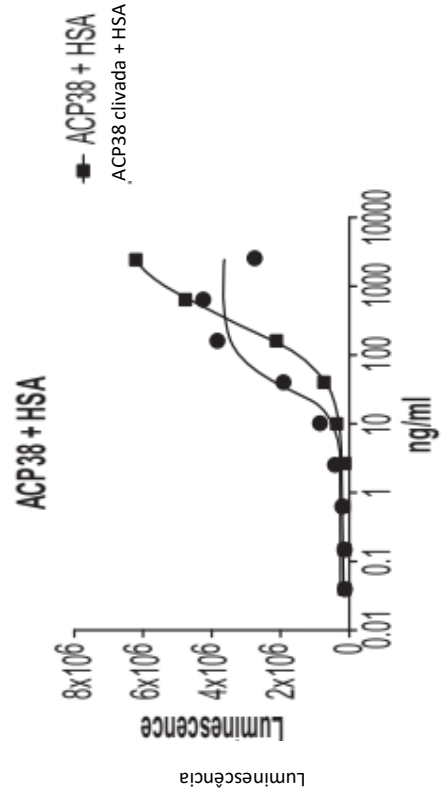


FIG. 7f

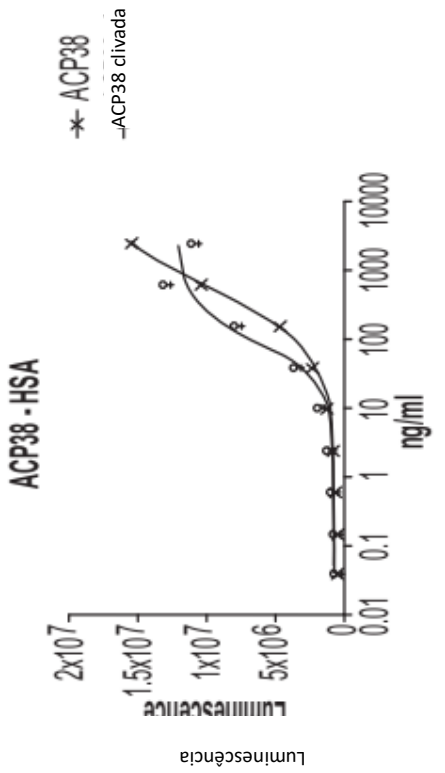


FIG. 7e

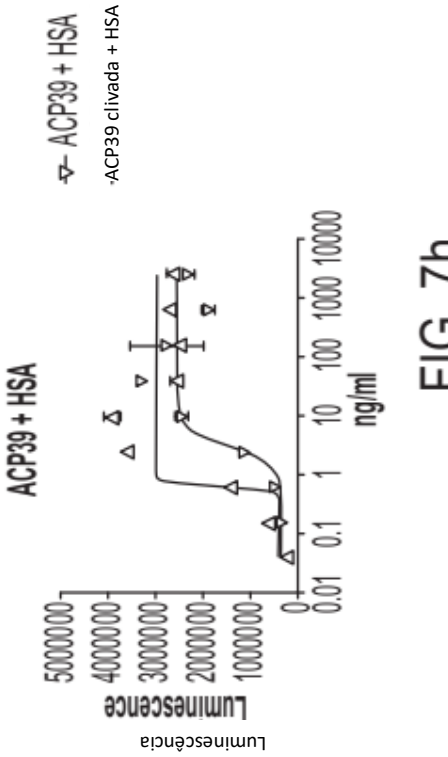


FIG. 7h

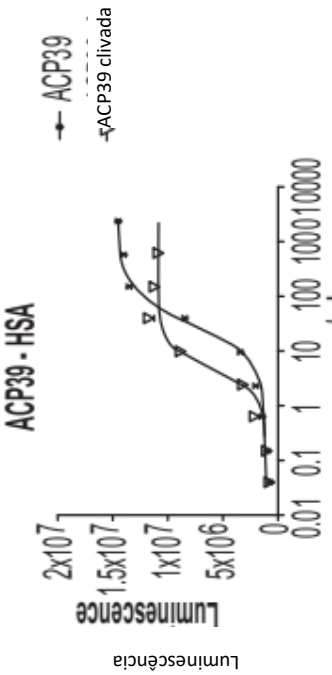


FIG. 7g

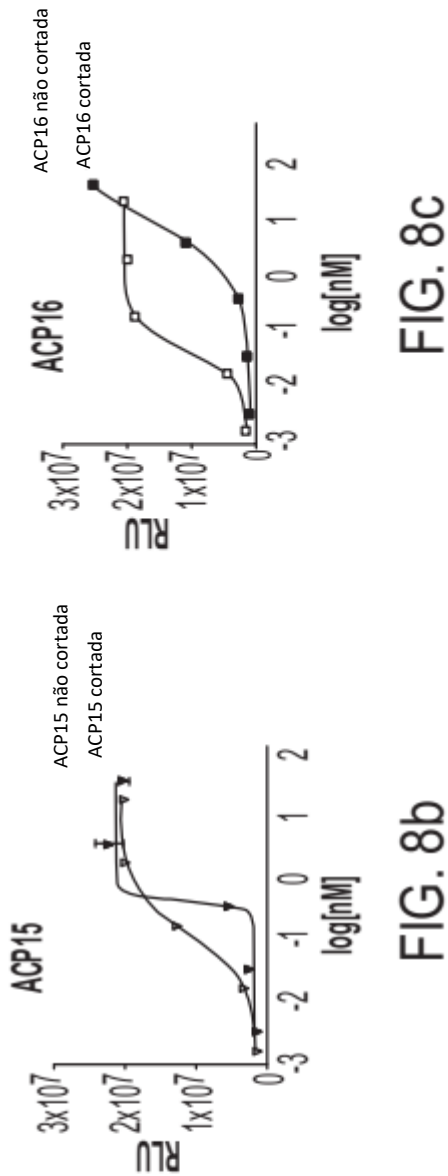


FIG. 8a

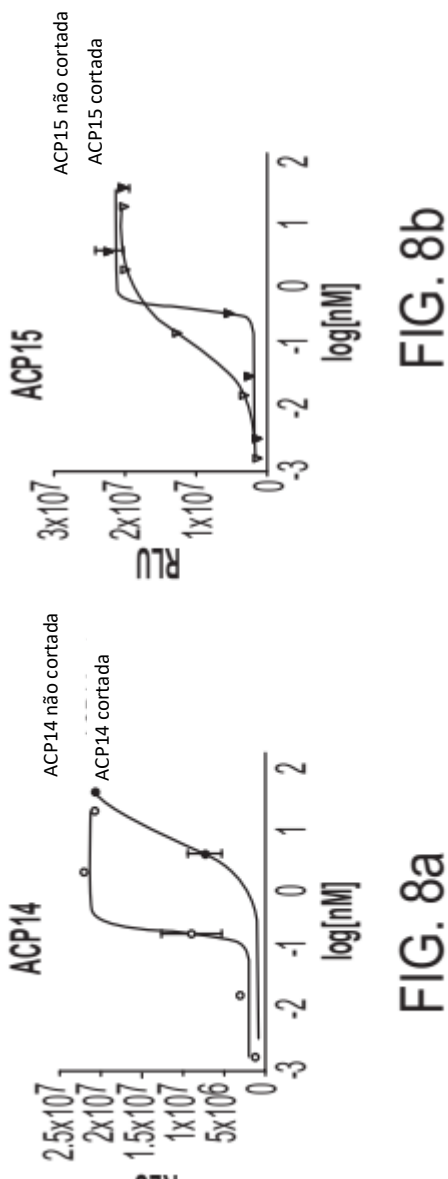


FIG. 8b

FIG. 8c

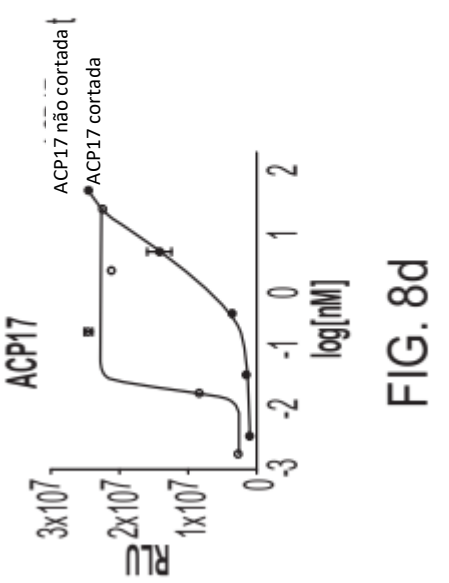


FIG. 8d

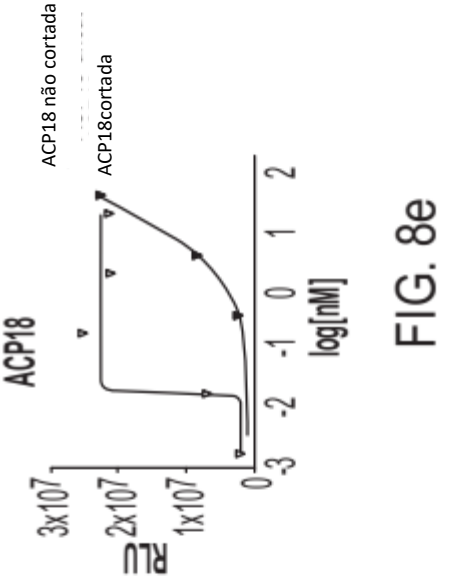


FIG. 8e

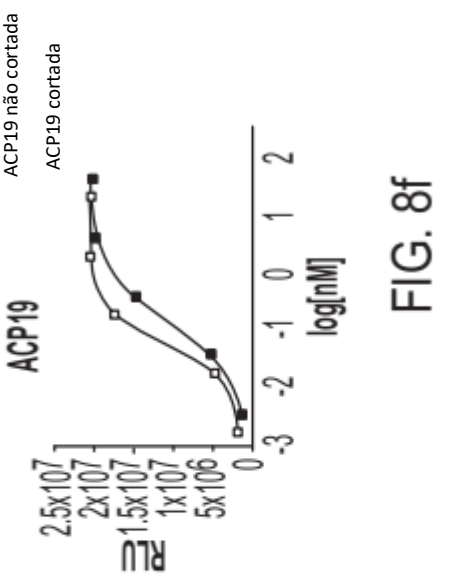


FIG. 8f

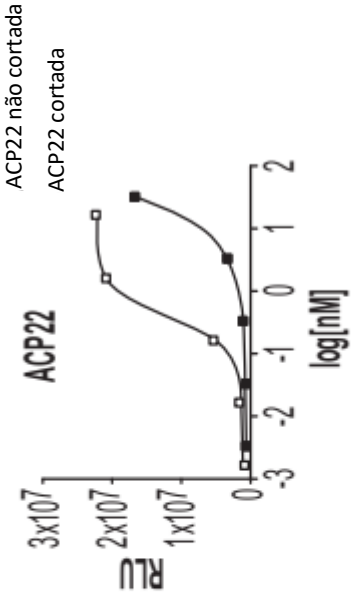


FIG. 9c

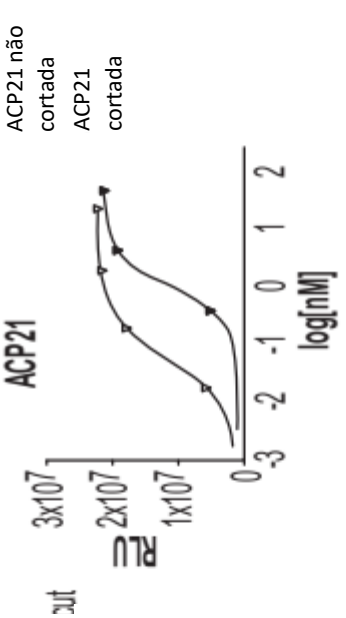


FIG. 9b

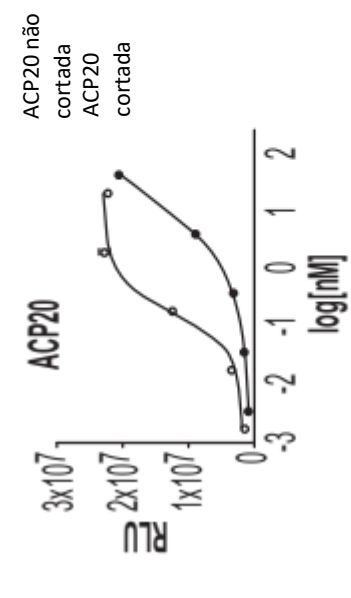


FIG. 9a

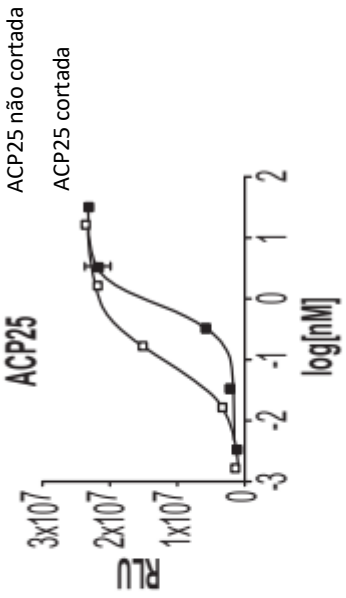


FIG. 9f

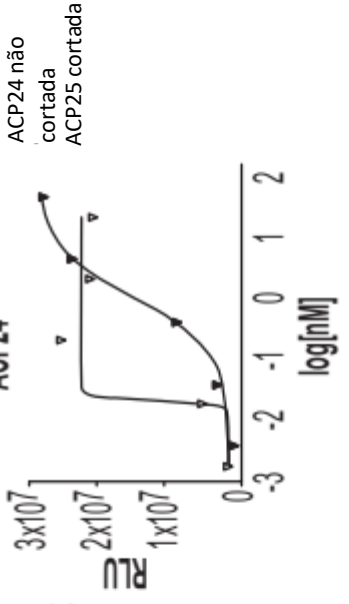


FIG. 9e

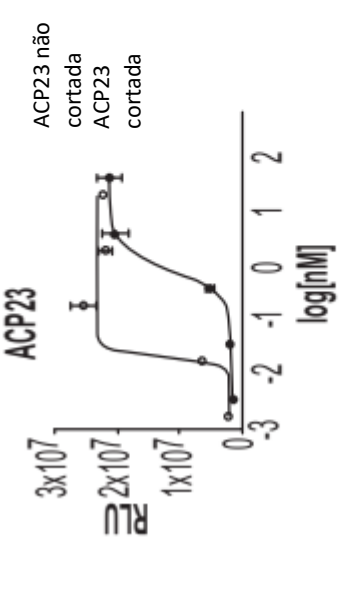


FIG. 9d

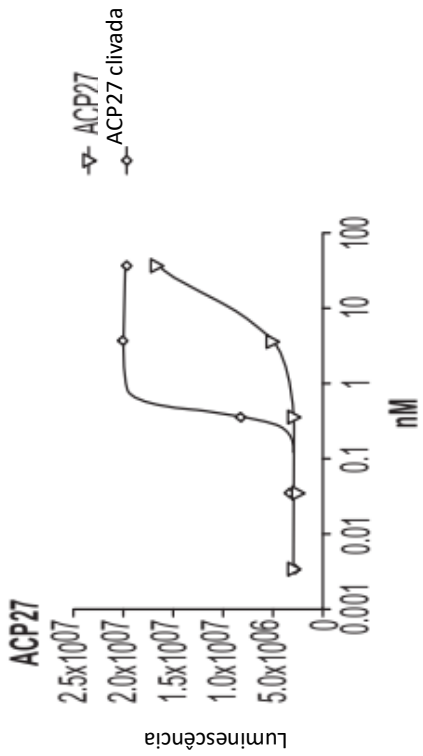


FIG. 9h

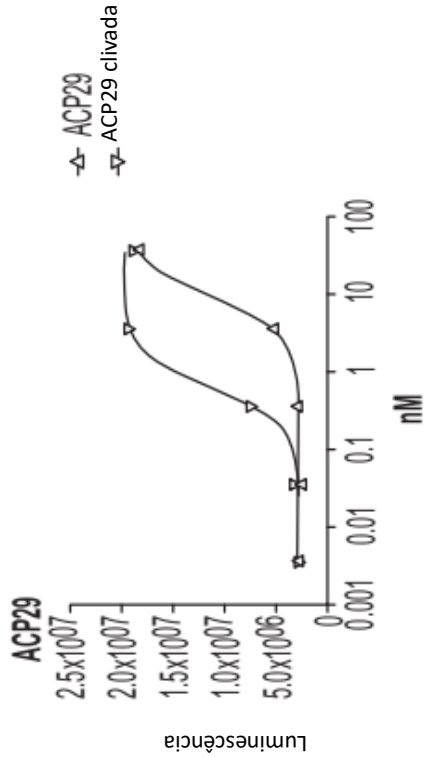


FIG. 9j

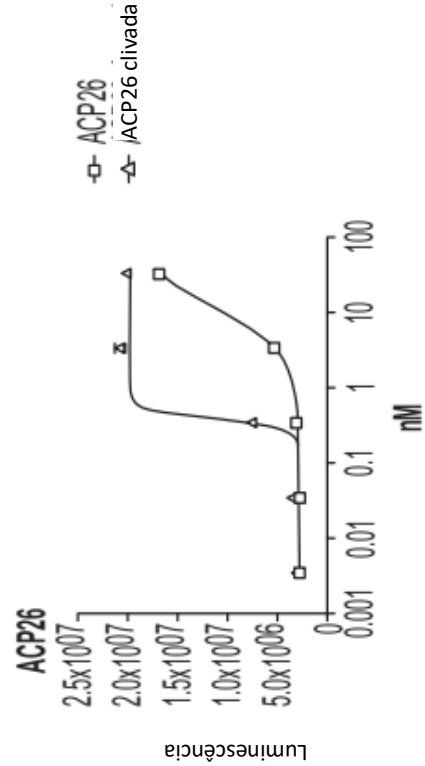


FIG. 9g

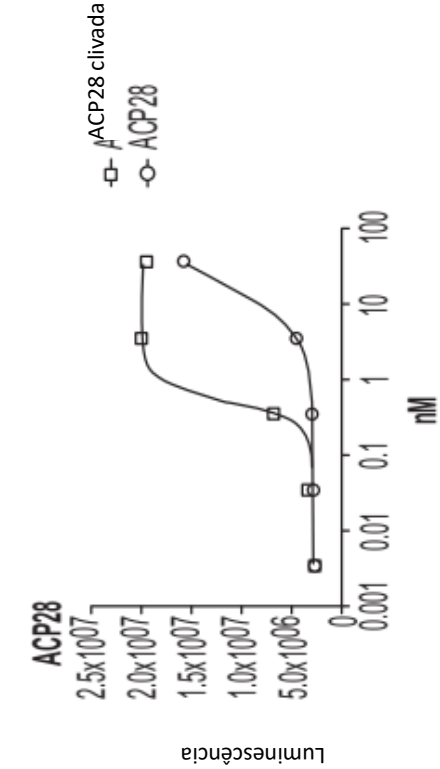


FIG. 9i

FIG. 9k

FIG. 9l

FIG. 9m

FIG. 9n

FIG. 9o

FIG. 9p

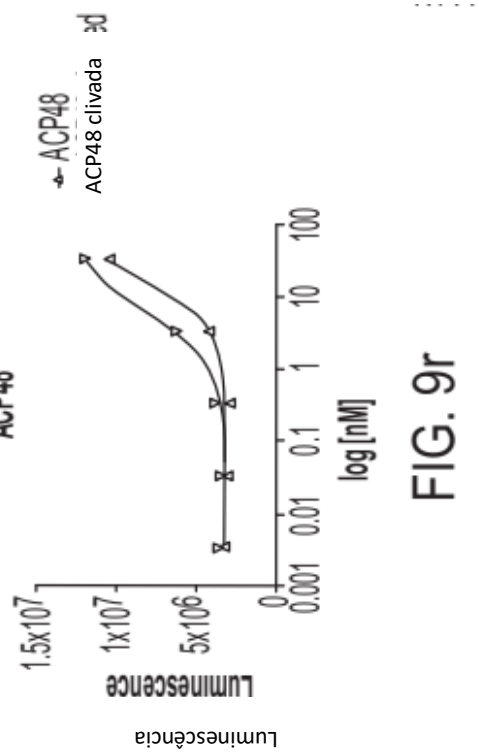


FIG. 9r

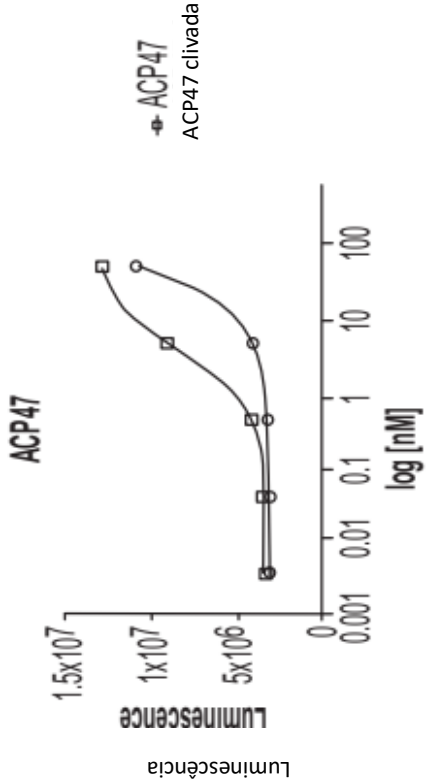


FIG. 9q

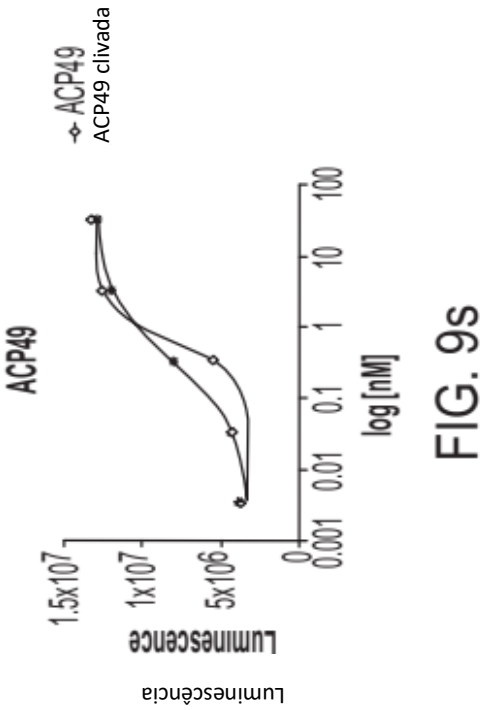


FIG. 9s

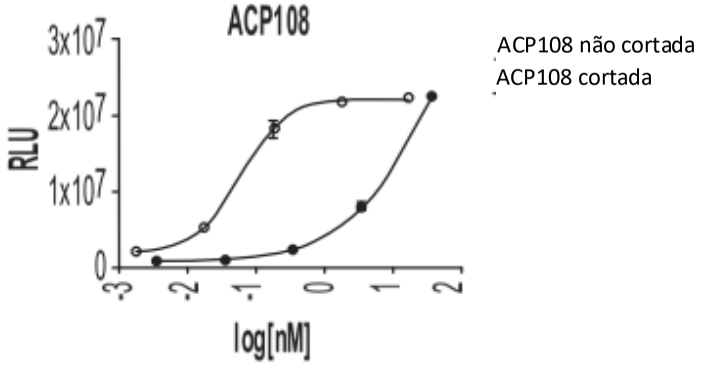


FIG. 9t

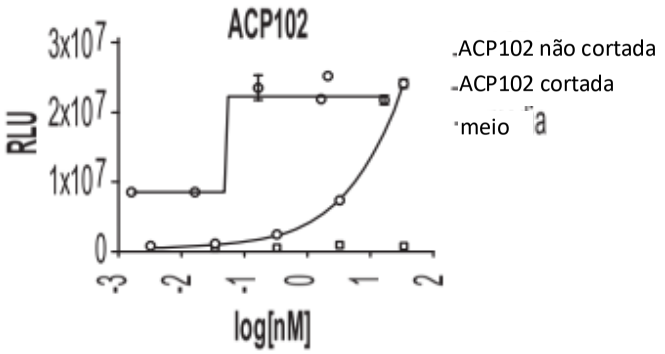


FIG. 9u

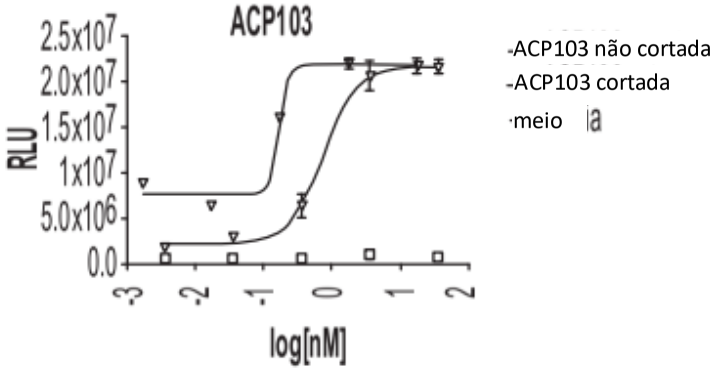


FIG. 9v

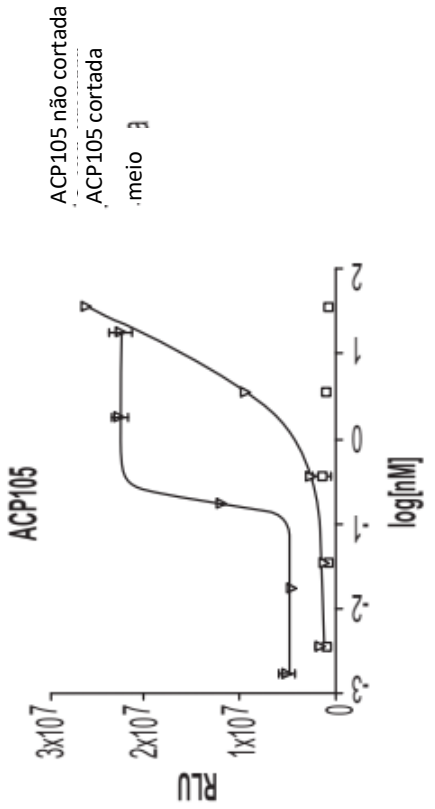


FIG. 9x

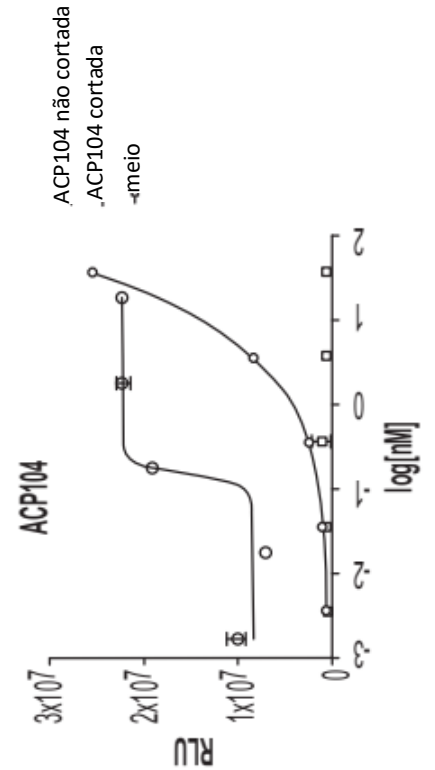


FIG. 9w

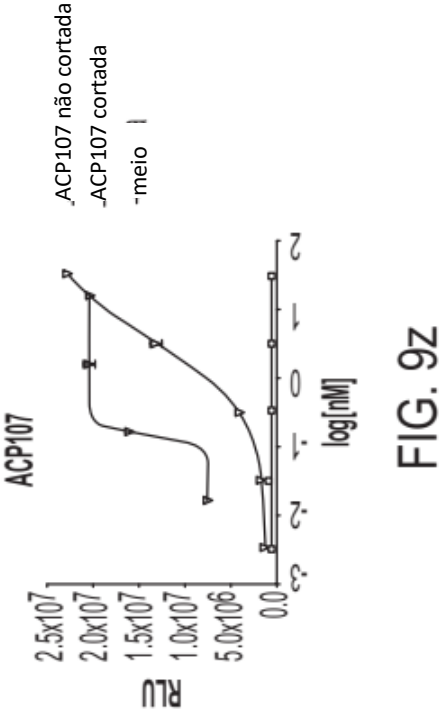


FIG. 9z

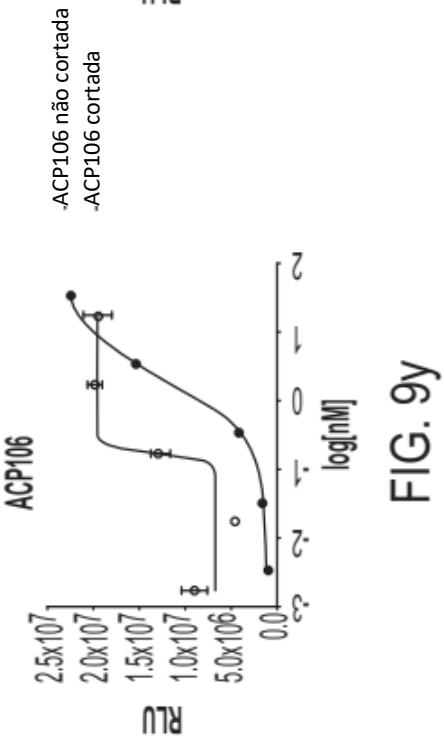


FIG. 9y

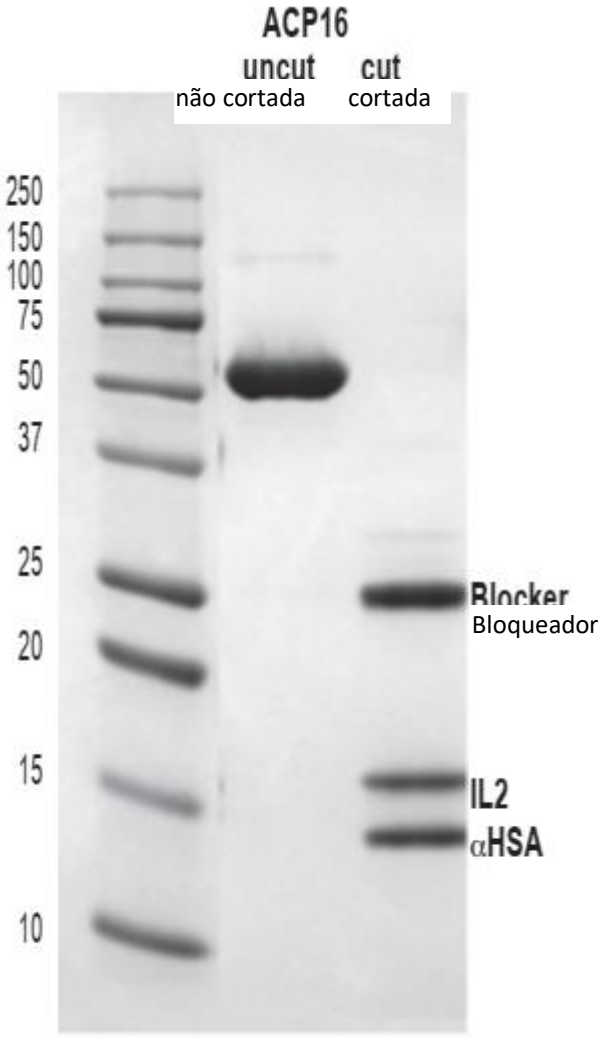
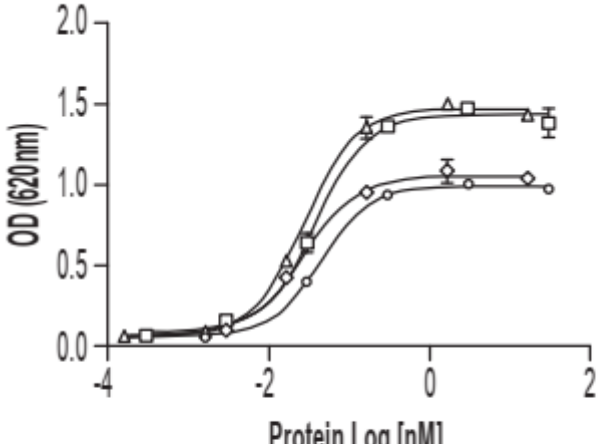

ACP16
uncut
não cortada
cut
cortada
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Blocker
Bloqueador
IL2
αHSA

FIG. 10



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

Proteína Log [nM]

FIG. 11a

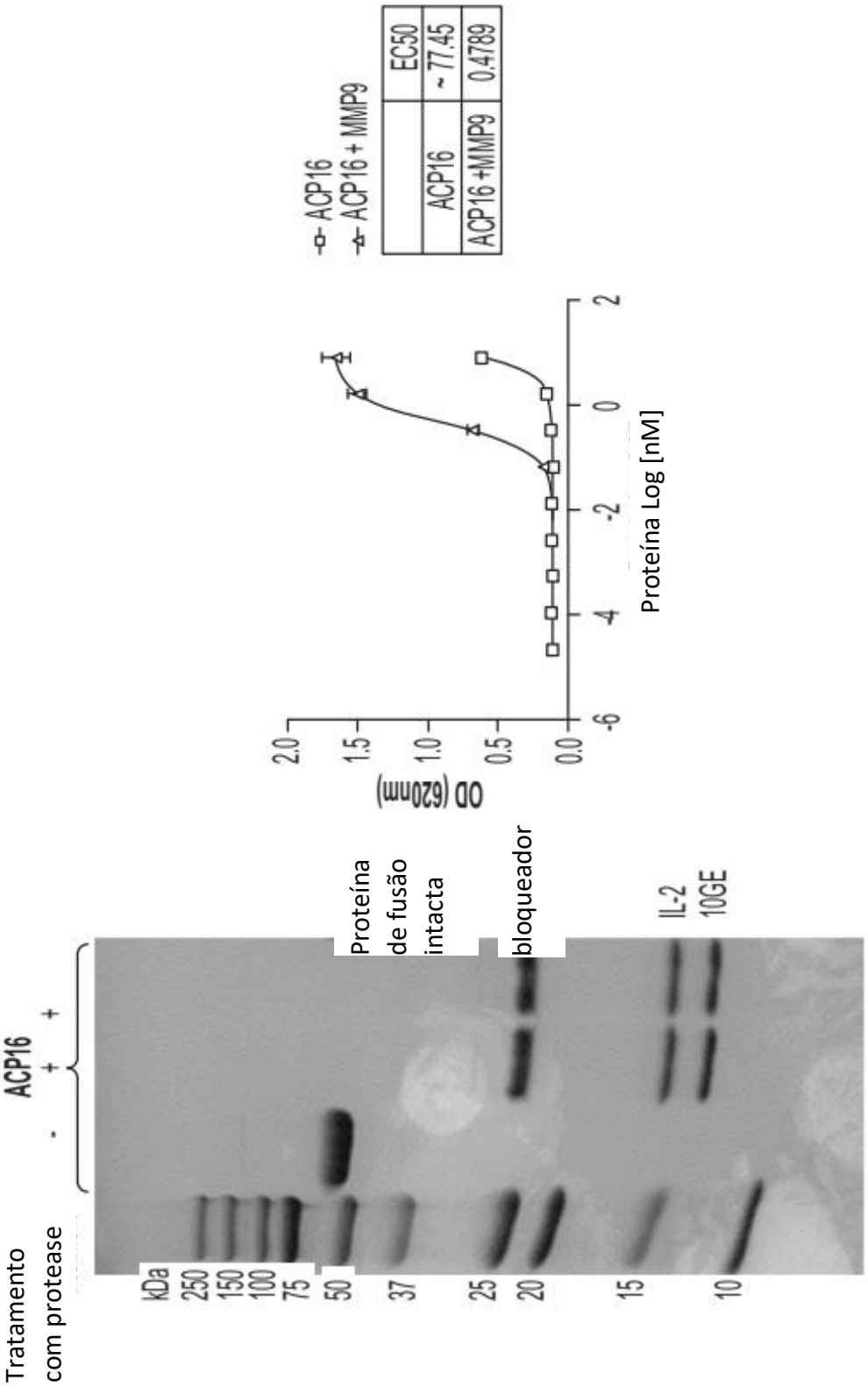

Tratamento com protease
ACP16
-
+
+
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Proteína de fusão intacta
bloqueador
IL-2 10GE
OD (620nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-6
-4
-2
0
2
Proteína Log [nM]
ACP16
ACP16 + MMP9
EC50
ACP16
~ 77.45
ACP16 +MMP9
0.4789

FIG. 11b

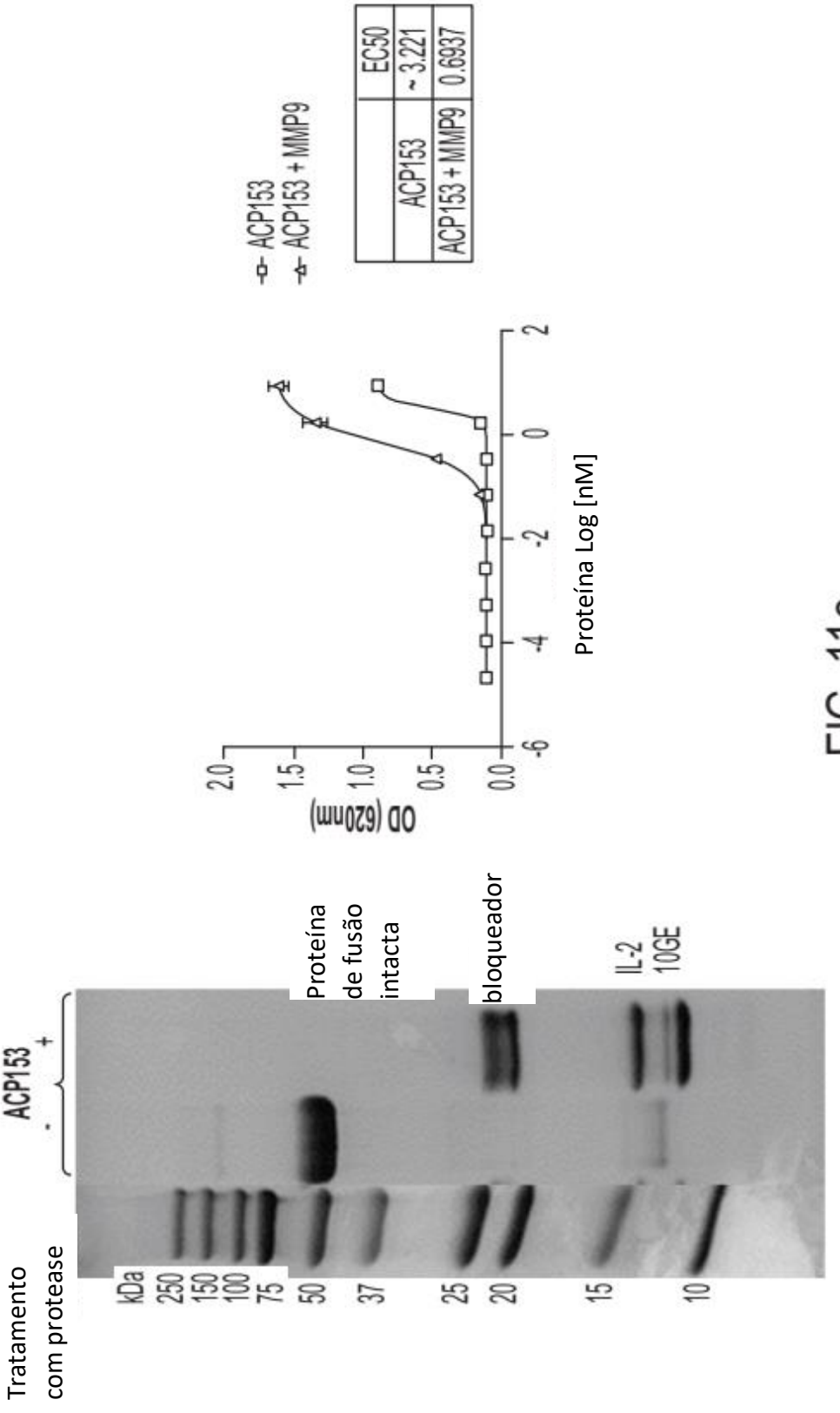
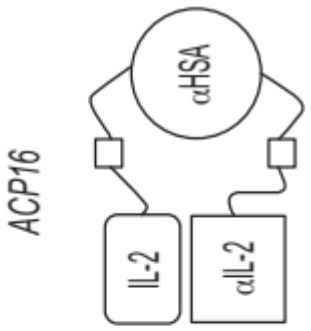

Tratamento com protease
ACP153
-
+
kDa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Proteína de fusão intacta
bloqueador
IL-2 10GE
OD (620nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-6
-4
-2
0
2
Proteína Log [nM]
ACP153
ACP153 + MMP9
EC50
ACP153
~ 3.221
ACP153 + MMP9
0.6937

FIG. 11c


ACP16
αHSA
IL-2
αIL-2

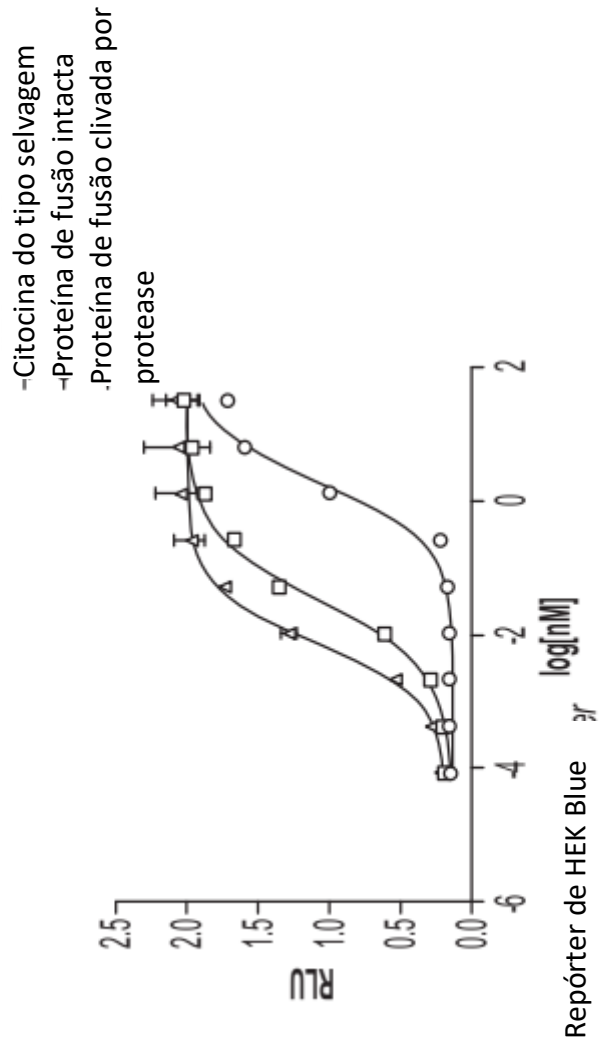

-Citocina do tipo selvagem
-Proteína de fusão intacta
-Proteína de fusão clivada por protease
RLU
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-6
-4
-2
0
2
log[nM]
Repórter de HEK Blue

FIG. 11d

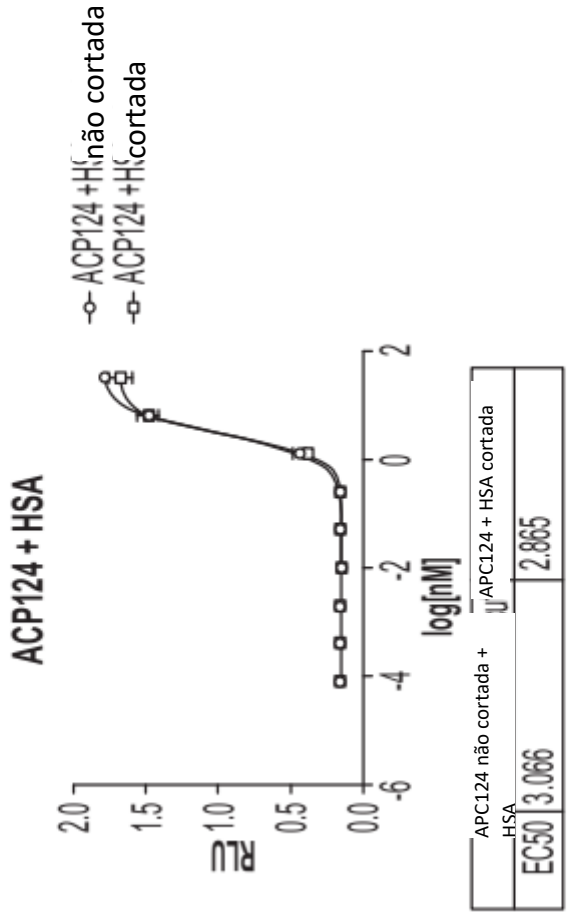


FIG. 12b

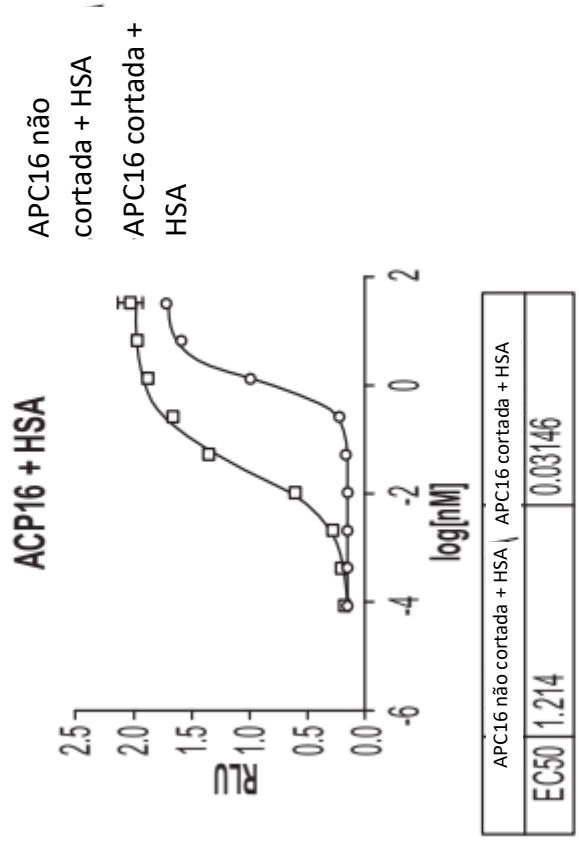
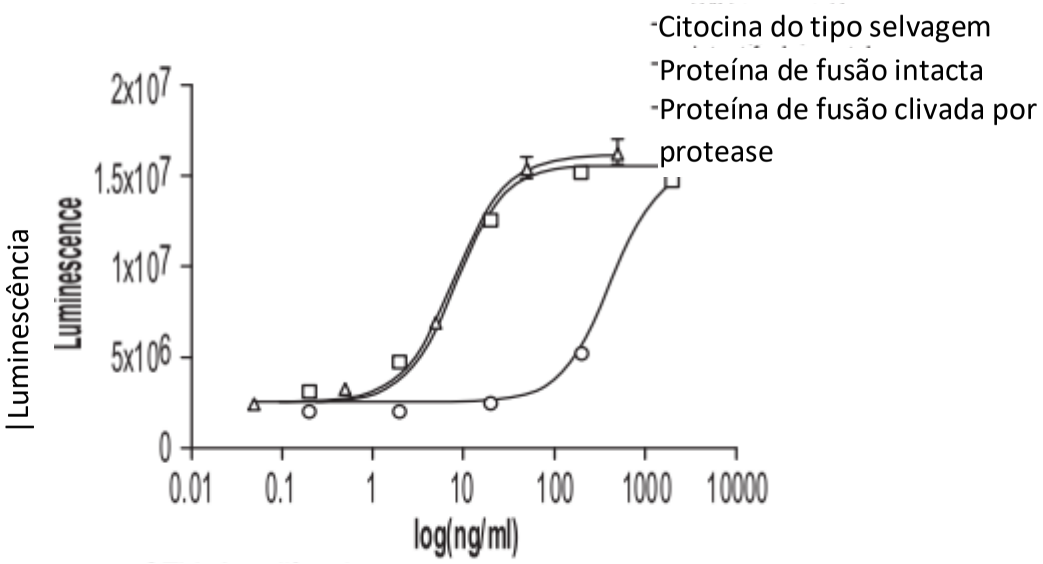


FIG. 12a



ensaio de proliferação de CTLL-2

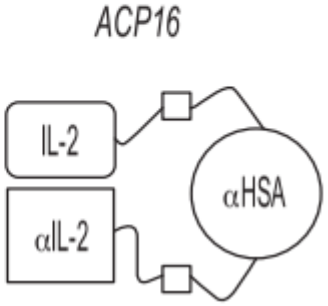


FIG. 12c

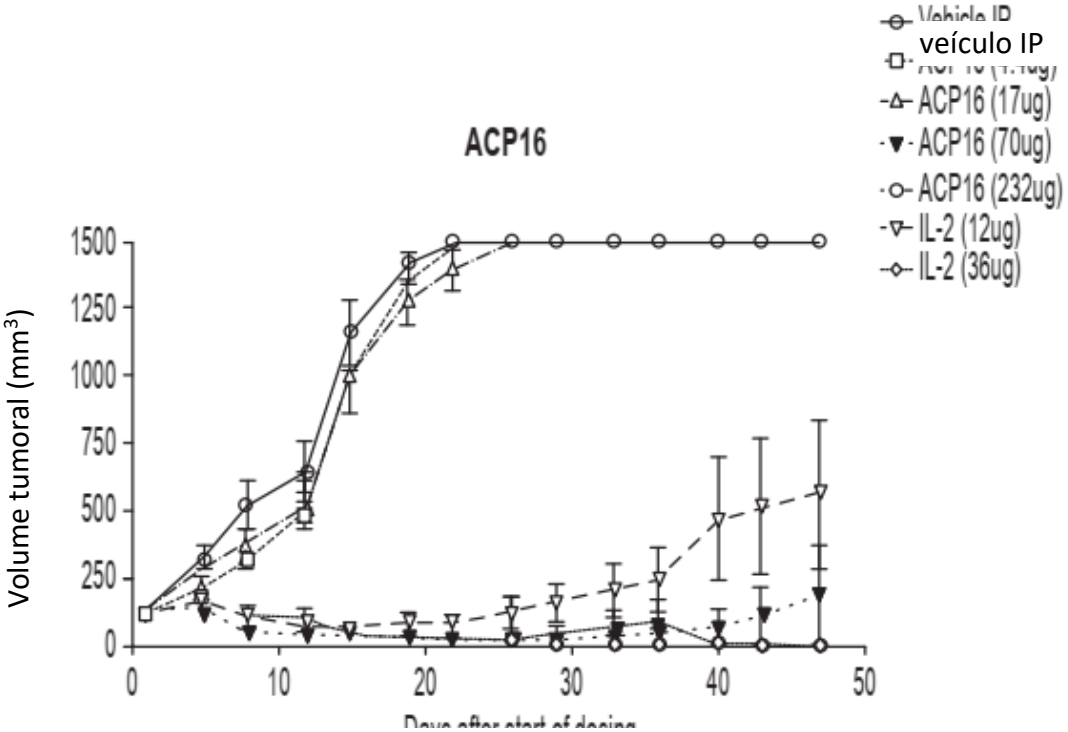

ACP16
Volume tumoral (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Vehicle IP
veículo IP
ACP16 (17ug)
ACP16 (70ug)
ACP16 (232ug)
IL-2 (12ug)
IL-2 (36ug)
Dias após o início da dosagem

FIG. 13a

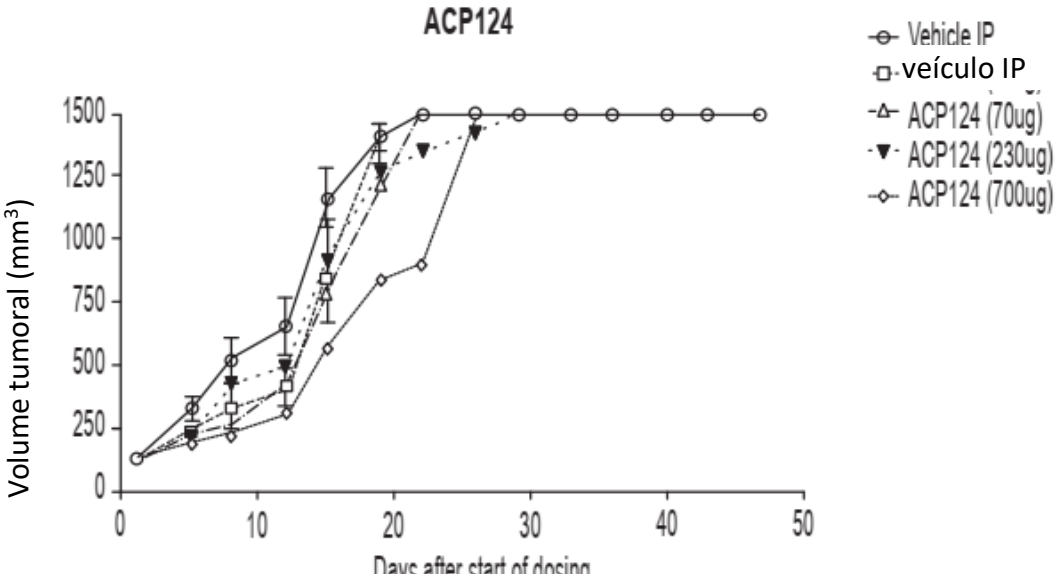

ACP124
Vehicle IP
veículo IP
ACP124 (70ug)
ACP124 (230ug)
ACP124 (700ug)
Volume tumoral (mm³)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Days after start of dosing
Dias após o início da dosagem

FIG. 13b

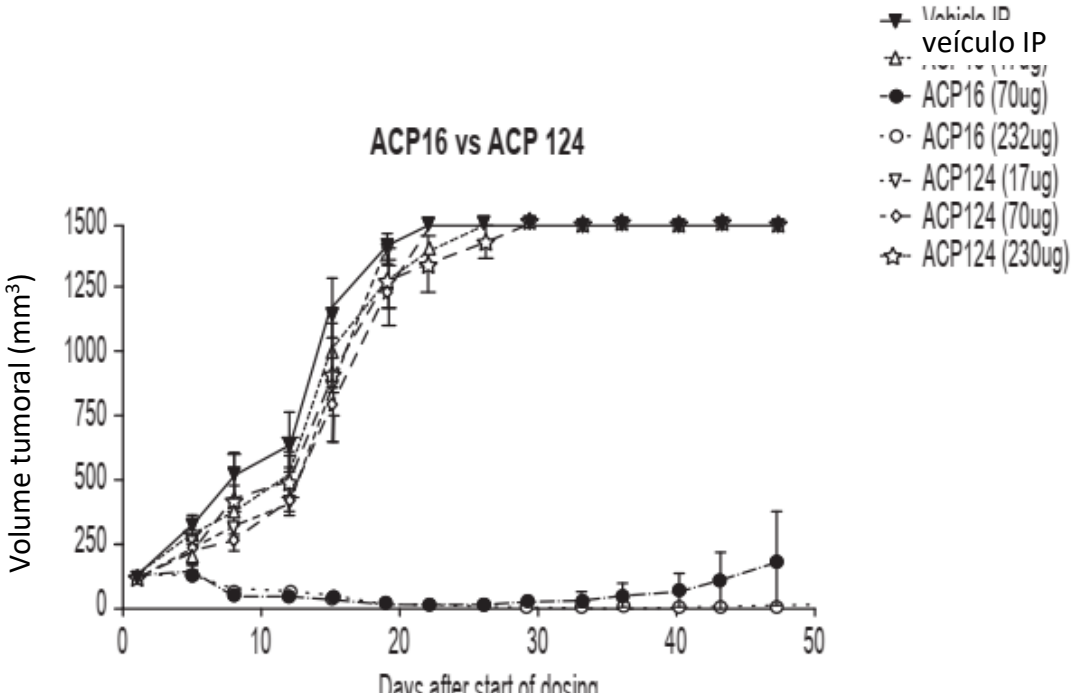

Vehicle IP
veículo IP
ACP16 (70ug)
ACP16 (232ug)
ACP124 (17ug)
ACP124 (70ug)
ACP124 (230ug)
ACP16 vs ACP 124
Volume tumoral (mm3)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
Days after start of dosing
Dias após o início da dosagem

FIG. 13c

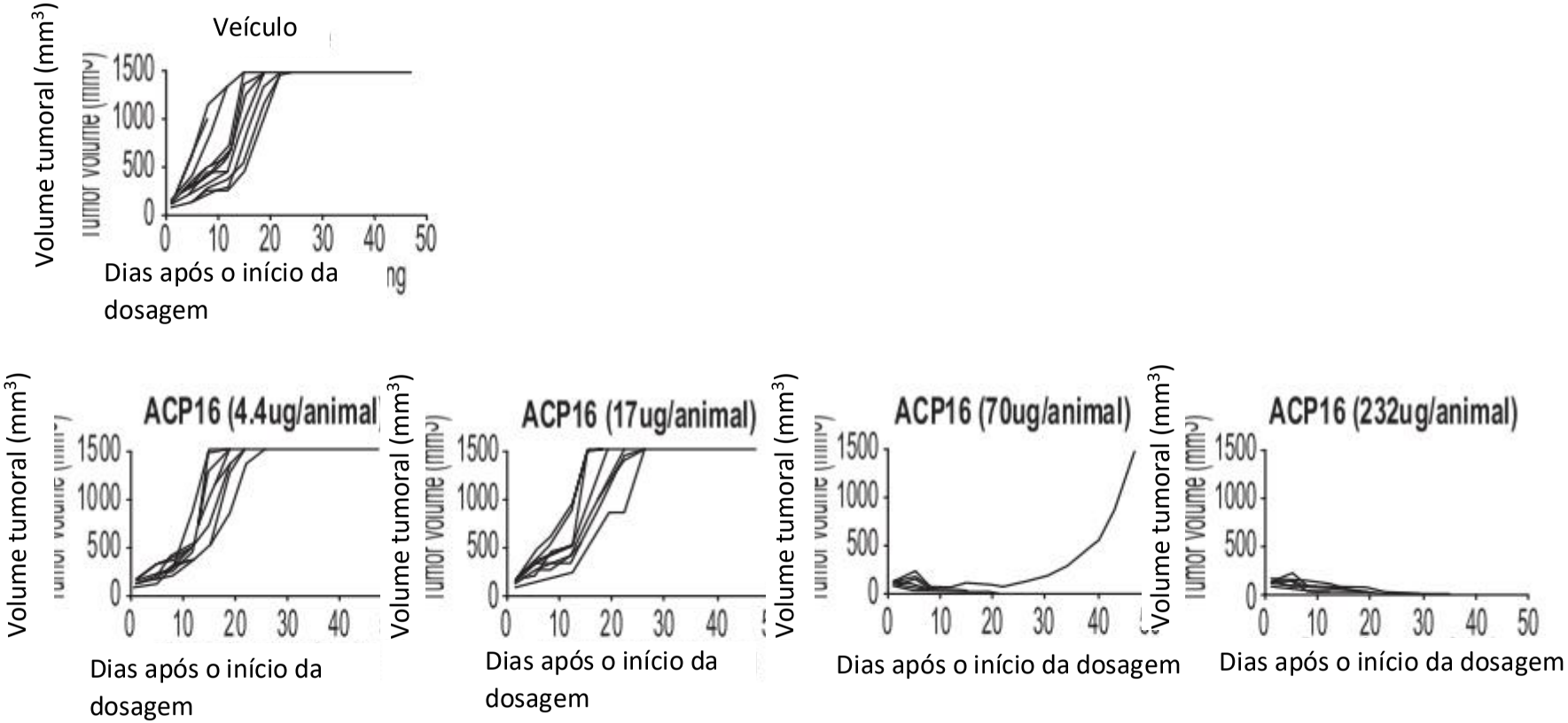

Veículo
Volume tumoral (mm3)
Tumor volume (mm3)
1500
1000
500
0
0 10 20 30 40 50
Dias após o início da dosagem
ACP16 (4.4ug/animal)
ACP16 (17ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP16 (232ug/animal)
0 10 20 30 40
0 10 20 30 40
0 10 20 30 40
0 10 20 30 40 50
Dias após o início da dosagem
Dias após o início da dosagem
Dias após o início da dosagem
Dias após o início da dosagem

FIG. 14a

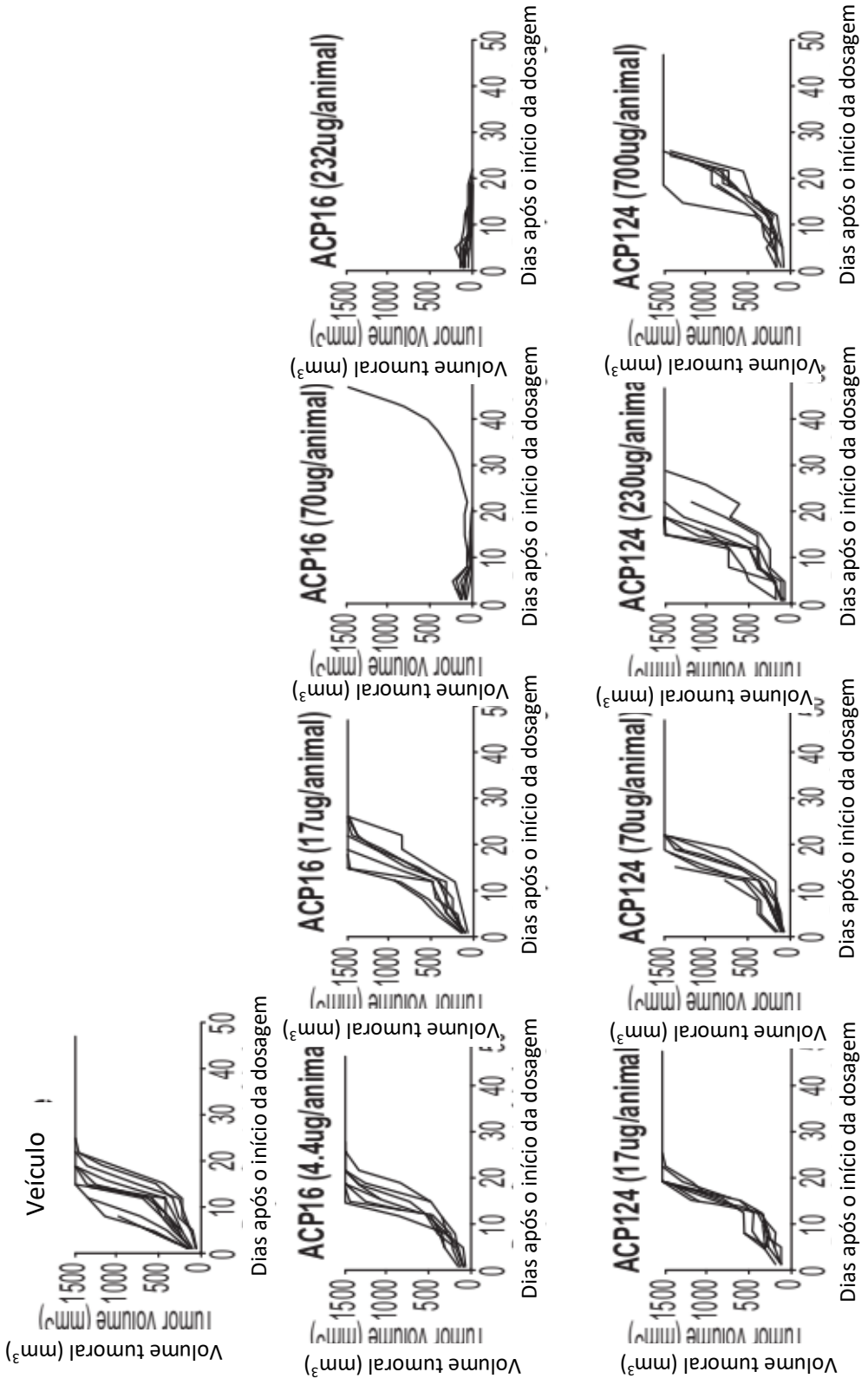

Veículo
ACP16 (4.4ug/anima
ACP16 (17ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP16 (232ug/animal)
ACP124 (17ug/animal
ACP124 (70ug/animal)
ACP124 (230ug/anima
ACP124 (700ug/animal)
Volume tumoral (mm³)
Dias após o início da dosagem
0
500
1000
1500
0
10
20
30
40
50

FIG. 14b

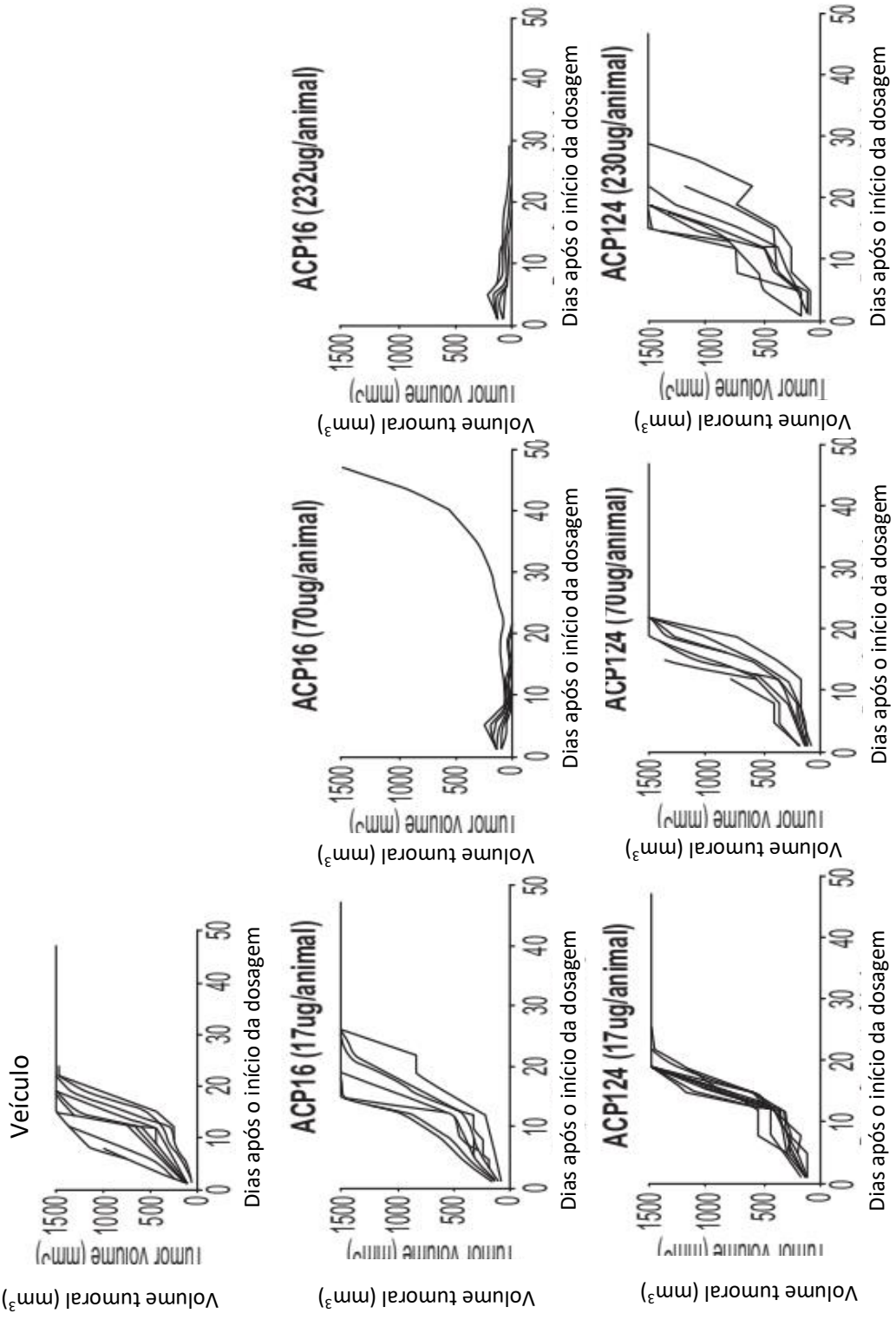

Veículo
ACP16 (17ug/animal)
ACP16 (70ug/animal)
ACP16 (232ug/animal)
ACP124 (17ug/animal)
ACP124 (70ug/animal)
ACP124 (230ug/animal)
Volume tumoral (mm³)
Dias após o início da dosagem
0
500
1000
1500
0
10
20
30
40
50

FIG. 14c

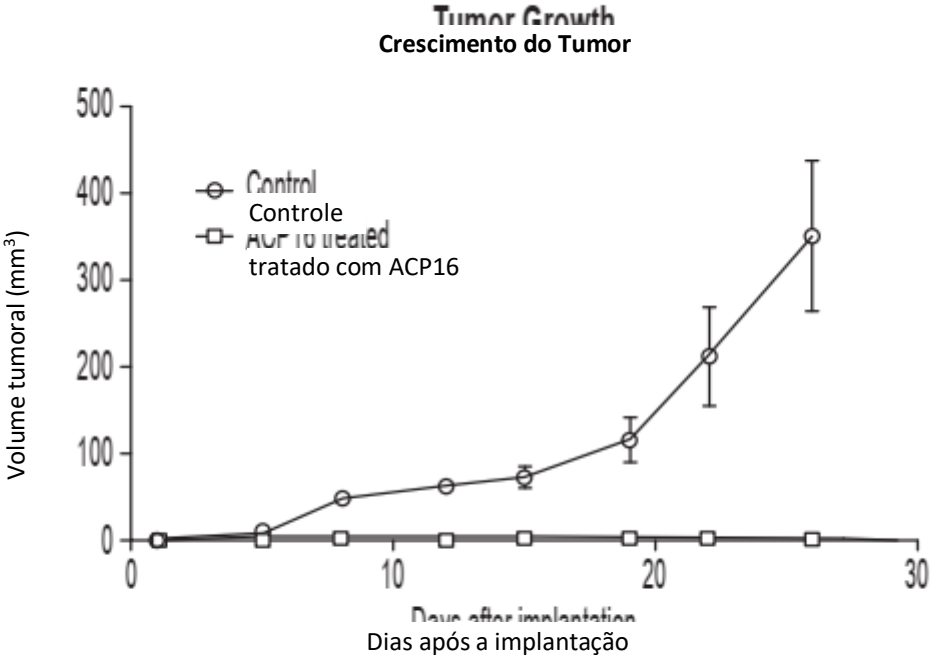

Tumor Growth
Crescimento do Tumor
Volume tumoral (mm³)
500
400
300
200
100
0
Control
Controle
tratado com ACP16
0
10
20
30
Dias após a implantação

FIG. 15

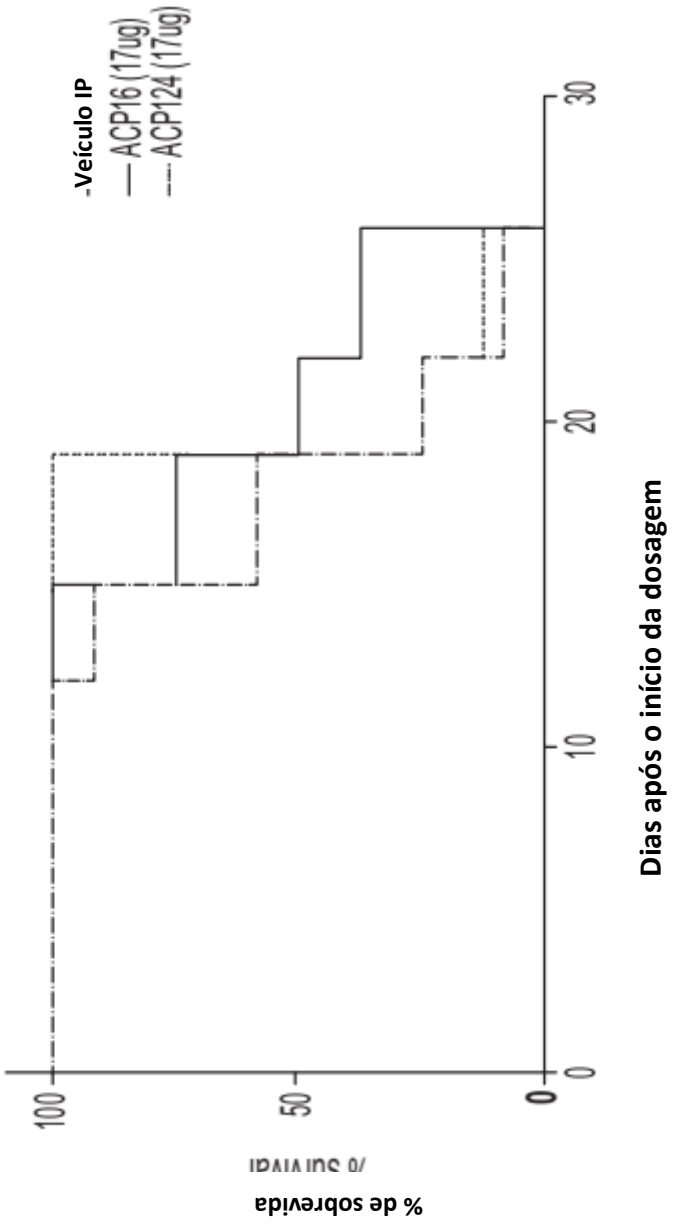

-Veículo IP
ACP16 (17ug)
ACP124 (17ug)
100
50
0
% de sobrevida
0
10
20
30
Dias após o início da dosagem

FIG. 16a

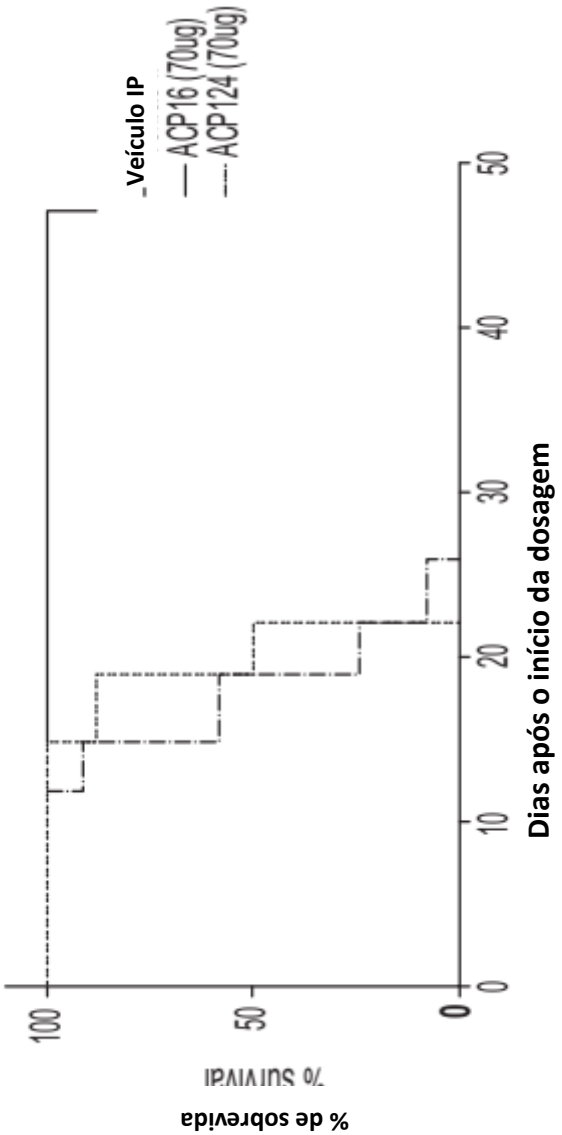

Veículo IP
ACP16 (70ug)
ACP124 (70ug)
% de sobrevida
% SURVIVAL
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 16b

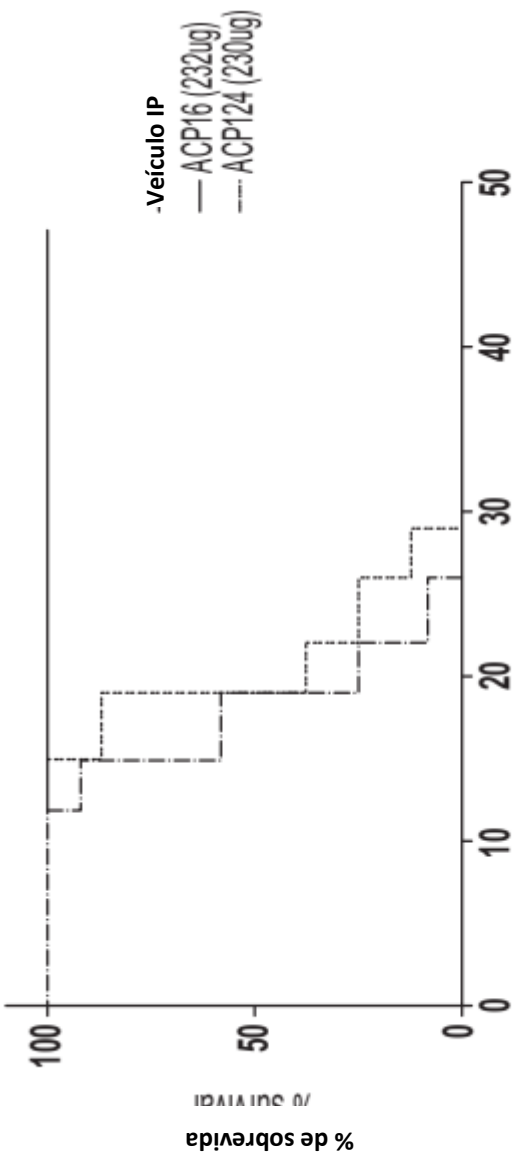

Veículo IP
ACP16 (232ug)
ACP124 (230ug)
100
50
0
0
10
20
30
40
50
% de sobrevida
Dias após o início da dosagem

FIG. 16c

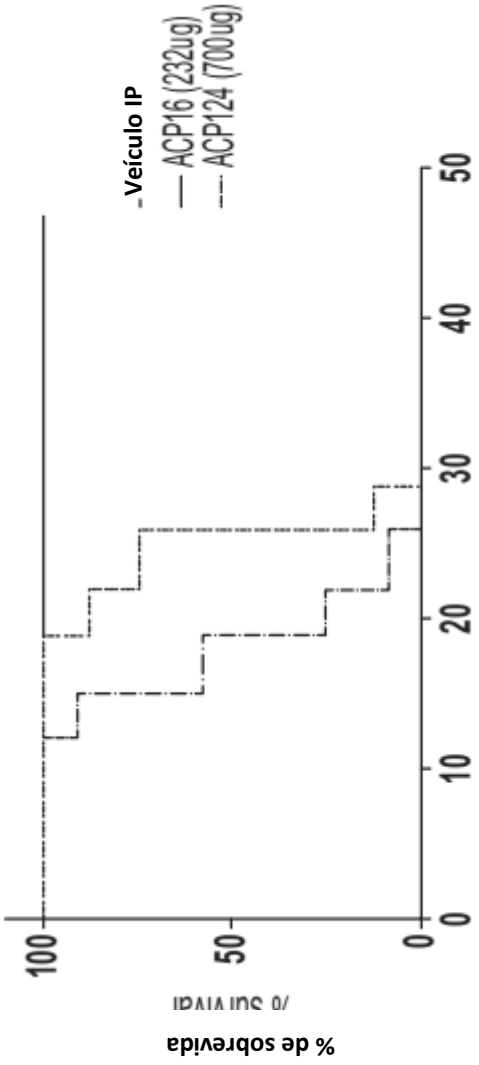
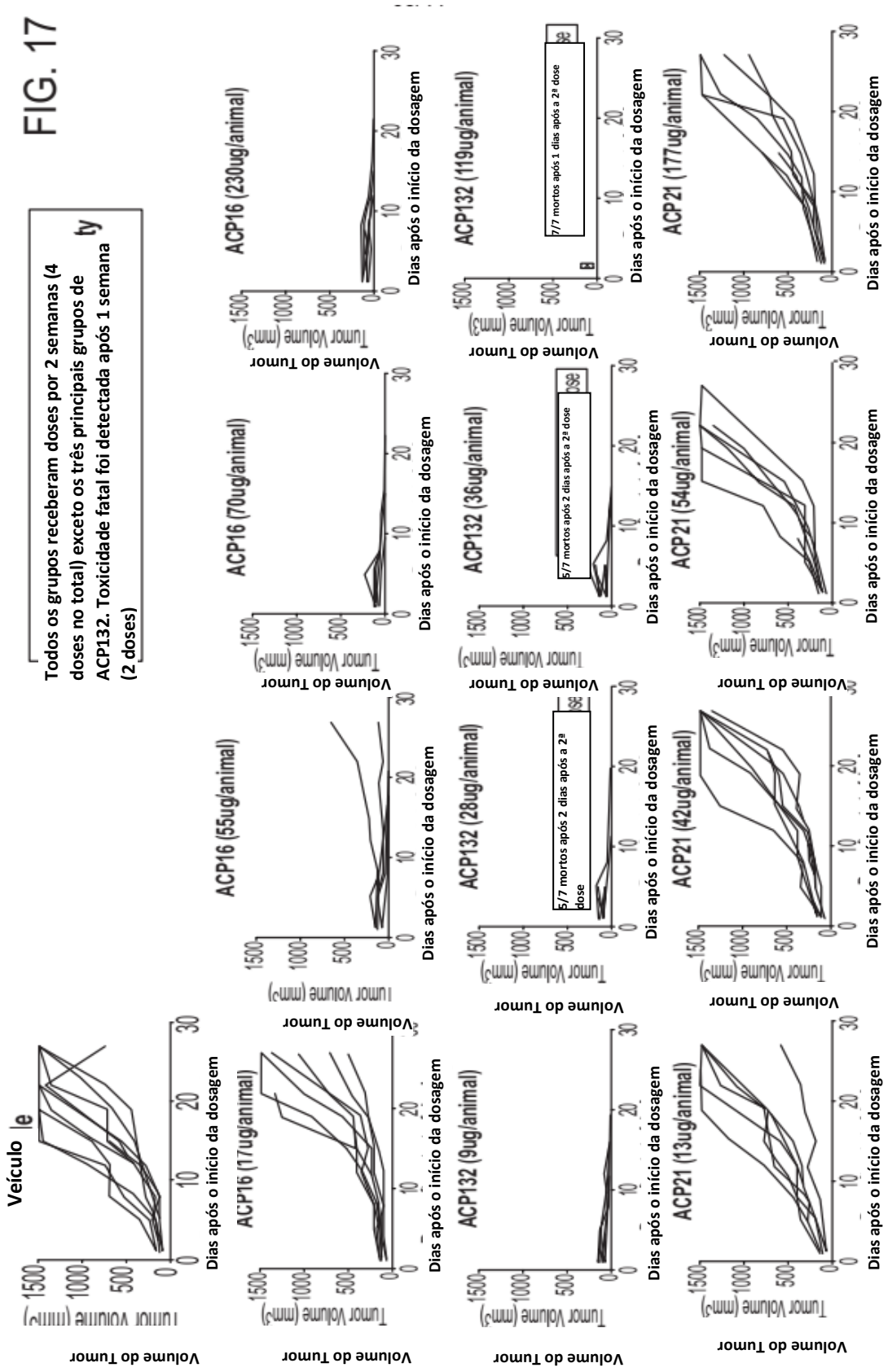
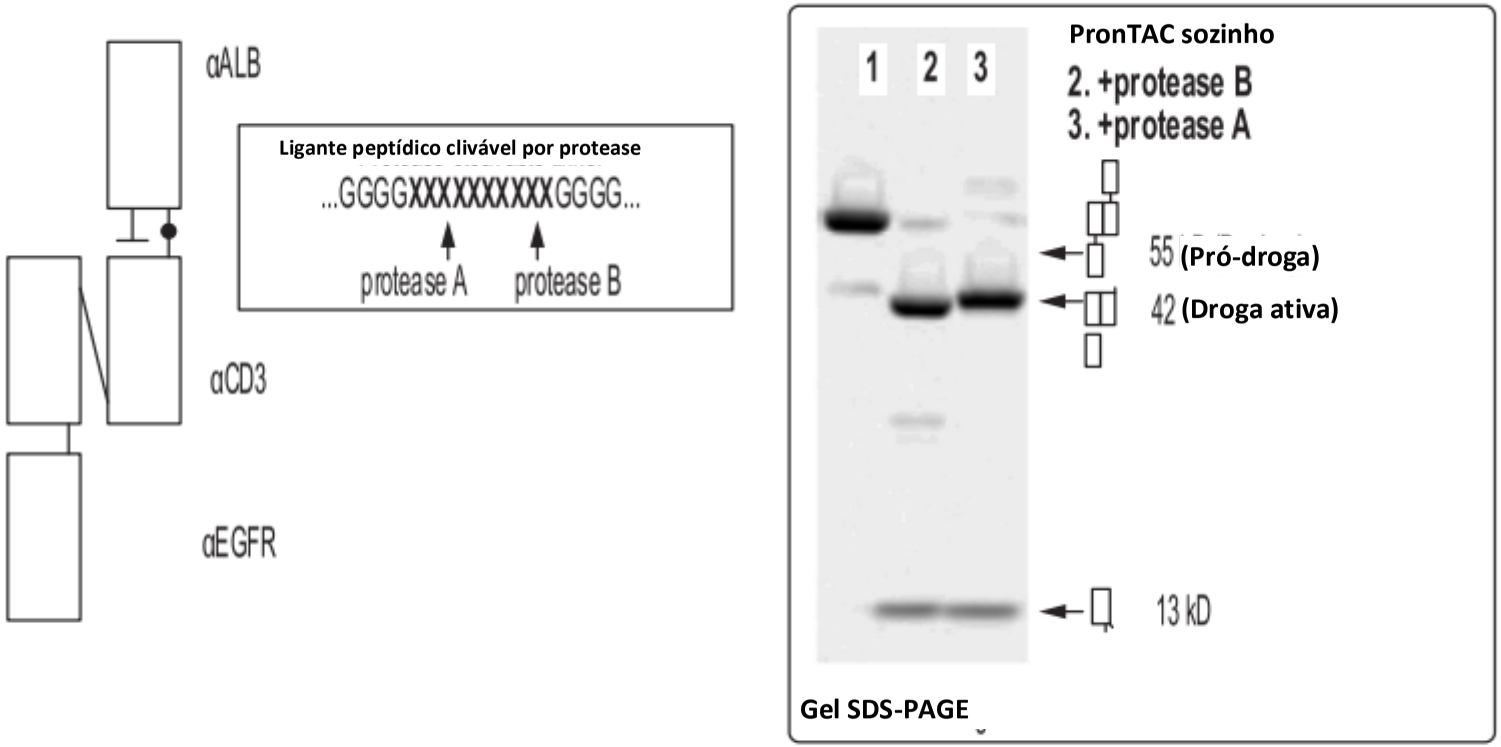

Veículo IP
ACP16 (232ug)
ACP124 (700ug)
% de sobrevida
100
50
0
0
10
20
30
40
50
Dias após o início da dosagem

FIG. 16d

FIG. 17


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)
ACP132 (9ug/animal)
ACP132 (28ug/animal)
ACP132 (36ug/animal)
ACP132 (119ug/animal)
ACP21 (13ug/animal)
ACP21 (42ug/animal)
ACP21 (54ug/animal)
ACP21 (177ug/animal)
5/7 mortos após 2 dias após a 2ª dose
7/7 mortos após 1 dias após a 2ª dose
Volume do Tumor
Tumor Volume (mm3)
Dias após o início da dosagem

ProTriTACs São Ativáveis por Proteases Associadas ao Tumor

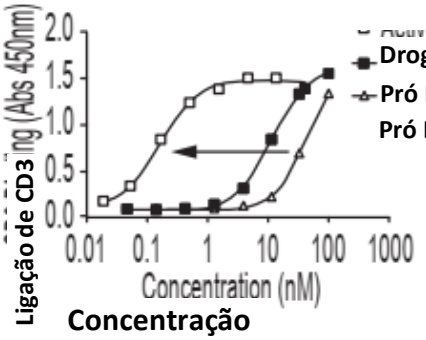


Biblioteca proprietária do ligantes peptídicos de substrato com diferentes clivabilidades manipuladas

FIG. 18

Atividade Diferencial suportada por Diversos Ensaios In Vitro

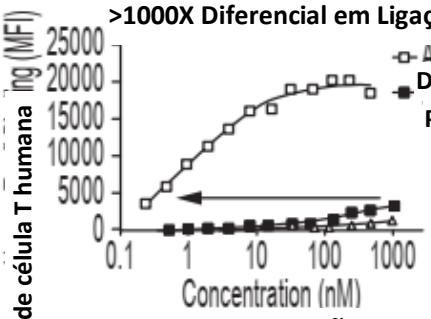
250X Diferencial em Ligação de CD3 (ELISA)



Droga Ativa
Pró Droga
Concentração

leavable)	EC50 (nM)	Masking Razão de mascaramento
Active Drug	0.16	-
Droga Ativa	11.91	74
Pró Droga	39.44	247
Prodrug non-cleavable)		
Pró Droga (não clivável)		

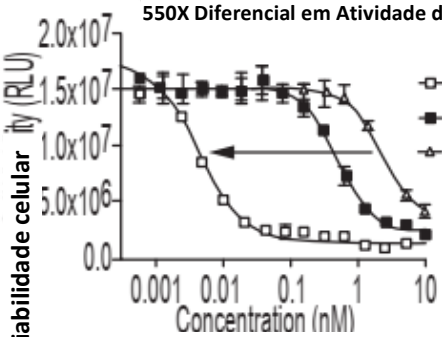
>1000X Diferencial em Ligação de Célula T Humana Primária (FACS)



Droga Ativa
Pró Droga
Concentração

cleavable)	EC50 (nM)	Masking Razão de mascaramento
Active Drug	1.19	-
Droga Ativa	>1000	n/a
Pró Droga	>1000	n/a
Pró Droga (não clivável)		

550X Diferencial em Atividade de Eliminação de Células T (TDCC)



Droga Ativa
Pró Droga
Concentração

cleavable)	EC (nM)	Razão de mascaramento Ratio
Active Drug	0.004	-
Droga Ativa	0.485	121
Pró Droga	2.197	549
Pró Droga (não clivável)		

• Plug-and-play: masking demonstrated with >20 binders to 5 different targets

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

FIG. 19

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

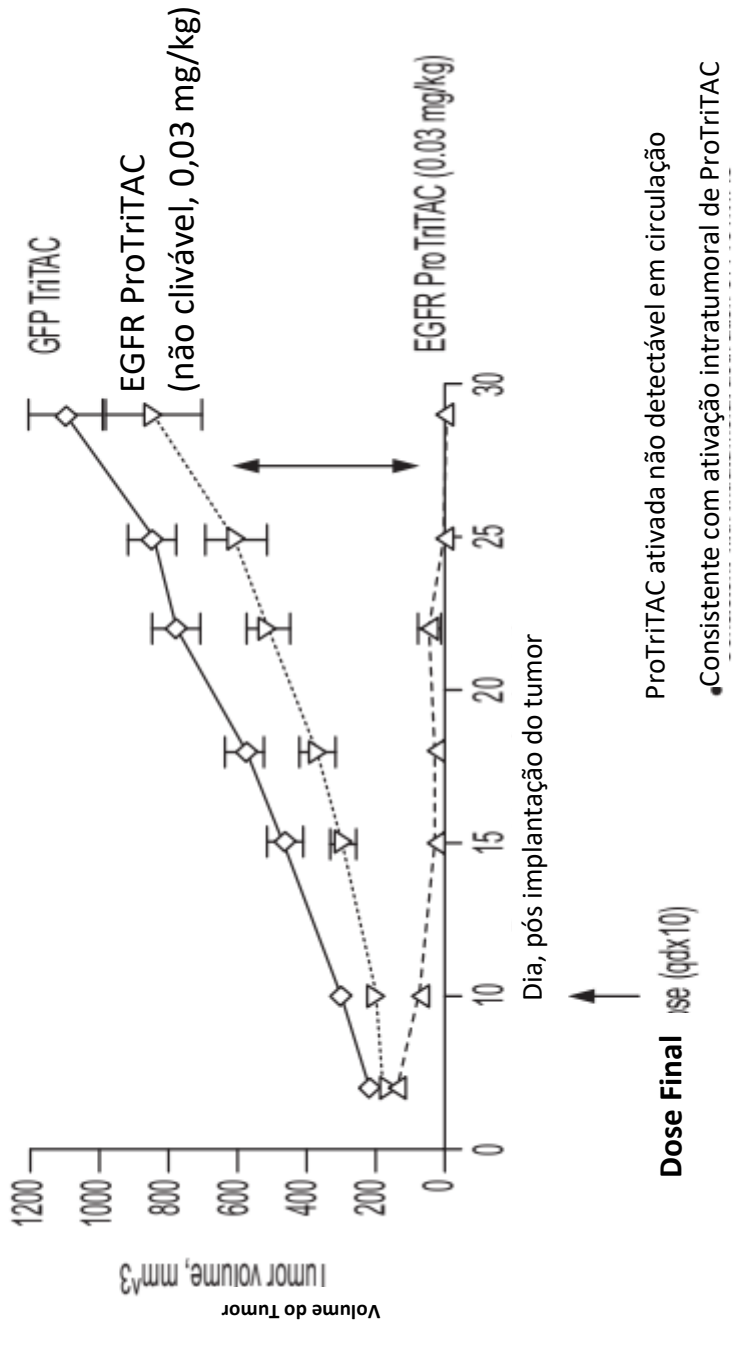


FIG. 20

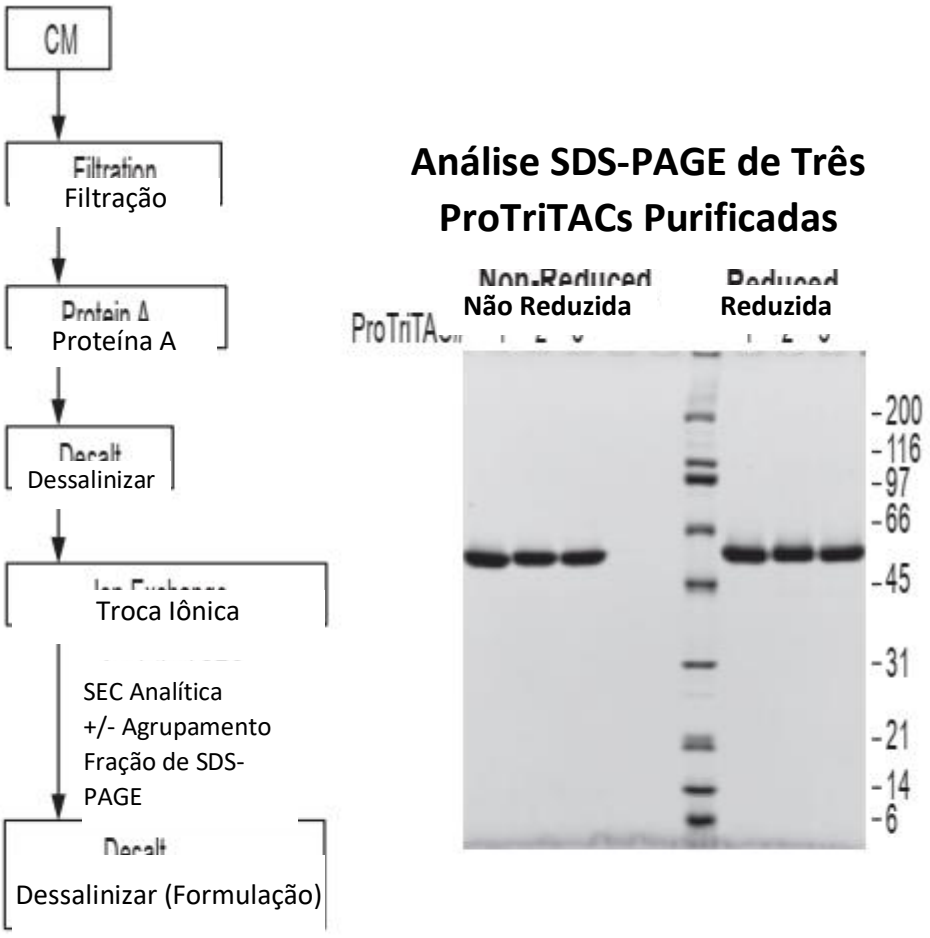
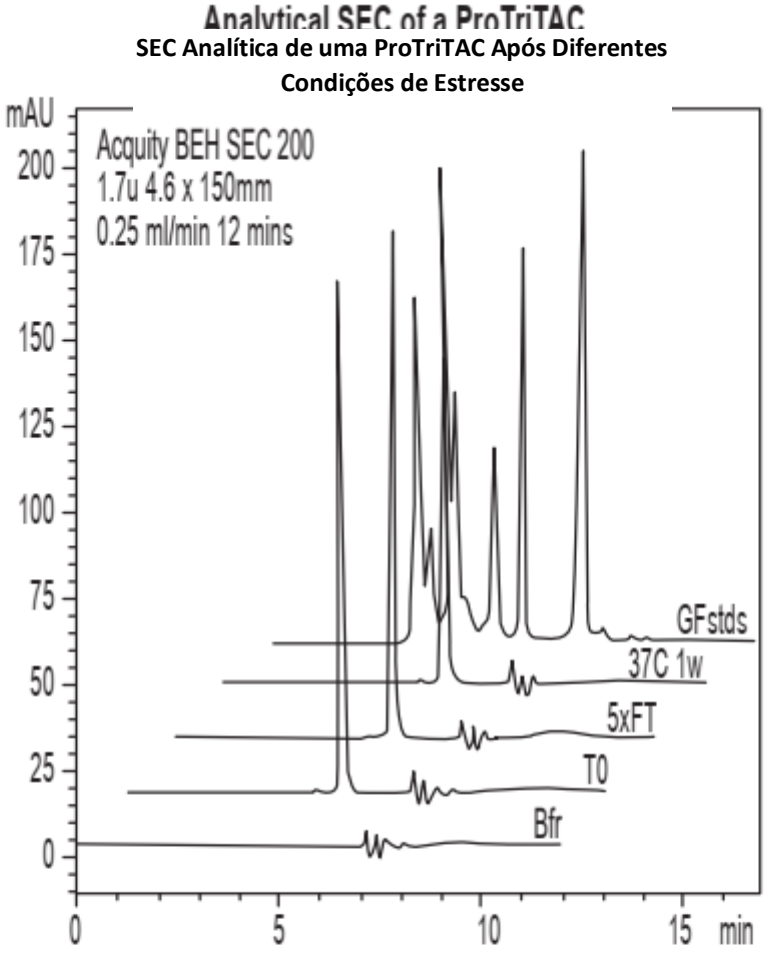

CM
Filtration
Filtração
Protein A
Proteína A
Desalt
Dessalinizar
Troca Iônica
SEC Analítica
+/- Agrupamento
Fração de SDS-
PAGE
Desalt
Dessalinizar (Formulação)
Análise SDS-PAGE de Três
ProTriTACs Purificadas
Não Reduzida
Reduzida
200
116
97
66
45
31
21
14
6

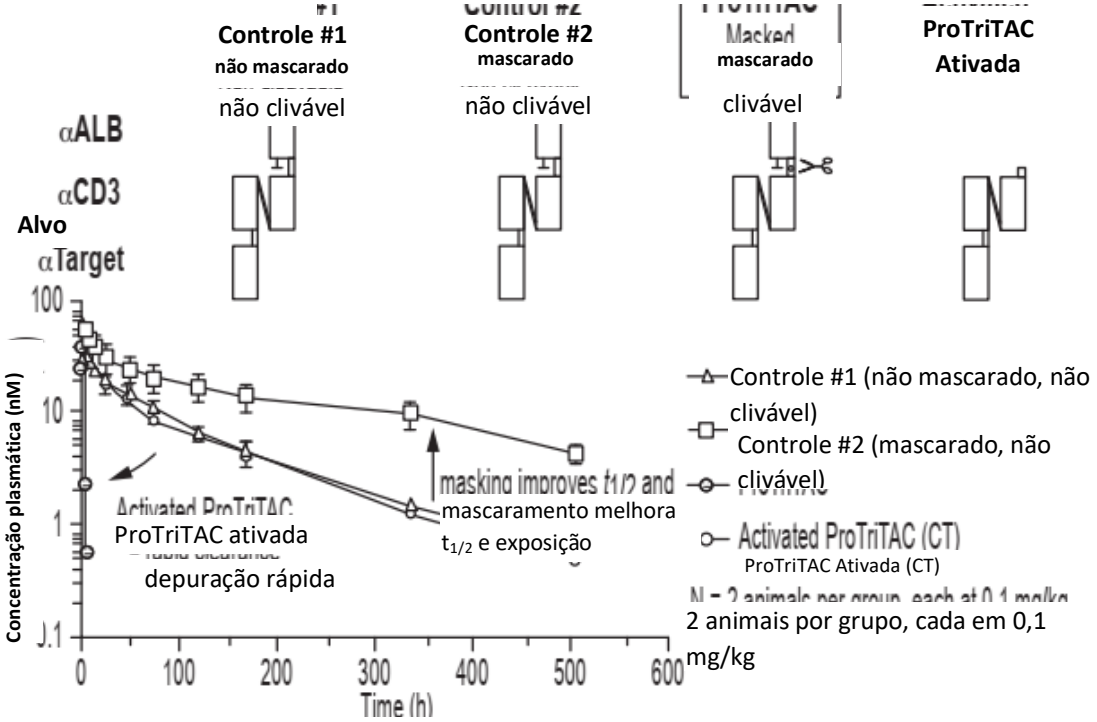
FIG. 21



Condition Condição	%HMW	%Main % 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. 22

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

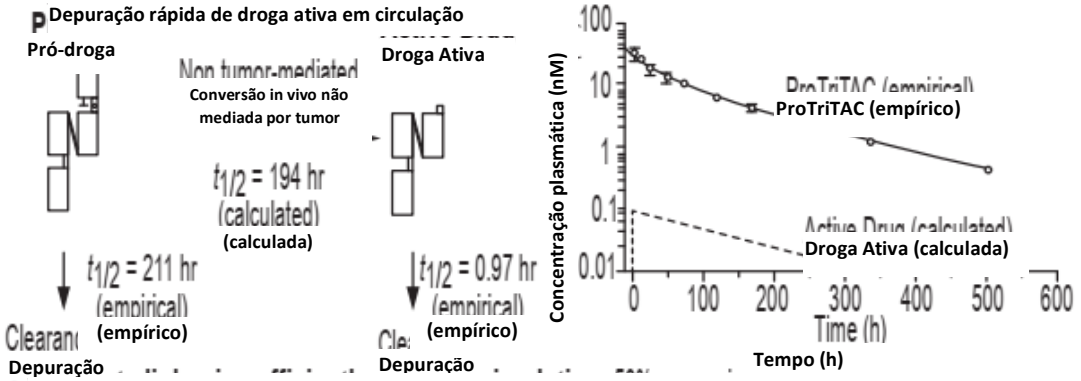


Test Article Artigo de teste	$t_{1/2}$ terminal (hr)	Cmax (nM)	AUC, 0-last (hr*nM) 0-último	Clearance (mL/hr/kg) depuração
Controle #1 (não mascarado, não clivável)		48.2	2490	0.735
Controle #2 (mascarado, não clivável)	211	58.0	7000	0.238
ProTriTAC	101	42.7	2670	0.686
Activated ProTriTAC (CT) ProTriTAC 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**

FIG. 23

RESUMO

“POLIPEPTÍDEOS DE INTERLEUCINA 2 ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DESTES”

A divulgação apresenta proteínas de fusão que são variantes condicionalmente ativas de IL-2. 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

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: 08:51:31
- Código de Controle:
  - Campo 1: BBD215BE3C0AC46B
  - Campo 2: C71D32CFF0855FDB