



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

(21) BR 112019024127-2 A2



(22) Data do Depósito: 24/05/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: IMUNOTOLERÂNCIA ALVEJADA

(51) Int. Cl.: A61K 38/20; A61K 39/395; C07K 14/55.

(30) Prioridade Unionista: 06/12/2017 US 62/595,352; 13/09/2017 US 62/558,175; 24/05/2017 US 62/510,586; 25/05/2017 US 62/510,816.

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

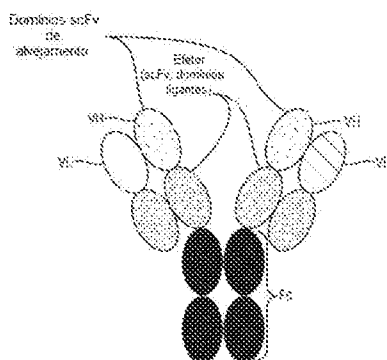
(72) Inventor(es): JOANNE L. VINEY; NATHAN HIGGINSON-SCOTT.

(86) Pedido PCT: PCT US2018034334 de 24/05/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/217989 de 29/11/2018

(85) Data da Fase Nacional: 14/11/2019

(57) Resumo: Métodos e compostos para conferir privilégio imunológico local ou específico para localização.



"IMUNOTOLERÂNCIA ALVEJADA".REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório dos Estados Unidos N° 62/510,586, depositado em 24 de maio de 2017, Pedido Provisório dos Estados Unidos N° 62/510,816, depositado em 25 de maio de 2017, Pedido Provisório dos Estados Unidos N° 62/558,175, depositado em 13 de setembro de 2017 e Pedido Provisório dos Estados Unidos N° 62/595,352, depositado em 6 de dezembro de 2017, cada um dos quais é incorporado por referência na íntegra.

CAMPO

[0002] As modalidades fornecidas aqui se referem, por exemplo, a métodos e composições para privilégio imunológico local ou alvejado.

ANTECEDENTES

[0003] Casos de respostas imunes indesejadas, por exemplo, conforme na rejeição de tecidos transplantados ou em doenças autoimunes, constituem um grande problema de saúde para milhões de pessoas em todo o mundo. Os resultados a longo prazo para o transplante de órgãos são frequentemente caracterizados por rejeição crônica e eventual falha do órgão transplantado. São conhecidos mais de vinte transtornos autoimunes que afetam essencialmente todos os órgãos do corpo

e afetam mais de cinquenta milhões de pessoas somente na América do Norte. Os medicamentos imunossupressores amplamente ativos usados para combater a resposta imune patogênica em ambas as situações têm sérios efeitos colaterais.

SUMÁRIO

[0004] São descritos aqui métodos e compostos terapêuticos que conferem privilégio imunológico específico para uma localização. As modalidades descritas aqui são incorporadas por referência nesta seção.

[0005] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende um composto multiespecífico manipulado, por exemplo, uma molécula biespecífica manipulada, por exemplo, uma molécula de anticorpo biespecífico manipulada, que compreende:

1) uma porção de alvejamento específica selecionada a partir de:

a) uma porção de alvejamento específica para doador a qual, por exemplo, se liga preferencialmente a um alvo do doador (de preferência quando comparado com a ligação a um antígeno do receptor) e é útil para conferir privilégio imunológico específico para uma localização a um tecido de transplante, por exemplo, um órgão, de um doador; ou

b) uma porção de alvejamento específica para um tecido a qual, por exemplo, se liga preferencialmente a um tecido alvo do indivíduo (de preferência quando comparado com o tecido não-alvo do indivíduo) e é útil para conferir privilégio imunológico específico para uma localização a um tecido do indivíduo que sofre ataque imune indesejado, por exemplo, em um transtorno autoimune); e

2) uma porção de ligação/modulação efetora selecionada a partir de:

(a) uma porção de ligação/modulação de molécula inibidora de células imunes (denominada aqui como uma porção de ligação/modulação ICIM);

(b) uma porção de ligação/modulação de célula imune imunossupressora (denominada aqui como uma porção de ligação/modulação IIC);

(c) uma porção de ligação/modulação efetora que, como parte de um composto terapêutico, promove um microambiente local imunossupressor, por exemplo, ao fornecer, na proximidade do alvo, uma substância que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo (denominada aqui como uma porção de ligação/modulação SM); ou

(d) uma porção de ligação/modulação de molécula estimuladora de células imunes (denominada aqui como uma porção de ligação/modulação ICSM), em que a ICSM inibe a

ativação imune, por exemplo, ao bloquear a interação entre uma molécula coestimuladora e sua contraestrutura.

[0006] Uma porção de ligação/modulação efetora pode cair em mais de uma das classes a, b e c. Por exemplo, conforme é mostrado abaixo, uma molécula de ligação a CTLA4 cai em ambas as categorias a e b.

[0007] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM. Em algumas modalidades, uma molécula de ligação/modulação ICIM se liga e é agonista de uma molécula inibidora, por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune ou inibe ou reduz a atividade de uma célula imune, por exemplo, uma célula T citotóxica, uma célula B, célula NK ou uma célula mieloide, por exemplo, um neutrófilo ou macrófago.

[0008] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende um composto multiespecífico manipulado, por exemplo, uma molécula biespecífica manipulada, por exemplo, uma molécula de anticorpo biespecífico manipulada, que compreende:

1) uma porção de alvejamento específica, por exemplo, uma porção de alvejamento específica para doador (a qual se liga a um alvo do doador e é útil para conferir privilégio imunológico específico para uma localização a um tecido de transplante, por exemplo, um órgão, de um doador) ou uma

porção de alvejamento específica para um tecido (a qual se liga a um tecido alvo do indivíduo e é útil para conferir privilégio imunológico específico para uma localização a um tecido do indivíduo que sofre ataque imune indesejado, por exemplo, em um transtorno autoimune); e

2) uma porção de ligação/modulação efetora que compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que se liga a uma molécula efetora em uma célula imune, por exemplo, um receptor inibidor, por exemplo, PD-1 em que, após a ligação da porção de alvejamento específica ao seu alvo e ligação da porção de ligação/modulação ICIM a uma molécula efetora na célula imune, uma atividade da célula imune, por exemplo, a capacidade da célula imune de montar um ataque imune, é negativamente regulada, por exemplo, através de um sinal inibidor dependente do agrupamento de moléculas efetoras na célula imune. Em algumas modalidades, o composto multiespecífico manipulado compreende porções de ligação adicionais para de modo que ele se liga a mais de duas moléculas específicas tal como, porém sem limitações, 3 ou 4.

[0009] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM e tem uma ou ambas das seguintes propriedades: (a) o nível de regulação negativa de uma célula imune é maior quando o composto

terapêutico está ligado ao seu alvo do que quando o composto terapêutico não está ligado ao seu alvo; e (b) o composto terapêutico, quando acoplado com um receptor inibidor sobre a superfície celular, por exemplo, PD-1, em uma célula imune, não inibe ou não inibe substancialmente a capacidade do receptor inibidor sobre a superfície celular de se ligar a um ligante endógeno.

[0010] Em algumas modalidades, o nível de regulação negativa de uma célula imune é maior quando o composto terapêutico está ligado ao seu alvo do que quando o composto terapêutico não está ligado ao seu alvo. Nas modalidades, o nível de regulação negativa pelo composto terapêutico ligado ao alvo é igual ou maior do que 1,5 vezes, 2 vezes, 4 vezes, 8 vezes ou 10 vezes maior do que aquele que é observado quando ele não está ligado ao seu alvo. Nas modalidades, o composto terapêutico não regula negativamente ou não regula negativamente de forma significativa as células imunes quando não está ligado ao alvo. Assim, o agonismo indiscriminado ou indesejado de um receptor inibidor, por exemplo, PD-1, é minimizado ou eliminado. Por exemplo, quando o composto terapêutico está ligado a uma célula imune, mas não ligado à porção alvejada, o acoplamento de uma molécula inibidora do ponto de verificação imune pelo composto terapêutico não resulta em regulação negativa ou não resulta

em regulação negativa substancial, por exemplo, o receptor inibidor na célula imune à qual o composto terapêutico está ligado, não está agrupado ou não está suficientemente agrupado para resultar em um sinal inibidor suficiente para conferir regulação negativa ou inibição substancial da célula imune.

[0011] Em modalidades, o composto terapêutico, quando acoplado com um receptor inibidor sobre a superfície celular, por exemplo, PD-1, em uma célula imune, não inibe ou não inibe substancialmente a capacidade do receptor inibidor sobre a superfície celular de se ligar a um ligante endógeno. Em algumas modalidades, o composto terapêutico pode se ligar ao sítio de ligação de PD-L1/2 no PD-1. Assim, o antagonismo indiscriminado ou indesejado de um receptor inibidor, por exemplo, PD-1, é minimizado ou eliminado. Em modalidades, a ligação do composto terapêutico a um receptor inibidor, por exemplo, PD-1, em uma célula imune não impede, ou não impede substancialmente, a capacidade do receptor inibidor de se ligar a um ligante natural, por exemplo, PD-L1. Em modalidades, a ligação do composto terapêutico a um receptor inibidor, por exemplo, PD-1, em um [sistema] imune reduz a ligação de um ligante natural, por exemplo, PD-L1, em menos de 50, 40, 30, 20, 10 ou 5 % daquele que é observado na ausência de composto terapêutico.

[0012] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM e, quando administrado a um indivíduo em uma dose terapeuticamente eficaz, não resulta em níveis inaceitáveis de supressão imune sistêmica, conforme seria possível se ocorresse agonismo indiscriminado do receptor inibidor em todas as células imunes de um tipo, por exemplo, todas as células T, ou níveis inaceitáveis de ativação imune sistêmica, conforme seria possível se o composto terapêutico antagonizasse a interação do receptor inibidor com seu ligante natural.

[0013] Embora não deseje estar limitado pela teoria, acredita-se que, após a administração a um indivíduo, um composto terapêutico que compreende uma porção de ligação/modulação ICIM pode existir em qualquer um dos quatro estados: i) não ligado e livre em solução; ii) ligado apenas a um receptor inibidor expresso sobre a superfície de uma célula imune, por exemplo, uma célula T, através da porção de ligação/modulação ICIM; iii) ligado apenas à superfície do transplante alvo ou tecido do indivíduo através da porção de alvejamento; e iv) ligado à superfície do transplante alvo ou tecido do indivíduo através da porção de alvejamento e a um receptor inibidor expresso por uma célula imune, por exemplo, uma célula T, através da porção de ligação/modulação ICIM. Quando o composto terapêutico está ligado apenas ao

transplante alvo ou tecido do indivíduo (iii) através da porção de alvejamento, ele não tem, ou não tem nenhum efeito substancial, sobre o transplante ou tecido alvo. Quando o composto terapêutico está ligado ao transplante ou tecido alvo através da porção de alvejamento e ligado a um receptor inibidor expresso por uma célula imune, por exemplo, uma célula T, através da porção de ligação/modulação ICIM (iv), ele cria privilégio imune no órgão ou tecido alvo. Embora não deseje estar limitado pela teoria, acredita-se que isto seja alcançado por multimerização, pelo transplante alvo ou tecido do doador, das moléculas do composto terapêutico sobre sua superfície, por exemplo, ao imobilizar uma pluralidade de moléculas de composto terapêutico em uma alta densidade e valência. A multimerização das moléculas do composto terapêutico permite que as porções de ligação/modulação ICIM dos compostos terapêuticos promovam o agrupamento de receptores inibidores expressos sobre a superfície da célula imune, por exemplo, uma célula T patogênica, e transmissão de um sinal inibidor que funciona para silenciar ou regular negativamente a célula imune. Por exemplo, no caso de células T, pode ser usado um composto terapêutico que compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula de PD-L1 ou um Ab anti-PD-1. A ligação de uma pluralidade de moléculas do composto terapêutico ao alvo resulta em

multimerização das moléculas do composto terapêutico o que, por sua vez, em virtude da molécula de PD-L1 ou uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional, leva ao agrupamento de PD-1 sobre a célula T. Se este agrupamento ocorrer no contexto de apresentação de antígeno pelo MHC alvo, no receptor de células T sobre a célula T, um sinal negativo é gerado e a célula T será inativada. Em modalidades, a porção de ligação/modulação ICIM, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional, se liga à molécula efetora, mas não inibe, ou inibe substancialmente, a interação da molécula efetora com seu(s) ligante(s) nativo(s).

[0014] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação IIC, a qual se liga e recruta uma célula imune imunossupressora, por exemplo, uma Treg, por exemplo, uma Treg Foxp3+ CD25+, para a proximidade do tecido alvo.

[0015] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação SM a qual modula, por exemplo, se liga e inibe, captura, degrada ou neutraliza uma substância, por exemplo, uma molécula solúvel que modula uma resposta imune, por exemplo, ATP ou AMP.

[0016] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento que é específica para um alvo sobre uma célula imune. Em algumas modalidades, o

alvo é conforme descrito aqui. Em algumas modalidades, o alvo é MAdCAM. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento é um anticorpo que se liga à MAdCAM.

[0017] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICSM a qual se liga a uma molécula estimuladora, por exemplo, uma molécula coestimuladora. Em algumas modalidades, a ICSM inibe a contraestrutura da molécula coestimuladora através de ligação/modulação da molécula coestimuladora ou a contraestrutura da molécula coestimuladora pode servir para regular negativamente a capacidade de uma célula imune de montar uma resposta imune. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação ICSM pode se ligar a uma molécula estimuladora, por exemplo, molécula coestimuladora sobre uma célula imune, por exemplo, OX40 sobre células T, ou o membro oposto da molécula estimuladora, por exemplo, OX40L em outra célula tal como, porém sem limitações, células imunes, tais como células NK, mastócitos, células dendríticas ou, por exemplo, células não imunes, tais como células endoteliais ou células do músculo liso.

[0018] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento específica para doador e confere privilégio imune específico para uma localização ao tecido de transplante de doador implantado em um

indivíduo. Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento específica para um tecido e confere privilégio imune específico para uma localização ao tecido de um indivíduo, por exemplo, um tecido afetado por uma resposta imune indesejada em um transtorno autoimune.

[0019] A porção de alvejamento é específica para o transplante do doador ou tecido do indivíduo a ser protegido do sistema imune. Em algumas modalidades, a porção de ligação da molécula efetora compreende um domínio de ligação gerado *de novo*, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação efetora compreende a sequência de aminoácidos derivada do ligante natural que reconhece um receptor inibidor expresso sobre a superfície de uma célula imune, por exemplo, uma célula T.

[0020] Em algumas modalidades, o composto terapêutico silencia células imunes, por exemplo, células T, próximas ao transplante ou tecido do doador a ser protegido, mas não silencia células imunes, por exemplo, células T, distantes do alvo, uma vez que o composto terapêutico requer a presença do transplante alvo ou tecido do doador para função. Isto contrasta com quando o composto terapêutico se liga apenas ao receptor inibidor expresso pela célula imune, por exemplo, célula T, caso no qual não há consequência funcional.

[0021] Os métodos e compostos terapêuticos descritos aqui se baseiam, pelo menos em parte, no fornecimento de privilégio imunológico específico para uma localização. Os compostos terapêuticos e o método de uso dos mesmos descritos aqui permitem a minimização, por exemplo, a redução ou eliminação, de administração sistêmica não específica para uma localização de agentes terapêuticos imunossupressores em contextos clínicos, por exemplo, onde a reversão e supressão de uma resposta imune são desejadas, tal como em doenças ou tecidos autoimunes, por exemplo, transplante de órgãos. Embora capazes de uma resposta clinicamente significativa quando a fisiopatologia subjacente disparada por um sistema imune aberrante é afetada, os imunossupressores de ação ampla têm o efeito indesejável de reduzir a função do sistema imune sistêmico do paciente. Uma vez que o papel de um sistema imune que funciona normalmente é combater a constante barragem de organismos patogênicos e oportunistas existentes no ambiente circundante e eliminar constantemente células cancerosas de indivíduos saudáveis, os pacientes submetidos à imunossupressão crônica têm um risco aumentado de desenvolver infecções e câncer. Os métodos e compostos terapêuticos descritos aqui fornecem terapias que têm como alvo e atenuam, reduzem ou extinguem seletivamente apenas a resposta imune patogênica no local da

patologia, ao mesmo tempo em que têm inibição mínima da função normal do sistema imune sistêmico em outro local.

[0022] Em algumas modalidades, é fornecido um composto terapêutico conforme fornecido aqui. Em algumas modalidades, o composto compreende i) uma porção de alvejamento específica selecionada a partir de: a) uma porção de alvejamento específica para doador a qual, por exemplo, se liga preferencialmente a um alvo do doador; ou b) uma porção de alvejamento específica para um tecido a qual, por exemplo, se liga preferencialmente ao tecido alvo de um indivíduo; e ii) uma porção de ligação/modulação efetora selecionada a partir de: (a) uma porção de ligação/modulação de molécula inibidora de célula imune (porção de ligação/modulação ICIM); (b) uma porção de ligação/modulação imunossupressora de célula imune (porção de ligação/modulação IIC); ou (c) uma porção de ligação/modulação efetora que, como parte de um composto terapêutico, promove um microambiente local imunossupressor, por exemplo, ao fornecer, na proximidade do alvo, uma substância que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo (porção de ligação/modulação SM).

[0023] Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICIM. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de

ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune. Em algumas modalidades, a molécula contraligante da molécula imune inibidora compreende uma molécula de PD-L1. Em algumas modalidades, a ICIM é aquela em que a molécula contraligante da molécula imune inibidora se acopla a uma molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata selecionada a partir de PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB ou CTLA-4. Em algumas modalidades, a ICIM é um anticorpo. Em algumas modalidades, a ICIM compreende um anticorpo que se liga à PD-1, KIR2DL4, LILRB 1, LILRB ou CTLA-4. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação ICIM compreende uma molécula de anticorpo funcional para uma molécula inibidora sobre a superfície celular.

[0024] Em algumas modalidades, a molécula inibidora sobre a superfície celular é uma molécula inibidora do ponto de verificação imune. Em algumas modalidades, a molécula inibidora do ponto de verificação imune é selecionada a partir de PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB2, CTLA-4 ou selecionada a partir da Tabela 1.

[0025] Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação IIC.

[0026] Em algumas modalidades, o composto tem a fórmula, a partir do N-terminal para o C-terminal:

R1 --- Região Ligante A - R2 ou R3 - Região Ligante B - R4,

em que R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente, uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente; contanto que uma porção de ligação/modulação efetora e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0027] Em algumas modalidades, são fornecidos polipeptídeos que compreendem uma porção de alvejamento que se liga a uma célula-alvo e uma porção de ligação/modulação efetora, em que a porção de ligação/modulação efetora é um polipeptídeo de muteína de IL-2 (muteína de IL-2), a qual é uma proteína IL-2 mutante. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento compreende um anticorpo que se liga a uma proteína alvo sobre a superfície de uma célula-alvo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende duas cadeias polipeptídicas, conforme fornecido aqui. Em algumas modalidades, a primeira cadeia compreende um domínio VH e a segunda cadeia compreende um domínio VL de um anticorpo que se liga à célula-alvo ou a uma proteína que é expressa na

célula-alvo tal como, porém sem limitações, MAdCAM. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento é um anticorpo que se liga à MAdCAM. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento se liga à OAT1 (SLC22A6) e OCT2 (SLC22A2). Em algumas modalidades, a porção de alvejamento é um anticorpo que se liga à OAT1 (SLC22A6) e OCT2 (SLC22A2). Em algumas modalidades, a porção de alvejamento não se liga à OAT1 (SLC22A6) e OCT2 (SLC22A2). Para evitar dúvidas, a OCT2 mencionada aqui não é o fator de transcrição, mas a proteína na superfície expressa em tecido renal. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento é uma porção que se liga especificamente a uma proteína encontrada no pâncreas. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento se liga à FXYD2, TSPAN7, DPP6, HEPACAM2, TMEM27 ou GPR119. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento não se liga à FXYD2, TSPAN7, DPP6, HEPACAM2, TMEM27 ou GPR119. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento é um anticorpo que se liga à FXYD2, TSPAN7, DPP6, HEPACAM2, TMEM27 ou GPR119.

[0028] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma primeira cadeia e uma segunda cadeia que formam o polipeptídeo ou composto terapêutico, em que

a primeira cadeia compreende:

V_H -H_c-Ligante-C₁, em que V_H é um domínio pesado variável que se liga à célula-alvo com um domínio VL da segunda

cadeia; H_c é uma cadeia pesada de anticorpo que compreende o domínio CH1-CH2-CH3, o Ligante é uma sequência de aminoácidos glicina/serina conforme fornecido aqui ou está ausente, e C₁ é uma muteína de IL-2 que pode ser fundida a uma proteína Fc na orientação N-terminal ou C-terminal conforme fornecido aqui, em que pode haver um ligante de glicina/serina que liga a muteína de IL-2 à proteína Fc; e

a segunda cadeia compreende:

V_L-L_c, em que V_L é um domínio variável de cadeia leve que se liga à célula-alvo com o domínio V_H da primeira cadeia e o domínio L_c é um domínio CK de cadeia leve. Em algumas modalidades, a primeira cadeia compreende C₁-Ligante-V_H-H_c, com as variáveis conforme definido acima.

[0029] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende a fórmula C₁-ligante-CH2-CH3-Ligante-scFv, em que C₁ e o Ligante são conforme definidos acima e aqui, CH2 e CH3 são domínios de cadeia pesada e scFv é um fragmento semelhante a anticorpo de cadeia única que atua como a porção de alvejamento para ligação aos alvos teciduais, conforme fornecido aqui. Em algumas modalidades, a muteína é fundida à região Fc conforme fornecido aqui e um ou mais dos ligantes estão ausentes. Em algumas modalidades, o Ligante é um ligante de glicina/serina, conforme fornecido aqui. Em algumas modalidades, o ligante é uma sequência peptídica.

[0030] Em algumas modalidades, são fornecidos aqui métodos de tratamento de doenças ou condições autoimunes, os métodos compreendendo administrar um ou mais dos compostos terapêuticos ou polipeptídeos fornecidos aqui.

[0031] Em algumas modalidades, são fornecidos aqui métodos de tratamento de doenças ou condições, os métodos compreendendo administrar um ou mais dos compostos terapêuticos ou polipeptídeos fornecidos aqui.

[0032] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de um indivíduo com doença inflamatória intestinal, os métodos compreendendo administrar um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo para tratar a doença inflamatória intestinal. Em algumas modalidades, o indivíduo tem doença de Crohn e/ou colite ulcerativa.

[0033] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de um indivíduo com hepatite autoimune, os métodos compreendendo administrar um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo para tratar a hepatite autoimune.

[0034] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de colangite esclerosante primária, os métodos compreendendo administrar um composto terapêutico ou

polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo para tratar a colangite esclerosante primária.

[0035] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento (por exemplo, redução) de inflamação intestinal, os métodos compreendendo administrar um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo para tratar a inflamação intestinal. Em algumas modalidades, a inflamação está no intestino delgado. Em algumas modalidades, a inflamação está no intestino grosso. Em algumas modalidades, a inflamação está no intestino ou no cólon.

[0036] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento (por exemplo, redução) de inflamação no pâncreas, os métodos compreendendo administrar um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo para tratar a inflamação no pâncreas. Em algumas modalidades, os métodos tratam a pancreatite.

[0037] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de diabetes de tipo 1, os métodos compreendendo administrar um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo para tratar o diabetes de tipo 1.

[0038] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de um indivíduo transplantado, os métodos

compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo, deste modo, tratando um indivíduo transplantado (receptor).

[0039] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de GVHD em um indivíduo que tem um tecido do doador transplantado, os métodos compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui ao indivíduo.

[0040] Em algumas modalidades, são fornecidos métodos de tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, um transtorno autoimune, os métodos compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico ou polipeptídeos conforme fornecido aqui, deste modo, tratando o indivíduo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0041] A FIG. 1 representa modalidades não limitativas dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0042] A FIG. 2 representa uma ilustração não limitativa de como um composto terapêutico fornecido aqui poderia funcionar.

[0043] A FIG. 3 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0044] A FIG. 3A representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0045] A FIG. 4 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0046] A FIG. 5 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0047] A FIG. 6 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0048] A FIG. 7 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0049] A FIG. 8 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0050] A FIG. 9 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0051] A FIG. 10 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0052] A FIG. 11 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0053] A FIG. 12 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0054] A FIG. 13 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0055] A FIG. 14 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0056] A FIG. 15 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0057] A FIG. 16 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0058] A FIG. 17 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0059] A FIG. 18 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0060] A FIG. 19 representa uma ilustração não limitativa dos compostos terapêuticos fornecidos aqui.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0061] O presente Pedido incorpora, por referência, o Pedido dos Estados Unidos N° 15/922,592, depositado em 15 de março de 2018, e o Pedido PCT N° PCT/US2018/022675, depositado em 15 de março de 2018, cada um dos quais é incorporado por referência na íntegra.

[0062] Conforme usado aqui e a menos que indicado de outra forma, o termo "cerca de" se destina a significar ± 5 % do valor que ele modifica. Assim, cerca de 100 significa 95 a 105.

[0063] Conforme usado aqui e nas reivindicações anexas, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem a referência no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0064] Conforme usado aqui, o termo "cerca de" significa que o valor numérico é aproximado e pequenas variações não afetariam significativamente a prática das modalidades descritas. Quando uma limitação numérica é usada, a menos que indicado de outra forma pelo contexto, "cerca de" significa que o valor numérico pode variar em $\pm 10\%$ e permanecer dentro do escopo das modalidades descritas.

[0065] Conforme usado aqui, o termo "animal" inclui, porém não está limitado a, humanos e vertebrados não humanos, tais como animais selvagens, domésticos e de fazenda.

[0066] Conforme usado aqui, o termo "contatar" significa reunir dois elementos em um sistema *in vitro* ou em um sistema *in vivo*. Por exemplo, "contatar" um composto terapêutico com um indivíduo ou paciente ou célula inclui a administração do composto a um indivíduo ou paciente, tal como um humano, bem como, por exemplo, introduzir um composto em uma amostra que contém uma preparação celular ou purificada que contém um alvo.

[0067] Conforme usado aqui, os termos "compreendendo" (e qualquer forma de compreendendo, tal como "compreendem", "compreende" e "compreendido"), "tendo" (e qualquer forma de ter, tal como "têm" e "tem"), "incluindo" (e qualquer forma de incluindo, tal como "inclui" e "incluem") ou "contendo" (e qualquer forma de contendo, tal como "contém" e "contêm"),

são inclusivos ou abertos e não excluem elementos ou etapas do método não citados e adicionais. Qualquer composição ou método que cite o termo "compreendendo" também deve ser entendido como descrevendo estas composições como consistindo, consistindo em ou consistindo essencialmente nos componentes ou elementos citados.

[0068] Conforme usado aqui, o termo "fundido" ou "ligado", quando usado em referência a uma proteína com diferentes domínios ou sequências heterólogas, significa que os domínios de proteína fazem parte da mesma cadeia peptídica que estão conectados uns aos outros com ligações peptídicas ou outra ligação covalente. Os domínios ou seções podem ser ligados ou fundidos diretamente entre si ou outro domínio ou sequência peptídica pode estar entre os dois domínios ou sequências e estas sequências ainda seriam consideradas fundidas ou ligadas uma à outra. Em algumas modalidades, os vários domínios ou proteínas fornecidas aqui estão ligados ou fundidos diretamente entre si ou com sequências de ligantes, tais como as sequências de glicina/serina descritas aqui ligam os dois domínios.

[0069] Conforme usado aqui, os termos "indivíduo", "pessoa" ou "paciente", usados de forma alternada, significam qualquer animal, incluindo mamíferos, tais como camundongos, ratos, outros roedores, coelhos, cães, gatos,

suínos, bovinos, ovinos, cavalos ou primatas, tais como humanos.

[0070] Conforme usado aqui, o termo "inibir" se refere a um resultado, sintoma ou atividade que é reduzida comparado com a atividade ou resultado na ausência do composto que está inibindo o resultado, sintoma ou atividade. Em algumas modalidades, o resultado, sintoma ou atividade é inibida em cerca de, ou pelo menos, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 99 %. Um resultado, sintoma ou atividade também pode ser inibida se for completamente eliminada ou extinta.

[0071] Conforme usado aqui, a frase "que precisa do mesmo" significa que o indivíduo foi identificado como tendo necessidade do método ou tratamento específico. Em algumas modalidades, a identificação pode ser através de qualquer meio diagnóstico. Em qualquer um dos métodos e tratamentos descritos aqui, o indivíduo pode precisar dos mesmos. Em algumas modalidades, o indivíduo está em um ambiente ou viajará para um ambiente em que uma doença, transtorno ou condição específica é predominante.

[0072] Conforme usado aqui, a frase "número inteiro de X a Y" significa qualquer número inteiro que inclua os pontos finais. Por exemplo, a frase "número inteiro de X a Y" significa 1, 2, 3, 4 ou 5.

[0073] Conforme usado aqui, o termo "mamífero" significa um roedor (isto é, um camundongo, um rato ou um porquinho-da-índia), um macaco, um gato, um cachorro, uma vaca, um cavalo, um porco ou um humano. Em algumas modalidades, o mamífero é um humano.

[0074] Em algumas modalidades, são fornecidos aqui compostos terapêuticos. Em algumas modalidades, o composto terapêutico é uma proteína ou um polipeptídeo que tem múltiplas cadeias que interagem umas com as outras. Os polipeptídeos podem interagir entre si por meio de interações não covalentes ou interações covalentes, tal como através de ligações de dissulfeto ou outras ligações covalentes. Portanto, se uma modalidade se referir a um composto terapêutico, também pode-se dizer que ela se refere a uma proteína ou polipeptídeo conforme fornecido aqui e vice-versa, de acordo com a orientação do contexto.

[0075] Conforme usado aqui, a frase "oftalmicamente aceitável" significa não ter efeito prejudicial persistente sobre o olho tratado ou seu funcionamento ou a saúde geral do indivíduo a ser tratado. No entanto, será reconhecido que efeitos transitórios, tais como irritação menor ou sensação de ardência, são comuns na administração oftálmica tópica de medicamentos e a existência de tais efeitos transitórios não é inconsistente com a composição, formulação ou ingrediente

(por exemplo, excipiente) em questão ser "oftalmicamente aceitável", conforme definido aqui. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas podem ser oftalmicamente aceitáveis ou adequadas para administração oftálmica.

[0076] "Ligação específica" ou "se liga especificamente a" ou é "específico para" um antígeno, alvo ou epítopo específico significa uma ligação que é diferente, de forma mensurável, de uma interação não específica. A ligação específica pode ser medida, por exemplo, ao determinar a ligação de uma molécula comparado com a ligação de uma molécula de controle, a qual geralmente é uma molécula de estrutura similar que não tem atividade de ligação. Por exemplo, a ligação específica pode ser determinada pela competição com uma molécula de controle que é similar ao alvo.

[0077] A ligação específica para um antígeno, alvo ou um epítopo particular pode ser exibida, por exemplo, por um anticorpo que tem uma K_D para um antígeno ou epítopo de pelo menos cerca de 10^{-4} M, pelo menos cerca de 10^{-5} M, pelo menos cerca de 10^{-6} M, pelo menos cerca de 10^{-7} M, pelo menos cerca de 10^{-8} M, pelo menos cerca de 10^{-9} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-10} M, pelo menos cerca de 10^{-11} M, pelo menos cerca de 10^{-12} M, ou maior, em que K_D se refere a uma taxa de dissociação de uma determinada interação anticorpo-alvo.

Tipicamente, um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno ou alvo terá uma K_D que é, ou é pelo menos, 2, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ou mais vezes maior para uma molécula de controle em relação ao antígeno ou epítopo.

[0078] Em algumas modalidades, a ligação específica para um antígeno, alvo ou um epítopo particular pode ser exibida, por exemplo, por um anticorpo que tem uma K_A ou K_a para um alvo, antígeno ou epítopo de pelo menos 2, 4, 5, 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 ou mais vezes maior para o alvo, antígeno ou epítopo em relação a um controle, em que K_A ou K_a se refere a uma taxa de associação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

[0079] Conforme fornecido aqui, os compostos e composições terapêuticos podem ser usados em métodos de tratamento conforme fornecido aqui. Conforme usado aqui, os termos "tratar", "tratado" ou "tratamento" significam tanto tratamento terapêutico quanto medidas profiláticas, em que o objetivo é desacelerar (diminuir) uma condição fisiológica, transtorno ou doença indesejada ou obter resultados clínicos desejados ou benéficos. Para fins destas modalidades, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, porém não estão limitados a, alívio dos sintomas; redução de extensão da condição, transtorno ou

doença; estado estabilizado (isto é, sem piora) da condição, transtorno ou doença; retardo no início ou diminuição de progressão da condição, transtorno ou doença; melhora da condição, transtorno ou estado patológico ou remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável; uma melhora de pelo menos um parâmetro físico mensurável, não necessariamente discernível pelo paciente; ou otimização ou melhora da condição, transtorno ou doença. O tratamento inclui provocar uma resposta clinicamente significativa sem níveis excessivos de efeitos colaterais. O tratamento também inclui prolongar a sobrevida comparado com a sobrevida esperada se não recebesse tratamento.

[0080] São fornecidos aqui compostos terapêuticos, por exemplo, moléculas de proteína terapêuticas, por exemplo, proteínas de fusão, incluindo uma porção de alvejamento e uma porção de ligação/modulação efetora, tipicamente como domínios separados. Também são fornecidos métodos de uso e produção dos compostos terapêuticos. A porção de alvejamento serve para dirigir o composto terapêutico e, portanto, a porção de ligação/modulação efetora, a um local no qual o privilégio imune é desejado. A porção de ligação/modulação efetora compreende um ou mais de: (a) uma porção de ligação/modulação de molécula inibidora de células imunes (uma porção de ligação/modulação ICIM); (b) uma porção de

ligação/modulação imunossupressora de célula imune (uma porção de ligação/modulação IIC); (c) uma porção de ligação/modulação de molécula solúvel (uma porção de ligação/modulação SM) ou (d) uma molécula que bloqueia ou inibe a porção de ligação/modulação de molécula estimuladora de células imunes (denominada aqui como uma porção de ligação/modulação ICSM). Em algumas modalidades, a ICSM inibe a ativação imune, por exemplo, ao bloquear a interação entre uma molécula coestimuladora e sua contraestrutura. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende: (a) e (b); (a) e (c); (a) e (d); (b) e (c); (b) e (d); (c) e (d); ou (a), (b), (c) e (d).

[0081] A presente invenção fornece, por exemplo, moléculas que podem atuar como agonistas de PD-1. Sem estar preso a nenhuma teoria em particular, o agonismo de PD-1 inibe a ativação/sinalização de células T e pode ser realizado através de diferentes mecanismos. Por exemplo, a reticulação pode levar ao agonismo e foram descritos agonistas de PD-1 funcionais ligados a esferas (Akkaya. Ph.D. Thesis: Modulation of the PD-1 pathway by inhibitory antibody superagonists. *Christ Church College, Oxford, Reino Unido*, 2012), o qual é aqui incorporado por referência.

[0082] A reticulação de PD-1 com dois mAbs que se ligam a epítomos não sobrepostos induz a sinalização de PD-1

(Davis, documento US 2011/0171220), o qual é aqui incorporado por referência. Outro exemplo é ilustrado pelo uso de um antissoro anti-PD-1 de cabra (por exemplo, AF1086, R&D Systems), o qual é aqui incorporado por referência, que atua como agonista quando solúvel (Said et al., 2010, *Nat Med*), o qual é aqui incorporado por referência. Exemplos não limitativos de agonistas de PD-1 que podem ser usados nas presentes modalidades incluem, porém não estão limitados a, clone 19 ou clone 10 UCB, PD1AB-1, PD1AB-2, PD1AB-3, PD1AB-4 e PD1AB-5, PD1AB-6 (Anaptys/Celgene), PD1-17, PD1-28, PD1-33 e PD1-35 (Collins et al., documento US 2008/0311117 A1, *Antibodies against PD-1 and uses therefor*, o qual é incorporado por referência), ou pode ser um anti-PD-1/anti-CD3 (Ono) monovalente, biespecífico e assim por diante. Em algumas modalidades, os anticorpos agonistas de PD-1 podem ser anticorpos que bloqueiam a ligação de PD-L1 à PD-1. Em algumas modalidades, os anticorpos agonistas de PD-1 podem ser anticorpos que não bloqueiam a ligação de PD-L1 à PD-1.

[0083] O agonismo de PD-1 pode ser medido por meio de qualquer método, tais como os métodos descritos nos exemplos. Por exemplo, podem ser construídas células que expressam, incluindo expressam de forma estável, construções que incluem um polipeptídeo de PD-1 humana fundido com um "doador enzimático" de b-galactosidase e 2) um polipeptídeo

de SHP-2 fundido com um acceptor enzimático de b-galactosidase. Sem estar preso a nenhuma teoria, quando a PD-1 é ativada, a SHP-2 é recrutada para a PD-1. O acceptor enzimático e o doador enzimático formam uma enzima b-galactosidase totalmente ativa que pode ser testada. No entanto, o ensaio não mostra diretamente o agonismo de PD-1, porém, mostra a ativação da sinalização de PD-1. O agonismo de PD-1 também pode ser medido ao medir a inibição da ativação de células T uma vez que, sem estar preso a nenhuma teoria, o agonismo de PD-1 inibe a ativação de células T induzida por anti-CD3. Por exemplo, o agonismo de PD-1 pode ser medido ao pré-ativar células T com PHA (para células T humanas) ou ConA (para células T de camundongo), de modo que elas expressem PD-1. As células podem, então, ser reativadas com anti-CD3 na presença de anti-PD-1 (ou PD-L1) para o ensaio de agonismo de PD-1. As células T que recebem um sinal agonista de PD-1 na presença de anti-CD3 mostrarão uma ativação reduzida em relação apenas à estimulação de anti-CD3. A ativação pode ser lida pela proliferação ou produção de citocinas (IL-2, IFN γ , IL-17) ou outros marcadores, tal como o marcador de ativação CD69. Assim, o agonismo de PD-1 pode ser medido pela produção de citocinas ou proliferação celular. Outros métodos também podem ser usados para medir o agonismo de PD-1.

[0084] A PD-1 é um membro da superfamília Ig expressa sobre células T ativadas e outras células imunes. Os ligantes naturais para PD-1 parecem ser PD-L1 e PD-L2. Sem estar preso a nenhuma teoria em particular, quando PD-L1 ou PD-L2 se liga à PD-1 em uma célula T ativada, uma cascata de sinalização inibidora é iniciada, resultando em atenuação de função da célula T efetora ativada. Assim, o bloqueio da interação entre PD-1 em uma célula T, e PD-L1/2 em outra célula (por exemplo, célula tumoral) com um antagonista de PD-1 é conhecido como inibição do ponto de verificação e liberta as células T da inibição. Em contraste, os anticorpos agonistas de PD-1 podem se ligar à PD-1 e enviar um sinal inibidor e atenuar a função de uma célula T. Assim, os anticorpos agonistas de PD-1 podem ser incorporados em várias modalidades descritas aqui como uma porção de ligação/modulação de molécula efetora, a qual pode realizar imunomodulação localizada específica para um tecido quando emparelhada com uma porção de alvejamento.

[0085] A porção de ligação/modulação de molécula efetora pode fornecer um sinal ou ambiente imunossupressor de várias maneiras. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que se liga diretamente e (sob as condições apropriadas conforme descrito aqui) ativa um

receptor inibidor expresso por células imunes responsáveis por controlar a patologia da doença. Em outra modalidade, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação IIC e se liga e acumula células imunes imunossupressoras. Em algumas modalidades, as células imunossupressoras acumuladas promovem privilégio imunológico. Em outra modalidade, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação SM que manipula o microambiente circundante para torná-lo menos admissível para função das células imunes, por exemplo, células imunes que controlam a patologia da doença. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação SM esgota uma entidade que promove ataque ou ativação imune. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICSM que liga um membro de um par de moléculas estimuladoras, por exemplo, moléculas coestimuladoras, e inibe a interação entre a molécula coestimuladora e a contraestrutura da molécula coestimuladora tal como, porém não limitado a, OX40 ou CD30 ou CD40 e OX40L ou CD30L ou CD40L, e inibe o estímulo imune de uma célula tal como, porém não limitado a, uma célula T, célula B, célula NK ou outra célula imune que constitui um membro do par.

[0086] A porção de alvejamento e a porção de ligação/modulação efetora são fisicamente unidas, de forma covalente ou não covalente, diretamente ou através de uma entidade ligante, uma à outra, por exemplo, como um membro da mesma molécula de proteína em uma molécula de proteína terapêutica. Em algumas modalidades, as porções de alvejamento e efetora são fornecidas em uma molécula de proteína terapêutica, por exemplo, uma proteína de fusão, tipicamente como domínios separados. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento, a porção de ligação/modulação efetora ou ambas compreendem uma molécula de anticorpo com um único domínio, por exemplo, uma molécula de VHH de anticorpo de camelídeo ou domínio VH solúvel humano. Ela também pode conter um domínio Fab ou variável de fragmento com uma única cadeia (scFv). Em algumas modalidades, a molécula de proteína terapêutica, ou um ácido nucleico, por exemplo, um mRNA ou DNA, que codifica a molécula de proteína terapêutica, pode ser administrado a um indivíduo. Em algumas modalidades, as porções de ligação/modulação de moléculas de alvejamento e efetora estão ligadas a uma terceira entidade, por exemplo, um carreador, por exemplo, um carreador polimérico, um dendrímero ou uma partícula, por exemplo, uma nanopartícula. Os compostos terapêuticos podem ser usados para regular negativamente uma resposta imune sobre ou em um

tecido em um alvo ou local selecionado, ao mesmo tempo em que não tem ou tem uma função imunossupressora substancialmente menor. O alvo ou local pode compreender tecido do doador ou tecido autólogo.

[0087] São fornecidos aqui métodos para conferir privilégio imunológico específico para uma localização a um tecido do doador transplantado, por exemplo, um tecido de aloenxerto, por exemplo, um tecido descrito aqui, por exemplo, um fígado de aloenxerto, um rim de aloenxerto, um coração de aloenxerto, um pâncreas de aloenxerto, um timo ou tecido tímico de aloenxerto, pele de aloenxerto ou pulmão de aloenxerto, com os compostos terapêuticos descritos aqui. Em modalidades, o tratamento minimiza a rejeição, minimiza o dano mediado por células imunes efectoras, prolonga a aceitação ou prolonga a vida funcional do tecido transplantado do doador.

[0088] Também são fornecidos aqui métodos para inibir a doença enxerto contra hospedeiro (GVHD) pela minimização da capacidade das células imunes doadoras, por exemplo, células T doadoras, de mediar o ataque imune ao tecido do receptor com os compostos terapêuticos descritos aqui.

[0089] Também são fornecidos aqui métodos de tratamento, por exemplo, tratamento terapêutico ou tratamento profilático (ou prevenção), de um transtorno ou

resposta autoimune em um indivíduo pela administração de um composto terapêutico descrito aqui, por exemplo, para conferir modulação específica para uma localização ou tecido do sistema imune. Em algumas modalidades, o método confere tolerância, minimização de rejeição, minimização do dano mediado por células efetoras imunes ou prolongamento de uma função do tecido do indivíduo. Em algumas modalidades, o composto terapêutico inclui uma porção de alvejamento que tem como alvo, por exemplo, alvos específicos, o tecido sob ou em risco de ataque autoimune. Tecidos exemplificativos não limitativos incluem, porém não estão limitados a, pâncreas, mielina, glândulas salivares, sinoviócitos e miócitos.

[0090] Conforme usado aqui, os termos "tratar", "tratado" ou "tratamento" se refere ao tratamento terapêutico em que o objetivo é desacelerar (diminuir) uma condição fisiológica, transtorno ou doença indesejada ou obter resultados clínicos benéficos ou desejados. Por exemplo, os resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, porém não estão limitados a, alívio dos sintomas; redução de extensão da condição, transtorno ou doença; estado estabilizado (isto é, sem piora) da condição, transtorno ou doença; retardo no início ou diminuição de progressão da condição, transtorno ou doença; melhora da

condição, transtorno ou estado patológico ou remissão (parcial ou total), detectável ou indetectável; melhora de pelo menos um parâmetro físico mensurável, não necessariamente discernível pelo paciente; ou otimização ou melhora da condição, transtorno ou doença. O tratamento inclui provocar uma resposta clinicamente significativa sem níveis excessivos de efeitos colaterais. O tratamento também inclui prolongar a sobrevida comparado com a sobrevida esperada se não recebesse tratamento. Assim, "tratamento de uma doença/transtorno autoimune" significa uma atividade que alivia ou melhora qualquer um dos fenômenos primários ou sintomas secundários associados à doença/transtorno autoimune ou outra condição descrita aqui. Várias doenças ou condições são fornecidas aqui. O tratamento terapêutico também pode ser administrado profilaticamente para prevenir ou reduzir a doença ou condição antes do início.

[0091] Em algumas modalidades, a administração do composto terapêutico começa após o transtorno ficar evidente. Em algumas modalidades, a administração do composto terapêutico começa antes do início ou início completo do transtorno. Em algumas modalidades, a administração do composto terapêutico começa antes do início ou início completo do transtorno, por exemplo, em um indivíduo que tem o transtorno, um indivíduo de alto risco,

um indivíduo com um biomarcador de risco ou presença do transtorno, um indivíduo com histórico familiar do transtorno ou outro indicador de risco ou presença assintomática do transtorno. Por exemplo, em algumas modalidades, um indivíduo que tem danos nas células das ilhotas, mas que ainda não é diabético, é tratado.

[0092] Embora sem desejar estar preso pela teoria, acredita-se que a porção de alvejamento funcione para ligar e acumular o produto terapêutico a um alvo seletivamente expresso no local anatômico em que o privilégio imune é desejado. Em algumas modalidades, por exemplo, no contexto de transplante de tecido do doador, a porção de alvejamento se liga a um alvo, por exemplo, um produto alélico, presente no tecido do doador, mas não no receptor. Para o tratamento de transtornos autoimunes, a porção de alvejamento se liga a um alvo expresso preferencialmente no local anatômico em que o privilégio imune é desejado, por exemplo, no pâncreas. Para o tratamento de GVHD, a porção de alvejamento tem como alvo o tecido do hospedeiro e protege o hospedeiro contra ataques de células efectoras imunes transplantadas derivadas de tecido transplantado.

[0093] Novamente, embora sem desejar estar preso pela teoria, acredita-se que a porção de ligação/modulação

efetora serve para fornecer um sinal imunossupressor ou, de outro modo, criar um ambiente imune privilegiado.

[0094] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual estas modalidades pertencem. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou testagem das presentes modalidades, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionadas aqui são incorporados por referência na íntegra. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser limitativos. Cabeçalhos, subtítulos ou elementos numerados ou com letras, por exemplo, (a), (b), (i), etc., são apresentados apenas para facilitar a leitura. O uso de cabeçalhos ou elementos numerados ou com letras aqui não requer que as etapas ou elementos sejam executados em ordem alfabética ou que as etapas ou elementos sejam necessariamente distintos uns dos outros. Outras características, objetivos e vantagens das modalidades serão evidentes a partir da descrição e desenhos, e a partir das reivindicações.

DEFINIÇÕES ADICIONAIS

[0095] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual as modalidades pertencem. Ao descrever e reivindicar as presentes modalidades, a terminologia a seguir e a terminologia de outra forma citada ao longo do presente pedido serão usadas de acordo com a forma como ela é definida, onde uma definição é fornecida.

[0096] Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui tem o objetivo apenas de descrever modalidades particulares, e não se destina a ser limitativa.

[0097] Molécula de anticorpo, conforme o termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo, por exemplo, uma cadeia de imunoglobulina ou um fragmento da mesma, que compreende pelo menos uma sequência de domínio variável de imunoglobulina funcional. Uma molécula de anticorpo abrange anticorpos (por exemplo, anticorpos completos) e fragmentos de anticorpos. Em algumas modalidades, uma molécula de anticorpo compreende um fragmento de ligação ao antígeno ou fragmento funcional de um anticorpo de comprimento total ou uma cadeia de imunoglobulina de comprimento total. Por exemplo, um anticorpo completo é uma molécula de imunoglobulina (Ig) (por exemplo, um anticorpo IgG) que

ocorre naturalmente ou é formada por meio de processos recombinatórios normais de fragmentos de genes de imunoglobulina). Nas modalidades, uma molécula de anticorpo se refere a uma porção de ligação a antígeno imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina, tal como um fragmento de anticorpo. Um fragmento de anticorpo, por exemplo, fragmento funcional, compreende uma porção de um anticorpo, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, fragmento variável (Fv), anticorpo de domínio (dAb) ou fragmento de variável com uma única cadeia (scFv). Um fragmento de anticorpo funcional se liga ao mesmo antígeno que aquele reconhecido pelo anticorpo intacto (por exemplo, comprimento total). Os termos "fragmento de anticorpo" ou "fragmento funcional" também incluem fragmentos isolados que consistem nas regiões variáveis, tais como fragmentos "Fv" que consistem nas regiões variáveis das cadeias pesada e leve ou moléculas de polipeptídeo recombinante com uma única cadeia nas quais as regiões variáveis de cadeias leve e pesada são conectadas por um ligante peptídico ("proteínas scFv"). Em algumas modalidades, um fragmento de anticorpo não inclui partes de anticorpos sem atividade de ligação a antígeno, tais como fragmentos Fc, ou resíduos de aminoácido individuais. Moléculas de anticorpo exemplificativas incluem anticorpos de comprimento total e fragmentos de anticorpo,

por exemplo, dAb (anticorpo de domínio), fragmentos com uma única cadeia, Fab, Fab' e F(ab')₂ e fragmentos variáveis com uma única cadeia (scFvs).

[0098] O termo "molécula de anticorpo" também abrange fragmentos inteiros ou de ligação a antígeno de anticorpos de domínio ou domínio único, os quais também podem ser denominados como "sdAb" ou "VHH". Os anticorpos de domínio compreendem V_H ou V_L que podem atuar como fragmentos de anticorpos isolados. Além disso, os anticorpos de domínio incluem anticorpos com cadeia pesada apenas (HCAbs). Os anticorpos de domínio também incluem um domínio CH2 de uma IgG como a estrutura (cerne) na qual as alças de CDR são enxertadas. Eles também podem, em geral, ser definidos como um polipeptídeo ou proteína que compreende uma sequência de aminoácidos que é constituída por quatro regiões estruturais interrompidas por três regiões determinantes de complementaridade. Isto é representado como FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Os sdAbs podem ser produzidos em camelídeos, tais como lhamas, mas também podem ser gerados sinteticamente usando métodos bem conhecidos na técnica. A numeração dos resíduos de aminoácidos de um sdAb ou polipeptídeo está de acordo com a numeração geral para domínios VH fornecida por Kabat *et al.* ("Sequence of Proteins of Immunological Interest", US Public Health Services, NIH

Bethesda, MD, Publicação N° 91, o qual é aqui incorporado por referência). De acordo com esta numeração, a FR1 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 1-30, a CDR1 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 31-36, a FR2 de um sdAb compreende os aminoácidos nas posições 36-49, a CDR2 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 50-65, a FR3 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 66-94, a CDR3 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 95-102 e a FR4 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 103-113. Os anticorpos de domínio também são descritos nos documentos WO2004041862 e WO2016065323, cada um dos quais é aqui incorporado por referência. Os anticorpos do domínio podem ser uma porção de alvejamento, conforme descrito aqui.

[0099] As moléculas de anticorpo podem ser monoespecíficas (por exemplo, monovalentes ou bivalentes), biespecíficas (por exemplo, bivalentes, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes ou hexavalentes), triespecíficas (por exemplo, trivalentes, tetravalentes, pentavalentes, hexavalentes) ou com ordens mais elevadas de especificidade (por exemplo, tetraespecíficas) e/ou ordens de valência mais elevadas do que a hexavalência. Uma molécula de anticorpo pode compreender um fragmento funcional de uma

região variável de cadeia leve e um fragmento funcional de uma região variável de cadeia pesada, ou as cadeias pesada e leve podem ser fundidas em um único polipeptídeo.

[0100] Exemplos de formatos para compostos terapêuticos multiespecíficos, por exemplo, moléculas de anticorpos biespecíficas, são mostrados nos exemplos não limitativos a seguir. Embora ilustradas com moléculas de anticorpo, elas podem ser usadas como plataformas para moléculas terapêuticas que incluem outras porções que não é com base em anticorpos como porções de ligação ou efetoras específicas. Em algumas modalidades, estes exemplos não limitativos são com base em formatos Fc simétricos ou assimétricos.

[0101] Por exemplo, as figuras ilustram uma abordagem simétrica não limitativa e variada do homodímero. Em algumas modalidades, a interface de dimerização está centralizada em torno dos domínios CH2-CH3 de IgG1 humana, os quais dimerizam através de uma interface de contato que abrange CH2/CH2 e CH3/CH3. Os anticorpos biespecíficos resultantes mostrados têm uma valência total compreendida de quatro unidades de ligação, com duas unidades de ligação idênticas no N-terminal de cada lado do dímero e duas unidades idênticas no C-terminal de cada lado do dímero. Em cada caso, as unidades de ligação no N-terminal do homodímero são diferentes

daquelas no C-terminal do homodímero. O uso deste tipo de bivalência para um receptor inibidor de células T em qualquer um dos terminais da molécula e a bivalência para um antígeno de união tecidual podem ser obtido em cada extremidade da molécula.

[0102] Por exemplo, na FIG. 3, é ilustrada uma modalidade não limitativa. O N-terminal do homodímero contém dois domínios Fab idênticos compreendidos de duas cadeias leves idênticas, os quais são polipeptídeos separados, em interface com os domínios VH-CH1 N-terminais de cada cadeia pesada por meio da interação VH/VL e interação Ccapa ou Clambda com CH1. A ligação de dissulfureto nativa entre Ccapa ou Clambda com CH1 está presente, constituindo uma âncora covalente entre as cadeias leve e pesada. No C-terminal desta concepção, há duas unidades scFv idênticas, nas quais (neste exemplo) o C-terminal do domínio CH3 de Fc é seguido por um ligante hidrofílico flexível tipicamente compreendido (porém sem limitações) de resíduos de serina, glicina, alanina e/ou treonina, os quais são seguidos pelo domínio VH de cada unidade scFv, o qual é seguido por um ligante rico em glicina/serina, seguido por um domínio VL. Estes domínios VH e VL em tandem se associam para formar um fragmento variável com uma única cadeia (scFv) preso ao C-terminal do Fc. Há duas unidades no C-terminal desta molécula em virtude da

natureza homodimérica centralizada no Fc. A ordem de domínio dos scFvs pode ser configurada para ser do N- para o C-terminal como VH-Ligante-VL ou VL-Ligante-VH.

[0103] Um exemplo não limitativo de uma molécula que tem diferentes regiões de ligação nas diferentes extremidades é onde uma extremidade é um agonista de PD-1 e o anticorpo que confere especificidade ao alvo é um anticorpo anti-MAdCAM-1. Isto pode ser ilustrado conforme mostrado, por exemplo, na Figura 3 A, a qual ilustra as moléculas em diferentes orientações.

[0104] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-MAdCAM é um anticorpo bloqueador ou não bloqueador, conforme descrito em outra parte aqui. Sem estar preso a nenhuma teoria, foi mostrado que a MAdCAM interage com a "cabeça" da integrina $\alpha 4\beta 7$ expressa em linfócitos por meio de vários resíduos em seus dois domínios da superfamília I de Ig e a base estrutural de nível atômico para esta interação foi descrita (Viney J.L. *et al.* *J Immunol.* 157, 2488-2497; Yu Y *et al.* (2013). *J Biol Chem.* 288, 6284-6294; Yu Y. *et al.* (2012). *J Cell Biol.* 196, 131-146, cada um dos quais incorporado por referência na íntegra). Foi mostrado em grandes detalhes estruturais, mecanicistas e funcionais em sistemas moleculares tanto de seres humanos (Chen J. *et al.* (2003). *Nat Struct Biol.* 10, 995-1001; de Chateau M. *et al.*

(2001). *Biochemistry*. 40, 13972-13979) quanto camundongos (Day E.S. et al. (2002). *Cell Commun Adhes*. 9, 205-219; Hoshino H. et al. (2011). *J Histochem Cytochem*. 59, 572-583) que qualquer interação da MAdCAM com $\alpha 4\beta 7$ depende de três sítios de ligação presentes no domínio de tipo I da subunidade 7 de beta integrina e que estes sítios de ligação de metal podem se coordenar com Ca_2+ , Mn_2+ e Mg_2+ . Usando ensaios de adesão celular, citometria de fluxo e/ou ensaios de câmara de fluxo na presença de altos níveis de Ca_2+ com ou sem Mg_2+ ou Mn_2+ , foi mostrado que a interação MAdCAM/oc4p7 é de menor afinidade funcional e permite a adesão contínua de linfócitos, enquanto que em um baixo nível de Ca_2+ , mas um nível maior de Mg_2+ ou Mn_2+ , o qual ativa a integrina, a interação MAdCAM/oc4p7 é de maior afinidade funcional e media a adesão firme de linfócitos (Chen J. et al. (2003). *Nat Struct Biol*. 10, 995-1001). Vários grupos mostraram que diversos ensaios de adesão/interação com base em células, membrana celular e/ou proteína celular podem ser usados, com FACS, contagens com base em câmaras de fluxo celular ou leituras com base em IHC para monitorar o impacto de anticorpos anti-MAdCAM ou anti-oc4p7 após interação de MAdCAM com $\alpha 4\beta 7$, permitindo identificar anticorpos bloqueadores ou não bloqueadores (Nakache, M. et al. (1989). *Nature*. 337, 179-181; Streeter, P.R. et al. (1988) *Nature*.

331. 41-46; Yang Y. et al. (1995). *Scand J. Immunol.* 42. 235-247; Leung E. et al. (2004). *Cell Immunol Biol.* 82. 400-409; Pullen N. et al. (2009). *B. J. Pharmacol.* 157. 281-293; Soler D. et al. (2009). *J. Pharmacol Exp Ther.* 330. 864-875; Qi J. et al. (2012). *J. Biol Chem.* 287. 15749-15759).

[0105] Isto foi exemplificado no caso do sistema de camundongo com a identificação de anticorpos anti-MAdCAM de camundongo, tais como MECA-89 (não bloqueador) e MECA-367 (bloqueador) Nakache, M. et al. (1989). *Nature* 337, 179-181; Streeter, P.R. et al. (1988). *Nature* 331. 41-46; Yang Y. et al. (1995). *Scand J. Immunol.* 42. 235-247). Em um sistema humano, foram identificados anticorpos que bloqueiam a interação de MAdCAM humana com $\alpha 4\beta 7$ humana, tal como o anticorpo anti-MAdCAM humana PF-00547659 (Pullen N. et al. (2009). *B. J. Pharmacol.* 157. 281-293) e o anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ humana vedolizumabe (Soler D. et al. (2009). *J Pharmacol Exp Ther.* 330. 864-875), bem como anticorpos que não bloqueiam a interação, tais como o clone anti-MAdCAM humana 17F5 (Soler D. et al. (2009). *J. Pharmacol Exp Ther.* 330. 864-875) e o clone anti- $\alpha 4\beta 7$ humana J19 (Qi J. et al. (2012). *J. Biol Chem.* 287. 15749-15759). Assim, o anticorpo pode ser bloqueador ou não com base no efeito desejado. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo MAdCAM não

bloqueador. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo MAdCAM bloqueador. Um exemplo não limitativo para demonstrar se um anticorpo é bloqueador ou não pode ser encontrado no Exemplo 6, porém, qualquer método pode ser usado. Cada uma das menções descritas aqui é incorporada por referência na íntegra. Em algumas modalidades, o agonista de PD-1 é substituído por uma muteína de IL-2 tal como, porém sem limitações, aquelas descritas aqui.

[0106] Em outro exemplo, e conforme representado na Figura 4, o N-terminal do homodímero contém dois domínios Fab idênticos compreendidos de duas cadeias leves idênticas, as quais são polipeptídeos separados, em interface com os domínios VH-CH1 N-terminais de cada cadeia pesada por meio da interação VH/VL e interação Ccapa ou Clambda com CH1. A ligação de dissulfureto nativa entre Ccapa ou Clambda com CH1 está presente, constituindo uma âncora covalente entre as cadeias leve e pesada. No C-terminal desta concepção, há duas unidades VH idênticas (embora porções que não é com base em anticorpos também possam ser substituídas aqui ou em qualquer um dos quatro pontos terminais de ligação/fusão) onde (neste exemplo) o C-terminal do domínio CH3 de Fc é seguido por um ligante hidrofílico flexível tipicamente compreendido de (porém sem limitações) resíduos de serina, glicina, alanina e/ou treonina, o qual é seguido por um

domínio VH com base na família de linhagem germinativa VH3 independente e solúvel. Há duas unidades no C-terminal desta molécula em virtude da natureza homodimérica centralizada na Fc.

[0107] Em outro exemplo não limitativo, conforme representado na FIG. 5, o N-terminal do homodímero contém dois domínios Fab idênticos compreendidos de duas cadeias leves idênticas as quais, diferentemente da Figura 3 e Figura 4, estão fisicamente ligadas à cadeia pesada no N-terminal por meio de um ligante entre o C-terminal de Ccapa ou Clambda e o N-terminal da VH. O ligante pode ter 36-80 aminoácidos de comprimento e compreender resíduos de serina, glicina, alanina e treonina. As cadeias leves N-terminais fisicamente conectadas fazem interface com os domínios VH-CH1 N-terminais de cada cadeia pesada via interação VH/VL e interação Ccapa ou Clambda com CH1. A ligação de dissulfureto nativa entre Ccapa ou Clambda com CH1 está presente, conferindo estabilidade adicional entre as cadeias leve e pesada. No C-terminal desta concepção há duas unidades Fab idênticas, nas quais (neste exemplo) o C-terminal do domínio CH3 da Fc é seguido por um ligante hidrofílico flexível tipicamente compreendido de (porém sem limitações) resíduos de serina, glicina, alanina e/ou treonina, os quais são seguidos por um domínio CH1, seguido por um domínio VH no C-

terminal. A cadeia leve que é concebida para emparelhar com os domínios CH1/VH do C-terminal é expressa como um polipeptídeo separado, diferentemente da cadeia leve do N-terminal que é conjugada aos domínios VH/CH1 do N-terminal, conforme descrito. As cadeias leves do C-terminal formam uma interface entre VH/VL e Ccapa ou Clambda com CH1. A ligação de dissulfureto nativa ancora esta cadeia leve à cadeia pesada. Novamente, qualquer uma das porções de anticorpo em qualquer um dos quatro pontos de ligação/fusão pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0108] Os anticorpos biespecíficos também podem ser assimétricos, conforme mostrado nos exemplos não limitativos a seguir. Um exemplo não limitativo também é representado na Figura 6, Figura 7 e Figura 8, as quais ilustram uma abordagem assimétrica/heterodímero. Novamente, em qualquer um destes formatos, qualquer uma das porções de anticorpo em qualquer um dos quatro pontos de ligação/fusão pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo. Em algumas modalidades, a interface de dimerização está centralizada em torno dos domínios CH2-CH3 de IgG1 humana, os quais dimerizam

por meio de uma interface de contato que abrange CH2/CH2 e CH3/CH3. No entanto, para alcançar heterodimerização em vez de homodimerização de cada cadeia pesada, são introduzidas mutações em cada domínio CH3. As mutações de heterodimerização incluem a mutação T366W (Kabat) em um domínio CH3 e as mutações T366S, L368A e Y407V (Kabat) no outro domínio CH3. A interface de heterodimerização pode ser adicionalmente estabilizada com ligações de dissulfureto de novo por meio de mutação de resíduos nativos em resíduos de cisteína, tais como S354 e Y349, em lados opostos da interface CH3/CH3. Os anticorpos biespecíficos resultantes mostrados têm uma valência total compreendida de quatro unidades de ligação. Com esta abordagem, a molécula geral pode ser concebida para ter biespecificidade em apenas um terminal e monoespecificidade no outro terminal (triespecificidade geral) ou biespecificidade em qualquer terminal com uma especificidade molecular geral de 2 ou 4. Nos exemplos ilustrativos abaixo, o C-terminal compreende dois domínios de ligação idênticos os quais poderiam, por exemplo, conferir monoespecificidade bivalente para um alvo de união tecidual. No N-terminal de todos os três exemplos ilustrativos, ambos os domínios de ligação compreendem diferentes elementos/paratopos de reconhecimento e os quais poderiam alcançar o reconhecimento de dois epítomos

diferentes no mesmo alvo da porção efetora, ou poderiam reconhecer, por exemplo, um receptor inibidor de células T e CD3. Em algumas modalidades, as porções de ligação ao N-terminal podem ser substituídas por outros formatos de polipeptídeo único, tais como configurações de anticorpo de domínio scFv, Fab com uma única cadeia, scFv em tandem, VH ou VHH, por exemplo. Outros tipos de elemento de reconhecimento também podem ser usados, tais como peptídeos lineares ou cíclicos.

[0109] Um exemplo de uma molécula assimétrica é representado na Figura 6. Em referência à Figura 6, o N-terminal da molécula é compreendido de uma primeira cadeia leve emparelhada com uma primeira cadeia pesada via interações VH/VL e Ccapa ou Clambda/CH1 e um elemento de união covalente compreendido da ligação de dissulfureto nativa da cadeia pesada/cadeia leve. No lado oposto desta molécula heterodimérica, no N-terminal há uma segunda cadeia leve e uma segunda cadeia pesada as quais estão fisicamente ligadas através de um ligante entre o C-terminal de Ccapa ou Clambda e o N-terminal da VH. O ligante pode ter 36-80 aminoácidos de comprimento e compreender resíduos de serina, glicina, alanina e treonina. As cadeias leves N-terminais fisicamente conjugadas fazem interface com os domínios VH-CH1 N-terminais de cada cadeia pesada através da interação

VH/VL e interação Ccapa ou Clambda com CH1. A ligação de dissulfureto nativa entre Ccapa ou Clambda com CH1 está presente, conferindo estabilidade adicional entre as cadeias leve e pesada. No C-terminal da molécula, há dois domínios idênticos da família da linhagem germinativa VH3-VH3 solúveis unidos por meio de um ligante no N-terminal de glicina/serina/alanina/treonina ao C-terminal do domínio CH3 da cadeia pesada 1 e da cadeia pesada 2.

[0110] Em algumas modalidades, uma molécula assimétrica pode ser ilustrada conforme representado na Figura 7. Por exemplo, o N-terminal da molécula é compreendido de dois domínios VH diferentes solúveis com base na linhagem germinativa VH3 ligados à região de dobradiça de IgG1 humana por meio de um ligante com base em glicina/serina/alanina/treonina. O domínio VH conectado à primeira cadeia pesada é diferente do domínio VH conectado à segunda cadeia pesada. No C-terminal de cada cadeia pesada, há um domínio VH solúvel adicional com base na linhagem germinativa VH3 o qual é idêntico em cada uma das duas cadeias pesadas. A cadeia pesada heterodimeriza através dos botões (*knobs*) descritos anteriormente em mutações nos furos (*holes*) presentes na interface CH3 do módulo Fc.

[0111] Em algumas modalidades, uma molécula assimétrica pode ser conforme ilustrado na Figura 8. Este

exemplo é similar à molécula mostrada na Figura 7, exceto que as duas unidades Fab do N-terminal são configuradas de maneira que a cadeia leve 1 e a cadeia leve 2 estejam fisicamente ligadas à cadeia pesada 1 e à cadeia pesada 2 por meio de um ligante entre o C-terminal de Ccapa ou Clambda e o N-terminal de cada respectiva VH. O ligante pode, em cada caso, ter 36-80 aminoácidos de comprimento e compreender resíduos de serina, glicina, alanina e treonina. As cadeias leves N-terminais fisicamente conectadas fazem interface com os domínios VH-CH1 N-terminais de cada cadeia pesada via interação VH/VL e interação Ccapa ou Clambda com CH1. A ligação de dissulfureto nativa entre Ccapa ou Clambda com CH1 está presente, conferindo estabilidade adicional entre as cadeias leve e pesada.

[0112] Moléculas biespecíficas também podem ter um formato misto. Isto é ilustrado, por exemplo, na FIG. 9, FIG. 10 e FIG. 11.

[0113] Por exemplo, conforme ilustrado na FIG. 9, é mostrada uma abordagem com base no homodímero de Fc (vide FIGS. 3, 4 e 5) combinado com a seleção de formato de porção da FIG. 7, em que a valência molecular total é quatro, porém, a especificidade está restrita a duas especificidades. O N-terminal é compreendido de dois domínios VH idênticos solúveis da linhagem germinativa VH3 e o C-terminal é

compreendido de dois domínios VH idênticos solúveis de linhagem germinativa VH3 com especificidade diferente dos domínios N-terminais. Portanto, cada especificidade tem uma valência de dois. Novamente, neste formato, qualquer uma das porções de anticorpo em qualquer um dos quatro pontos de ligação/fusão pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0114] A FIG. 10 ilustra outro exemplo. Neste exemplo, a molécula é compreendida de quatro domínios VH solúveis com base na linhagem germinativa VH3. Os dois primeiros domínios têm a mesma especificidade (por exemplo, um receptor inibidor), o terceiro domínio do N-terminal pode ter especificidade por um antígeno tecidual e o quarto domínio do N-terminal pode ter especificidade pela albumina sérica humana (HSA), deste modo, assegurando a meia-vida prolongada da molécula na ausência de um domínio Fc de Ig. Há três ligantes ricos em glicina, serina, alanina e/ou treonina entre os domínios 1 e 2, domínios 2 e 3 e domínios 3 e 4. Este formato pode ser configurado até com tetraespecificidade, porém, monovalente em cada caso ou ter biespecificidade com bivalência em cada caso. A ordem dos domínios pode ser alterada. Novamente, neste formato,

qualquer uma das porções de anticorpo pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0115] A FIG. 11 ilustra ainda outra abordagem. Este exemplo é similar às FIGS. 3 e 4, na medida em que é o homodímero de Fc com base em duas unidades Fab idênticas (monoespecificidade bivalente) no N-terminal da molécula. Este exemplo difere pelo fato de que o C-terminal de cada cadeia pesada é ligado com um scFv em tandem. Assim, em cada caso, o C-terminal do domínio CH3 da Fc é ligado por meio de um ligante com base em glicina/serina/alanina/treonina ao N-terminal de um primeiro domínio VH, o qual é ligado via o C-terminal através de um ligante rico em glicina/serina de 12-15 aminoácidos ao N-terminal de um primeiro domínio VL, o qual é ligado através de um ligante com base em glicina/serina/alanina/treonina de 25-35 aminoácidos no C-terminal ao N-terminal de um segundo domínio VH, o qual é ligado através do C-terminal através de um ligante com base em glicina/serina de 12-15 aminoácidos ao N-terminal de um segundo domínio VL. Nesta molécula com base em homodímero de Fc, portanto, há dois scFvs em tandem idênticos no C-terminal da molécula, conferindo tetravalência para um antígeno tecidual único, por exemplo,

ou bivalência para duas moléculas diferentes. Este formato também poderia ser adaptado com um núcleo de Fc heterodimérico que permite dois scFvs em tandem diferentes no C-terminal da Fc, conferindo tetraespecificidade monovalente no C-terminal, ao mesmo tempo em que mantém monoespecificidade bivalente no N-terminal ou biespecificidade monovalente no N-terminal através do uso de configurações Fab com uma única cadeia, conforme nas Figuras 5, 6 e 7. Esta molécula pode, portanto, ser configurada para ter 2, 3, 4, 5 ou 6 especificidades. A ordem de domínio dos scFvs nas unidades de scFv em tandem pode ser configurada para ser, a partir do N- para o C-terminal, VH-Ligante-VL ou VL-Ligante-VH. Novamente, neste formato, qualquer uma das porções de anticorpo em qualquer um dos quatro pontos de ligação/fusão pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0116] Anticorpos biespecíficos também podem ser construídos para ter, por exemplo, PK sistêmica mais curta e, ao mesmo tempo, aumentar a penetração tecidual. Estes tipos de anticorpos podem ser com base, por exemplo, em um formato de anticorpo de domínio humano com base em VH3. Estes são ilustrados, por exemplo, nas Figuras 12, 13 e 14. As

Figuras 12, 13 e 14 compreendem, cada uma, um módulo de domínio VH solúvel com base na família da linhagem germinativa VH3. Cada domínio tem aproximadamente 12,5 kDa, permitindo um pequeno MW geral o qual, sem estar preso a nenhuma teoria específica, seria benéfico para a penetração tecidual aumentada. Nestes exemplos, nenhum dos domínios VH reconhece alvos que prolongam à meia-vida, tais como FcRn ou HSA. Conforme ilustrado na Figura 12, a molécula é compreendida de dois domínios VH unidos a um ligante com base em glicina/serina hidrofílico flexível entre o C-terminal do primeiro domínio e o N-terminal do segundo domínio. Neste exemplo, um domínio pode reconhecer um receptor coestimulador de células T e o segundo pode reconhecer um antígeno de união tecidual. Conforme ilustrado na Figura 13, a molécula é compreendida de três domínios VH com ligações N-C terminais de ligantes com base em glicina/serina hidrofílicos. A molécula pode ser configurada para ser triespecífica, porém, monovalente para cada alvo. Ela pode ser biespecífica com bivalência para um alvo e monovalência para outro. Conforme ilustrado na Figura 14, a molécula é compreendida de quatro domínios VH com ligantes ricos em glicina/serina N-C terminais entre cada domínio. Esta molécula pode ser configurada para ser específica, triespecífica ou biespecífica com diferentes

valências antigênicas em cada caso. Novamente, neste formato, qualquer uma das porções de anticorpo em pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0117] Outras modalidades de anticorpos biespecíficos são ilustradas nas FIGS. 15 e 16. As FIGS. 15 e 16 são compreendidas de um núcleo naturalmente heterodimerizante da interface CH1/Ccapa de IgG humana, incluindo a ligação de dissulfureto das cadeias pesada/leve C-terminal que ancora a interação de forma covalente. Este formato não contém uma Fc ou nenhuma porção para prolongar a meia-vida. Conforme ilustrado na FIG. 15, a molécula, no N-terminal do domínio capa constante, é ligada a um fragmento scFv que consiste em um domínio VH N-terminal ligado, em seu C-terminal, ao N-terminal de um domínio VL através de um ligante com base em Gly/Ser de 12 a 15 aminoácidos o qual está ligado, através de seu C-terminal, ao N-terminal do domínio capa constante através da sequência de dobradiça VL-Ccapa nativa. O domínio CH1 é ligado ao N-terminal com um fragmento scFv que consiste em um domínio VL N-terminal ligado ao seu C-terminal através de um ligante de Gly/Ser de 12-15 aminoácidos ao N-terminal de um domínio VH o qual está ligado, em seu C-terminal, ao N-terminal dos domínios CH1 através da sequência de dobradiça

VH-CH1 nativa. Conforme ilustrado na Figura 16, a molécula tem a mesma configuração N-terminal do Exemplo 13. No entanto, o C-terminal dos domínios capa e CH1 constantes é ligado a módulos scFv que podem estar na configuração VH-VL ou VL-VH e podem ser específicos para o mesmo antígeno ou específicos para dois antígenos diferentes. Os ligantes entre os domínios VH/VL podem ter 12-15 aminoácidos de comprimento e consistir em resíduos de Gly/Ser. As subunidades de ligação ao scFv podem ser substituídas por domínios VH solúveis ou elementos de reconhecimento peptídicos ou mesmo elementos scFv em tandem. Esta abordagem também pode ser configurada para usar domínios lambda variáveis e/ou lambda constantes. Novamente, neste formato, qualquer uma das porções de anticorpo em qualquer um dos pontos de ligação/fusão pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0118] A FIG. 17 ilustra outra modalidade. A Figura 17 representa um formato scFv em tandem que consiste em um primeiro domínio VL N-terminal ligado, em seu C-terminal, ao N-terminal de um primeiro domínio VH com um ligante rico em Gly/Ser de 12-15 aminoácidos seguido, no primeiro C-terminal VH, por um ligante com base em Gly/Ser/Ala/Thr de 25 a 30

aminoácidos no N-terminal de um segundo domínio VL. O segundo domínio VL está ligado, no C-terminal, ao N-terminal de um segundo domínio VH por um ligante de Gly/Ser de 12 a 15 aminoácidos. Cada scFv reconhece um antígeno alvo diferente, tal como uma molécula de célula T coestimuladora e um alvo de união tecidual. Novamente, neste formato, qualquer uma das porções de anticorpo pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0119] A FIG. 18 ilustra outra modalidade. A Figura 18 é uma fusão de $F(ab')_2/scFv$. Esta consiste em dois componentes Fab idênticos unidos através de duas ligações de dissulfureto na região de dobradiça de IgG1 humana nativa C-terminal do domínio CH1 de IgG humana. Os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana estão ausentes. No C-terminal das cadeias pesadas 1 e 2, há dois fragmentos scFv idênticos ligados através de um ligante rico em Gly/Ser/Ala/Thr ao C-terminal da região de dobradiça de huIgG1. Na configuração mostrada, a VH é N-terminal em cada unidade scFv e ligada através de um ligante rico em Gly/Ser de 12-15 aminoácidos ao N-terminal de um domínio VL. Uma configuração alternativa seria N-term-VL-Ligante-VH-C-term. Nesta concepção, a construção é biespecífica com bivalência para atingir o alvo. Novamente,

neste formato, qualquer uma das porções de anticorpo em qualquer um dos quatro pontos de ligação/fusão pode ser substituída por uma porção que não é com base em anticorpos, por exemplo, uma porção de ligação/modulação efetora que não compreende uma molécula de anticorpo.

[0120] Molécula de CD39, conforme este termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência de CD39 suficiente que, como parte de um composto terapêutico, fosfo-hidrolisa ATP em AMP. Em algumas modalidades, uma molécula de CD39 fosfo-hidroliza ATP em AMP equivalente a, ou pelo menos, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 95 % da taxa de uma CD39 de ocorrência natural, por exemplo, a CD39 da qual a molécula de CD39 foi derivada. Em algumas modalidades, uma molécula de CD39 tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com uma CD39 de ocorrência natural. Qualquer isoforma funcional pode ser usada (com CD39 ou outras proteínas discutidas aqui). Uma sequência de CD39 exemplificativa inclui o Número de Acesso Genbank # NP_001767.3 ou uma forma madura da seguinte sequência:

MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALLA VGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSH
 TSLYIIYKWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGP GISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPR
 SQHQETPVYLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDFQGARIITGQEEGAY
 GWITINYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNA

LQFRLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVNVSD
 LYKTPCTKRFEMTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQ
 GDFGAFSAFYFVMKFLNLTSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYC
 FSGTYILSLLLQGYHFTADSWEHIHFHFIGKIQGS DAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPL
 SHSTYVFLMVLFSLVLFSTVAIIGLLIFHKPSYFWKDMV (SEQ ID NO: 1).

[0121] Em algumas modalidades, uma molécula de CD39 compreende uma forma solúvel cataliticamente ativa de CD39 encontrada em circulação no soro humano ou de murino; vide, por exemplo, *Metabolism of Circulating ADP in the Bloodstream Is Mediated Via Integrated Actions of Soluble Adenylate Kinase-1 and NTPDase1/CD39 Activities*, Yegutkin *et al.*, *FASEB J.* setembro de 2012; 26(9): 3875-83. Um fragmento de CD39 recombinante solúvel também é descrito em *Inhibition of Platelet Function by Recombinant Soluble Ecto-ADPase/CD39*, Gayle *et al.*, *J Clin Invest.* 01 de maio de 1998; 101(9): 1851-1859.

[0122] Molécula de CD73, conforme o termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência de CD73 suficiente que, como parte de um composto terapêutico, desfosforila AMP extracelular em adenosina. Em algumas modalidades, uma molécula de CD73 desfosforila AMP extracelular em adenosina equivalente a, ou pelo menos, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 95 % da taxa de uma CD73 de ocorrência natural, por exemplo, a CD73 a partir da qual

a molécula de CD73 foi derivada. Em algumas modalidades, uma molécula de CD73 tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com uma CD73 de ocorrência natural. Exemplos de sequências de CD73 incluem GenBank AAH65937.1 5'-nucleotidase, ecto (CD73) [*Homo sapiens*] ou uma forma madura da seguinte sequência:

MCPRAARAPATLLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMG
GVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNH
EFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGIVGYT
SKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLTNLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGV
DVVVGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFD
ERGNVISSHGPNILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCR
FRECNMGNLICDAMINNNLRHADETFWNHVS MCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAA
VLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVDLSRKPGDRVVKL
DVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTY
ISKMKVIYPAVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ (SEQ ID NO: 2).

[0123] Em algumas modalidades, uma molécula de CD73 compreende uma forma solúvel de CD73 que pode ser eliminada da membrana das células endoteliais por meio de clivagem proteolítica ou hidrólise da âncora de GPI através de tensão de cisalhamento; vide, por exemplo, referência: Yegutkin G., Bodin P., Burnstock G. Effect of Shear Stress on the Release of Soluble Ecto-Enzymes ATPase and 5'-Nucleotidase Along

with Endogenous ATP from Vascular Endothelial Cells. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 921-6. Para função da CD73 vide Colgan *et al.*, Physiological Roles for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73), *Purinergic Signalling*, junho de 2006, 2: 351.

[0124] Ligante de molécula na superfície celular, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma molécula, tipicamente um polipeptídeo, que se liga, por exemplo, especificamente, a uma molécula na superfície celular em uma célula, por exemplo, uma célula imune imunossupressora, por exemplo, uma Treg. Em algumas modalidades, o ligante na superfície celular tem uma sequência suficiente de um ligante de ocorrência natural da molécula na superfície celular para que possa se ligar especificamente à molécula na superfície celular (um ligante de molécula na superfície celular). Em algumas modalidades, a ligação à superfície celular é uma molécula de anticorpo que se liga, por exemplo, se liga especificamente, à molécula na superfície celular.

[0125] Porção de alvejamento específica para doador, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma porção, por exemplo, uma molécula de anticorpo a qual, como um componente de um composto terapêutico, localiza o composto terapêutico preferencialmente em um tecido transplantado do doador em oposição ao tecido de um receptor. Como um componente de um composto terapêutico, a porção de

alvejamento específica para doador confere privilégio imune específico para uma localização a um tecido de transplante, por exemplo, um órgão, de um doador.

[0126] Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para doador que se liga ao produto, por exemplo, um produto polipeptídico, de um alelo presente em um *locus*, alelo o qual não está presente no *locus* no indivíduo (receptor). Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para doador se liga a um epítopo no produto, epítopo o qual não está presente no indivíduo (receptor).

[0127] Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para doador, como um componente de um composto terapêutico, se liga preferencialmente a um alvo ou antígeno do doador, por exemplo, tem uma afinidade de ligação pelo alvo do doador que é maior pelo antígeno ou tecido do doador, por exemplo, pelo menos 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 vezes maior do que sua afinidade pelo antígeno ou tecido do indivíduo. Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para doador tem uma afinidade de ligação por um produto de um alelo de um *locus* presente no tecido do doador (mas não presente no indivíduo) pelo menos 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 vezes maior do que sua afinidade pelo produto do alelo do

locus presente no indivíduo (alelo o qual não está presente no tecido do doador). A afinidade de um composto terapêutico do qual a porção específica para doador é um componente pode ser medida em uma suspensão celular, por exemplo, a afinidade por células suspensas com o alelo é comparada com sua afinidade por células suspensas que não possuem o alelo. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação por células do alelo do doador está abaixo de 10 nM. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação por células do alelo do doador está abaixo de 100 pM, 50 pM ou 10 pM.

[0128] Em algumas modalidades, a especificidade por um produto de um alelo do doador é suficiente para que, quando a porção de alvejamento específica para doador é acoplada a um efector de regulação negativa imune: i) o ataque imune do tecido transplantado, por exemplo, conforme medido pela resposta inflamatória histológica, infiltração de células T efectoras ou função do órgão, no ambiente clínico - por exemplo, creatinina para o rim, seja substancialmente reduzido, por exemplo, comparado com aquele que seria observado em um implante similar, porém, sem a porção de alvejamento específica para doador estar acoplada a um efector de regulação negativa imune; e/ou ii) a função imune no receptor, fora ou distante do tecido transplantado, seja substancialmente mantida. Em algumas modalidades, um ou mais

dos seguintes são observados: em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a contagem de linfócitos no sangue periférico não é substancialmente afetada, por exemplo, o nível de células T está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal, o nível de células B está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal e/ou o nível de granulócitos (PMNs) está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal ou o nível de monócitos está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal; em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a função proliferativa ex vivo de PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) contra antígenos relevantes para a doença é substancialmente normal ou está dentro de 70, 80 ou 90 % do normal; em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a incidência ou risco de infecções oportunistas e cânceres associados à imunossupressão não aumenta substancialmente acima do normal; ou em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a incidência ou risco de infecções oportunistas e cânceres associados à imunossupressão é substancialmente menor do que aquele que seria observado com o tratamento padrão ou com imunossupressão não alvejada. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento específica para doador compreende uma molécula de anticorpo, um polipeptídeo de ligação específica ao alvo ou uma molécula de ligação a ligante alvo.

[0129] Efetor, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma entidade, por exemplo, uma célula ou molécula, por exemplo, uma molécula solúvel ou na superfície celular, que media uma resposta imune.

[0130] Molécula de ligação a ligante efetora, conforme usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência suficiente de um contraligante de ocorrência natural de um efetor que pode se ligar ao efetor com especificidade suficiente para servir como molécula de ligação/modulação efetora. Em algumas modalidades, ela se liga ao efetor com pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 95 % da afinidade do contraligante de ocorrência natural. Em algumas modalidades, ela tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com um contraligante de ocorrência natural para o efetor.

[0131] Polipeptídeo efetor de ligação específica, conforme usado aqui, se refere a um polipeptídeo que pode se ligar com especificidade suficiente para servir como uma porção de ligação/modulação efetora. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de ligação específica compreende uma molécula efetora de ligação a ligante.

[0132] Risco elevado, conforme usado aqui, se refere ao risco de um transtorno em um indivíduo, em que o indivíduo

tem um ou mais antecedentes médicos do transtorno ou um sintoma do transtorno, um biomarcador associado ao transtorno ou um sintoma do transtorno ou um histórico familiar do transtorno ou sintoma do transtorno.

[0133] Molécula de anticorpo funcional para uma molécula inibidora ou efetora do ponto de verificação imune, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma molécula de anticorpo que, quando presente como a porção de ligação/modulação ICIM de um composto terapêutico multimerizado, pode se ligar e é agonista da molécula inibidora ou efetora do ponto de verificação imune. Em algumas modalidades, a molécula de anticorpo antimolécula inibidora ou efetora do ponto de verificação imune, quando de ligação como um monômero (ou ligação quando o composto terapêutico não é multimerizado) à molécula inibidora ou efetora do ponto de verificação imune, não antagoniza, ou antagoniza substancialmente, impede a ligação, ou impede substancialmente a ligação, de um contraligante endógeno da molécula inibidora do ponto de verificação imune à molécula inibidora do ponto de verificação imune. Em algumas modalidades, a molécula de anticorpo antimolécula efetora ou inibidora do ponto de verificação imune, quando de ligação como um monômero (ou ligação quando o composto terapêutico não é multimerizado) à molécula inibidora do ponto de

verificação imune, não é agonista, ou não é substancialmente agonista, da molécula efetora ou inibidora.

[0134] Porção de ligação/modulação ICIM, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma porção de ligação/modulação efetora que, como parte de um composto terapêutico, se liga e é agonista de uma molécula inibidora na superfície celular, por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune, por exemplo, PD-1, ou se liga ou modula a sinalização celular, por exemplo, se liga ao FCRL, por exemplo, FCRL1-6, ou se liga e antagoniza uma molécula que promove a função imune.

[0135] Porção de ligação/modulação IIC, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma porção de ligação/modulação efetora que, como parte de um composto terapêutico, se liga a uma célula imune imunossupressora. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação IIC aumenta o número ou a concentração de uma célula imune imunossupressora no sítio de ligação.

[0136] Porção de ligação/modulação ICSM, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma porção de ligação/modulação efetora que antagoniza um efeito estimulador imune de um par de ligação estimulador, por exemplo, coestimulador. Um par de ligação estimulador ou coestimulador, conforme o termo é usado aqui, compreende

dois membros: 1) uma molécula sobre a superfície de uma célula imune; e 2) o parceiro de ligação para esta molécula celular, o qual pode ser uma célula imune adicional ou uma célula não imune. Normalmente, quando de ligação de um membro ao outro, assumindo que outros requisitos sejam atendidos, o membro sobre a superfície da célula imune estimula a célula imune, por exemplo, uma molécula coestimuladora, e é promovida uma resposta imune. Em situações onde a molécula coestimuladora e a contraestrutura da molécula coestimuladora são ambas expressas nas células imunes, pode ocorrer a ativação bidirecional de ambas as células. Em uma modalidade, uma porção de ligação/modulação ICSM se liga e antagoniza o membro expresso por uma célula imune de um par de ligação. Por exemplo, ela se liga e antagoniza OX40. Em outra modalidade, uma porção de ligação/modulação ICSM se liga e antagoniza o membro do par de ligação que se liga ao membro expresso pela célula imune, por exemplo, se liga e antagoniza OX40L. Em ambos os casos, inibição da estimulação ou coestimulação de uma célula imune é alcançada. Em uma modalidade, a porção de ligação/modulação ICSM diminui o número ou atividade de uma célula imune imunoestimuladora no sítio de ligação.

[0137] Molécula de muteína de IL-2, conforme o termo é usado aqui, se refere a uma variante de IL2 que se liga

com alta afinidade à CD25 (cadeia alfa de IL-2R) e com baixa afinidade aos outros componentes de sinalização ao IL-2R, CD122 (IL-2R beta) e CD132 (IL-2R gama). Esta molécula de muteína de IL-2 ativa preferencialmente células Treg. Em modalidades, isoladamente ou como um componente de um composto terapêutico, uma muteína de IL-2 ativa as Tregs pelo menos 2, 5, 10 ou 100 vezes mais do que células T citotóxicas ou efetoras. Moléculas de muteína de IL-2 exemplificativas são descritas nos documentos WO2010085495, WO2016/164937, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428 A2, WO2016025385A1 e US20060269515. As muteínas descritas nestas referências, as quais incluem domínios adicionais, por exemplo, um domínio Fc ou outro domínio para extensão da meia-vida, podem ser usadas nos compostos terapêuticos e métodos descritos aqui sem estes domínios adicionais. Em outra modalidade, uma porção de ligação/modulação IIC compreende uma muteína de IL-2, ou um fragmento ativo da mesma acoplado, por exemplo, fundido, a outro polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo que estende a meia-vida *in vivo*, por exemplo, uma região constante de imunoglobulina ou um multímero ou dímero da mesma, por exemplo, AMG 592. Em uma modalidade, o composto terapêutico compreende a porção IL-2 de AMG 592. Em uma modalidade, o composto terapêutico compreende a porção de

IL-2, mas não a porção de imunoglobulina de AMG 592. Em algumas modalidades, a muteína não compreende uma região Fc. Para algumas muteínas de IL-2, as muteínas são concebidas para conter uma região Fc, uma vez que foi mostrado que esta região aumenta a meia-vida da muteína. Em algumas modalidades, a meia-vida prolongada não é necessária para os métodos descritos e incorporados aqui. Em algumas modalidades, a região Fc que é fundida com a muteína de IL-2 compreende uma mutação N297 tal como, porém sem limitações, N297A. Em algumas modalidades, a região Fc que é fundida com a muteína de IL-2 não compreende uma mutação N297 tal como, porém sem limitações, N297A.

[0138] Uma "molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune", conforme este termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune suficiente, por exemplo, no caso de uma molécula de PD-L1, uma sequência suficiente de PD-L1 que, quando presente como uma porção de ligação/modulação ICIM de um composto terapêutico multimerizado, pode se ligar e é agonista de sua molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata, por exemplo, novamente no caso de uma molécula de PD-L1, PD-1.

[0139] Em algumas modalidades, a molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune, por exemplo, uma molécula de PD-L1, quando de ligação como monômero (ou ligação quando o composto terapêutico não é multimerizado) ao seu ligante cognato, por exemplo, PD-1, não antagoniza, ou antagoniza substancialmente, ou impede a ligação, ou impede substancialmente a ligação, de um ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune endógeno à molécula inibidora do ponto de verificação imune. Por exemplo, no caso de uma molécula de PD-L1, a molécula de PD-L1 não antagoniza a ligação de PD-L1 endógeno à PD-1.

[0140] Em algumas modalidades, o ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune, quando se liga como monômero, à sua molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata não é agonista a ou é agonista a substancialmente a molécula inibidora do ponto de verificação imune. A título de exemplo, por exemplo, uma molécula de PD-L1 quando se liga à PD-1, não é agonista a ou é substancialmente agonista a PD-1.

[0141] Em algumas modalidades, uma molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com um

ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune que ocorre naturalmente.

[0142] Moléculas ligantes da molécula inibidora do ponto de verificação imune exemplificativos incluem: uma molécula de PD-L1, a qual se liga à molécula inibidora do ponto de verificação imune PD-1 e, em modalidades, tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com um PD-L1 de ocorrência natural, por exemplo, a molécula de PD-L1 que compreende a sequência de

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
EDKNIIQFVHGEEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY
GGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSG
KTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPN
ERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ
ID NO: 3) ou um fragmento ativo da mesma; em algumas modalidades, o fragmento ativo compreende os resíduos 19 a 290 da sequência de PD-L1; uma molécula de HLA-G, a qual se liga a qualquer uma das moléculas inibidoras de ponto de verificação imune KIR2DL4, LILRB1 e LILRB2 e, em modalidades, tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou sequência de identidade substancial, com uma HLA-G que ocorre naturalmente. Sequências de HLA-G exemplificativas incluem, por exemplo, uma forma madura

encontrada na sequência no GenBank P17693.1 RecName: Completo = antígeno de histocompatibilidade HLA classe I, cadeia alfa G; AltName: Completo = antígeno HLA G; AltName: Completo = antígeno MHC classe I G; Sinalizadores: Precursor, ou na sequência

MVVMAPRTLFLLLSGALTTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVR
 FDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHT
 LQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVA
 EQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAE
 IILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFOKWAAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLM
 LRWKQSSLPTIPIMGIVA (SEQ ID NO: 4).

[0143] Molécula contraligante da molécula inibidora, conforme este termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência contraligante da molécula inibidora suficiente de modo que, quando presente como a porção de ligação/modulação ICIM de um composto terapêutico multimerizado, pode se ligar e é agonista de uma molécula inibidora cognata. Em algumas modalidades, a molécula contraligante da molécula inibidora, quando de ligação como um monômero (ou ligação quando o composto terapêutico não é multimerizado) à molécula inibidora, não antagoniza, ou antagoniza substancialmente, impede a ligação, ou impede substancialmente a ligação, de um contraligante endógeno da molécula inibidora à molécula inibidora. Em algumas

modalidades, a molécula contraligante da molécula inibidora, quando de ligação como um monômero (ou ligação quando o composto terapêutico não é multimerizado) à molécula inibidora, não é agonista, ou não é substancialmente agonista, da molécula inibidora.

[0144] Identidade de sequência, identidade percentual e termos relacionados, conforme estes termos são usados aqui, se referem ao parentesco de duas sequências, por exemplo, duas sequências de ácidos nucleicos ou duas sequências de aminoácidos ou polipeptídeos. No contexto de uma sequência de aminoácidos, o termo "substancialmente idêntico" é usado aqui para se referir a um primeiro aminoácido que contém um número suficiente ou mínimo de resíduos de aminoácidos que são i) idênticos ou ii) substituições conservativas de resíduos de aminoácidos em uma segunda sequência de aminoácidos, de modo que as primeira e segunda sequências de aminoácidos possam ter um domínio estrutural em comum e/ou atividade funcional em comum. Por exemplo, sequências de aminoácidos que contêm um domínio estrutural em comum que têm pelo menos cerca de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade com uma sequência de referência, por exemplo, uma sequência fornecida aqui.

[0145] No contexto de uma sequência de nucleotídeos, o termo "substancialmente idêntico" é usado aqui para se referir a uma primeira sequência de ácidos nucleicos que contém um número suficiente ou mínimo de nucleotídeos que são idênticos aos nucleotídeos alinhados em uma segunda sequência de ácidos nucleicos, de modo que as primeira e segunda sequências de nucleotídeos codificam um polipeptídeo que tem atividade funcional em comum ou codificam um domínio polipeptídico estrutural em comum ou atividade polipeptídica funcional em comum. Por exemplo, sequências de nucleotídeos que têm pelo menos cerca de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade com uma sequência de referência, por exemplo, uma sequência fornecida aqui.

[0146] O termo "variante funcional" se refere a polipeptídeos que têm uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à sequência que ocorre naturalmente ou são codificados por uma sequência de nucleotídeos substancialmente idêntica e são capazes de ter uma ou mais atividades da sequência que ocorre naturalmente.

[0147] Os cálculos de homologia ou identidade de sequência entre sequências (os termos são usados aqui de forma alternada) são realizados da seguinte forma.

[0148] Para determinar a identidade percentual de duas sequências de aminoácidos, ou de duas sequências de ácidos nucleicos, as sequências são alinhadas para fins de comparação ideal (por exemplo, lacunas podem ser introduzidas em uma ou ambas de uma primeira ou segunda sequência de aminoácidos ou ácidos nucleicos para alinhamento ideal e sequências não homólogas podem ser desconsideradas para fins de comparação). Em uma modalidade preferida, o comprimento de uma sequência de referência alinhada para fins de comparação é de pelo menos 30 %, de preferência pelo menos 40 %, mais preferivelmente pelo menos 50 %, 60 % e, ainda mais preferivelmente, pelo menos 70 %, 80 %, 90 %, 100 % do comprimento da sequência de referência. Os resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos nas posições correspondentes de aminoácidos ou nas posições de nucleotídeos são, então, comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo que a posição correspondente na segunda sequência, então, as moléculas são idênticas nesta posição (conforme usado aqui, "identidade" de aminoácido ou ácido nucleico é equivalente à "homologia" de aminoácido ou ácido nucleico).

[0149] A porcentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas

compartilhadas pelas sequências, levando em consideração o número de lacunas e o comprimento de cada lacuna que precisam ser introduzidas para alinhamento ideal das duas sequências.

[0150] A comparação de sequências e a determinação da porcentagem de identidade entre duas sequências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático. Em uma modalidade preferida, a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos é determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48: 444-453) o qual foi incorporado ao programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso por lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso por comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Em ainda outra modalidade preferida, a porcentagem de identidade entre duas sequências de nucleotídeos é determinada usando o programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso por lacuna de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso por comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Um conjunto de parâmetros particularmente preferido (e que deve ser usado, a menos que especificado de outra forma) são uma matriz de pontuação Blossum 62 com uma penalidade por lacuna de 12, uma penalidade por extensão de lacuna de 4 e uma penalidade por lacuna de deslocamento de quadro de 5.

[0151] A identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos ou nucleotídeos pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller ((1989) *CABIOS*, 4: 11-17), o qual foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade por comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade por lacuna de 4.

[0152] As sequências de ácidos nucleicos e proteínas descritas aqui podem ser usadas como uma "sequência de consulta" para realizar uma pesquisa em bancos de dados públicos, por exemplo, para identificar outros membros da família ou sequências relacionadas. Estas pesquisas podem ser realizadas usando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10. As pesquisas por nucleotídeos no BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, pontuação = 100, comprimento de palavra = 12 para obter sequências de nucleotídeos homólogas, por exemplo, a qualquer sequência de ácidos nucleicos fornecida aqui. As pesquisas por proteínas no BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3, para obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteína fornecidas aqui. Para obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, o Gapped BLAST pode ser usado, conforme descrito em Altschul

et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Ao usar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Vide <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

[0153] Conforme usado aqui, o termo "hibridiza sob condições de baixo rigor, médio rigor, elevado rigor ou rigor muito elevado" descreve condições para hibridização e lavagem. Orientações para a realização de reações de hibridização podem ser encontradas em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6, o qual é incorporado por referência. Métodos aquosos e não aquosos são descritos nesta referência e podem ser usados. Condições específicas de hibridização citadas aqui são as seguintes: 1) condições de hibridização de baixo rigor em 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguido por duas lavagens em 0,2X SSC, SDS a 0,1 % pelo menos a 50 °C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada para 55 °C para condições de baixo rigor); 2) condições de hibridização de médio rigor em 6X SSC a cerca de 45 °C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, SDS a 0,1 % a 60 °C; 3) condições de hibridização de elevado rigor em 6X SSC a cerca de 45 °C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, SDS a 0,1 % a 65 °C; e, de preferência, 4) condições de hibridização de rigor muito elevado são fosfato de sódio

a 0,5M, SDS a 7 % a 65 °C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,2X SSC, SDS a 0,1 % a 65 °C. Condições de rigor muito elevado (4) são as condições preferidas e que devem ser usadas, a menos que especificado de outra forma.

[0154] Deve ser entendido que as moléculas e compostos das presentes modalidades podem ter substituições de aminoácidos conservativas ou não essenciais adicionais, as quais não têm um efeito substancial sobre suas funções.

[0155] O termo "aminoácido" se destina abranger todas as moléculas, naturais ou sintéticas, as quais incluem tanto uma funcionalidade amino quanto uma funcionalidade ácida, e capazes de serem incluídas em um polímero de aminoácidos que ocorre naturalmente. Exemplos de aminoácidos incluem aminoácidos que ocorrem naturalmente; análogos, derivados e congêneres dos mesmos; análogos de aminoácidos que têm cadeias laterais variantes; e todos os estereômeros de qualquer um dos itens anteriores. Conforme usado aqui, o termo "aminoácido" inclui os isômeros ópticos D ou L e peptidomiméticos.

[0156] Uma "substituição de aminoácidos conservativa" é aquela na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos que têm cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas

famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Molécula de CD39, uma molécula de CD73, um ligante da molécula na superfície celular, porção de alvejamento porção de alvejamento específica para doador, molécula efetora de ligação a ligante, porção de ligação/modulação ICIM, porção de ligação/modulação IIC, uma molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune, molécula contraligante de molécula inibidora, porção de ligação/modulação SM ou porção de ligação/modulação ICSM.

[0157] Porção de ligação/modulação SM, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma porção de ligação/modulação efetora que, como parte de um composto terapêutico, promove um microambiente local imunossupressor, por exemplo, ao fornecer, na proximidade do alvo, uma

substância que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação SM compreende, ou se liga a, uma molécula que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação SM que se liga e acumula uma substância solúvel, por exemplo, uma substância endógena ou exógena, que tem função imunossupressora. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação SM que liga e inibe, captura, degrada ou de outra forma neutraliza uma substância, por exemplo, uma substância solúvel, tipicamente uma substância solúvel e endógena, que promove ataque imune. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação SM que compreende uma substância imunossupressora, por exemplo, um fragmento de proteína conhecido por ser imunossupressor. A título de exemplo, uma porção de ligação de molécula efetora é uma que se liga, ou compreende, uma substância, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73, que empobrece um componente, que promove a função da célula efetora imune, por exemplo, ATP ou AMP.

[0158] Porção de alvejamento específica, conforme este termo é usado aqui, se refere à porção de alvejamento

específica para doador ou uma porção de alvejamento específica para um tecido.

[0159] Indivíduo, conforme este termo é usado aqui, se refere a um indivíduo mamífero, por exemplo, um ser humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero não humano, por exemplo, um cavalo, cachorro, gato, vaca, cabra ou porco.

[0160] Molécula de ligação a ligante alvo, conforme usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência suficiente de um contraligante de ocorrência natural de um ligante alvo que pode se ligar ao ligante alvo em um tecido alvo (por exemplo, tecido do doador ou tecido alvo do indivíduo) com especificidade suficiente para servir como uma porção de alvejamento específica. Em algumas modalidades, ela se liga ao tecido ou células alvo com pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 95 % da afinidade do contraligante de ocorrência natural. Em algumas modalidades, ela tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com um contraligante de ocorrência natural para o ligante alvo.

[0161] Localização alvo, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma localização que contém a entidade, por exemplo, epítopo, ligada por uma porção de alvejamento. Em

algumas modalidades, a localização alvo é a localização na qual o privilégio imune é estabelecido.

[0162] Porção de alvejamento específica para um tecido, conforme este termo é usado aqui, se refere a uma porção, por exemplo, uma molécula de anticorpo que, como componente de uma molécula terapêutica, localiza a molécula terapêutica preferencialmente em um tecido alvo em oposição a outro tecido de um indivíduo. Como um componente de um composto terapêutico, a porção de alvejamento específica para um tecido confere privilégio imune específico para uma localização a um tecido alvo, por exemplo, um órgão ou tecido que sofre ou corre risco de ataque autoimune. Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para um tecido se liga a um produto, por exemplo, um produto polipeptídico, o qual não está presente fora do tecido alvo ou está presente em níveis suficientemente baixos que, em concentrações terapêuticas da molécula terapêutica, níveis inaceitáveis de supressão imune estão ausentes ou substancialmente ausentes. Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para um tecido se liga a um epítopo, epítopo o qual não está presente fora, ou não está substancialmente presente fora, da localização alvo.

[0163] Em algumas modalidades, uma porção de alvejamento específica para um tecido, como componente de um

composto terapêutico, se liga preferencialmente a um tecido alvo ou antígeno no tecido alvo, por exemplo, tem uma afinidade de ligação pelo tecido ou antígeno alvo que é maior para o antígeno ou tecido alvo, por exemplo, pelo menos 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 vezes maior do que sua afinidade pelo tecido ou antígeno não alvo presente fora do tecido alvo. A afinidade de um composto terapêutico do qual a porção específica para um tecido é um componente pode ser medida em uma suspensão celular, por exemplo, a afinidade para células suspensas com o antígeno alvo é comparada com sua afinidade para células suspensas que não possuem o antígeno alvo. Em algumas modalidades, a afinidade de ligação para as células portadoras de antígeno alvo está abaixo de 10 nM.

[0164] Em algumas modalidades, a afinidade de ligação para células portadoras de antígeno alvo está abaixo de 100 pM, 50 pM ou 10 pM. Em algumas modalidades, a especificidade por um antígeno alvo é suficiente de modo que, quando a porção de alvejamento específica para um tecido é acoplada a um efector de regulação negativa imune: i) o ataque imune do tecido alvo, por exemplo, conforme medido pela resposta inflamatória histológica, infiltração de células T efectoras ou função de órgão, no ambiente clínico - por exemplo, creatinina para rim, é substancialmente reduzido, por

exemplo, comparado com aquele que seria observado em um implante similar, porém, sem a porção de alveamento específica para um tecido estar acoplada a um efector de regulação negativa imune; e/ou ii) a função imune no receptor, fora ou distante do tecido alvo, é substancialmente mantida.

[0165] Em algumas modalidades, um ou mais dos seguintes são observados: em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a contagem de linfócitos no sangue periférico não é substancialmente afetada, por exemplo, o nível de células T está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal, o nível de células B está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal e/ou o nível de granulócitos (PMNs) está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal ou o nível de monócitos está dentro de 25, 50, 75, 85, 90 ou 95 % do normal; em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a função proliferativa ex vivo de PBMCs (células mononucleares de sangue periférico) contra antígenos relevantes para a doença é substancialmente normal ou está dentro de 70, 80 ou 90 % do normal; em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a incidência ou risco de infecções oportunistas e cânceres associados à imunossupressão não aumenta substancialmente acima do normal; ou em níveis terapêuticos do composto terapêutico, a incidência ou risco

de infecções oportunistas e cânceres associados à imunossupressão é substancialmente menor do que aquele que seria observado com o tratamento padrão ou com imunossupressão não alvejada. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento específica para doador compreende uma molécula de anticorpo. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento específica para doador compreende uma molécula de anticorpo, um polipeptídeo de ligação específica ao alvo ou uma molécula de ligação a ligante alvo. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento específica para um tecido se liga a um produto, ou uma localização em um produto, que está presente ou expresso exclusivamente, ou de modo substancialmente exclusivo, no tecido alvo.

PORÇÕES DE LIGAÇÃO/MODULAÇÃO ICIM: PORÇÕES DE LIGAÇÃO/MODULAÇÃO EFEITORAS QUE SE LIGAM A RECEPTORES INIBIDORES

[0166] Os métodos e compostos descritos aqui fornecem um composto terapêutico com uma porção de ligação/modulação efetora que compreende uma porção de ligação/modulação ICIM a qual se liga e ativa diretamente um receptor inibidor sobre a superfície de uma célula imune, por exemplo, para reduzir ou eliminar, ou eliminar substancialmente, a capacidade da célula imune de mediar o ataque imune. O acoplamento da porção de ligação/modulação ICIM a uma entidade alvo promove

a regulação negativa local ou específica para uma localização da resposta da célula imune, por exemplo, confinada substancialmente a localizações que têm sítios de ligação para a porção de alvejamento. Assim, a função imune sistêmica normal é substancialmente mantida. Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação ICIM compreende uma molécula contraligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune, por exemplo, um ligante natural ou fragmento de um ligante natural (por exemplo, PD-L1 ou HLA-G) da molécula inibidora do ponto de verificação imune. Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação ICIM compreende uma molécula de anticorpo funcional, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional que compreende um domínio de ligação ao scFv, que ativa a molécula inibidora do ponto de verificação imune.

[0167] Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação ICIM que compreende, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional ou molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune, se liga ao receptor inibidor, porém, não impede a ligação de um ligante natural do receptor inibidor ao receptor inibidor. Em modalidades, é usado um formato em que uma porção de alvejamento é acoplada, por exemplo, fundida, a uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende, por exemplo, um

domínio scFv, e configurada de modo que, quando de ligação de um receptor inibidor enquanto em solução (por exemplo, no sangue ou linfa) (e presumivelmente em um formato monomérico), a molécula terapêutica: i) não é agonista, ou não é substancialmente agonista (por exemplo, é agonista em menos de 30, 20, 15, 10 ou 5 % do nível observado com uma molécula totalmente agonista), do receptor inibidor na célula imune; e/ou ii) não antagoniza, ou antagoniza substancialmente (por exemplo, antagoniza em menos de 30, 20, 15, 10 ou 5 % do nível observado com uma molécula totalmente antagonista), o receptor inibidor na célula imune. Uma molécula candidata pode ser avaliada, quanto à sua capacidade de ser agonista ou não agonista, por sua capacidade de aumentar ou diminuir a resposta imune em um ensaio com base em células *in vitro*, em que o alvo não é expresso, por exemplo, usando um ensaio com base em MLR (reação com linfócitos mistos).

[0168] Em algumas modalidades, as porções de ligação/modulação ICIM candidatas podem reduzir, eliminar completa ou substancialmente a imunossupressão sistêmica e a ativação sistêmica imune. Em algumas modalidades, o domínio para alvejamento do composto terapêutico, quando ligado ao alvo, servirá para agrupar ou multimerizar o composto terapêutico sobre a superfície do tecido no qual proteção

imunológica é desejada. Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação ICIM, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende um domínio scFv, requer um estado agrupado ou multimérico para poder distribuir um sinal agonístico e imunossupressor, ou níveis substanciais de tal sinal, às células imunes locais. Este tipo de produto terapêutico pode, por exemplo, conferir uma supressão imune local, ao mesmo tempo em que deixa o sistema imune sistêmico inalterado ou substancialmente inalterado. Isto é, a supressão imune é localizada onde é necessária a supressão, em vez de ser sistêmica e não localizada em uma área ou tipo de tecido específico.

[0169] Em algumas modalidades, quando de ligação ao alvo, por exemplo, um órgão, tipo de tecido ou célula alvo, o composto terapêutico reveste o alvo, por exemplo, órgão, tecido ou tipo de célula alvo. Quando os linfócitos em circulação tentam se acoplar e destruir o alvo, este produto terapêutico fornecerá um sinal de 'desativação' apenas no local, ou em maior extensão, no local de acúmulo do composto terapêutico.

[0170] Um composto terapêutico candidato pode ser avaliado quanto à capacidade de se ligar, por exemplo, se ligar especificamente, ao seu alvo, por exemplo, através de ELISA, um ensaio com base em células ou ressonância

plasmônica em superfície. Esta propriedade deve, em geral, ser maximizada, uma vez que media a especificidade pelo local e a natureza local do privilégio imune. Um composto terapêutico candidato pode ser avaliado quanto à capacidade de regular negativamente uma célula imune quando ligado ao alvo, por exemplo, através de um ensaio de atividade com base em células. Esta propriedade deve, em geral, ser maximizada, uma vez que media a especificidade pelo local e a natureza local do privilégio imune. O nível de regulação negativa obtido por um composto terapêutico candidato na forma monomérica (ou não ligada) pode ser avaliado, por exemplo, através de um ensaio de atividade com base em células. Esta propriedade deve, em geral, deve ser minimizada, uma vez que pode mediar a regulação sistêmica do sistema imune. O nível de antagonismo de uma molécula inibidora na superfície celular, por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune, obtido por um composto terapêutico candidato na forma monomérica (ou não ligada) pode ser avaliado, por exemplo, através de um ensaio de atividade com base em células. Esta propriedade deve, em geral, ser minimizada, uma vez que pode mediar a ativação sistêmica indesejada do sistema imune. Em geral, as propriedades devem ser selecionadas e equilibradas para produzir um privilégio imune específico para uma localização

suficientemente robusto, sem níveis inaceitáveis de agonismo ou antagonismo não específico para uma localização da molécula inibidora do ponto de verificação imune.

MOLECULAS INIBIDORAS DO PONTO DE VERIFICAÇÃO IMUNE
EXEMPLIFICATIVAS

[0171] Moléculas inibidoras exemplificativas (por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune) (juntamente com seus contraligantes) podem ser encontradas na Tabela 1. Esta tabela lista moléculas às quais as porções de ligação ICIM exemplificativas podem se ligar.

Tabela 1: Moléculas inibidoras na superfície celular, por exemplo, moléculas inibidoras do ponto de verificação imune (coluna A), contraligantes (coluna B) e tipos de células afetados (coluna C).		
A	B	C
PD-1	PD-L1, PD-L2	Células T, Células B
Fosfatase alcalina		
B7-H3	Desconhecido	Células T
B7-H4	Neuropilina 1, neuropilina 2, Plexina 4A	Células T
BTLA	HVEM	Células T, Células B

CTLA-4	CD80, CD86	Células T
IDO1	Triptofano	Linfócitos
TDO2	Triptofano	Linfócitos
KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, KIR3DL2	HLA MHC classe I	Células NK
LAG3	HLA MHC classe II	Células T
TIM-3	Galectina-9	Células T
VISTA	Desconhecido	Células T, células mieloides
TIGIT	CD155	Células T
KIR2DL4	HLA-G	Células NK
LILRB1	HLA-G	Células T, células NK, células B, monócitos, células dendríticas
LILRB2	HLA-G	Monócitos, células dendríticas, neutrófilos, algumas células tumorais
NKG2A	glicoproteínas do MHC de classe I não clássicas	Células T, células NK
FCRL1-6	FCRL1 - 2 desconhecido FCRL4 = IgA	Células B

	FCRL5 = IgG FCRL6 = MHC Classe II	
	BUTIROFILINAS, por exemplo, BTN1A1, BTN2A2, BTNL2, BTNL1, BTNL8	Modulação de células imunes

A VIA DE PD-L1/PD-1

[0172] A proteína de morte celular programada 1 (frequentemente denominada como PD-1) é um receptor na superfície celular que pertence à superfamília de imunoglobulinas. A PD-1 é expressa em células T e outros tipos de células incluindo, porém sem limitações, células B, células mieloides, células dendríticas, monócitos, células T reguladoras, células iKT. A PD-1 se liga a dois ligantes, PD-L1 e PD-L2, e é uma molécula inibidora do ponto de verificação imune. O envolvimento com um ligante cognato, PD-L1 ou PD-L2, no contexto do acoplamento do MCH carregado de antígenos com o Receptor de Células T em uma célula T minimiza ou impede a ativação e a função das células T. O efeito inibidor da PD-1 pode incluir tanto a promoção de apoptose (morte celular programada) em células T específicas para antígeno nos linfonodos quanto a redução de apoptose em células T reguladoras (células T supressoras).

[0173] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que é agonista da inibição de PD-1. Uma porção de ligação/modulação ICIM pode incluir uma molécula contraligante da molécula inibidora, por exemplo, que compreende um fragmento de um ligante de PD-1 (por exemplo, um fragmento de PD-L1 ou PD-L2) ou outra porção, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional que compreende, por exemplo, um domínio scFv que se liga à PD-1.

[0174] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento que se liga preferencialmente a um antígeno do doador que não está presente, presente em níveis substancialmente mais baixos no indivíduo, por exemplo, um antígeno do doador da Tabela 2, e está localizado no tecido de enxerto do doador em um indivíduo. Em algumas modalidades, ele não se liga, ou não se liga substancialmente, a outros tecidos. Em algumas modalidades, um composto terapêutico pode incluir uma porção de alvejamento que é específica para HLA-A2 e se liga especificamente ao tecido de aloenxerto do doador, mas não se liga, ou não se liga substancialmente, aos tecidos do hospedeiro. Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM, por exemplo, uma molécula contraligante da molécula inibidora,

por exemplo, que compreende um fragmento de um ligante de PD-1 (por exemplo, um fragmento de PD-L1 ou PD-L2) ou outra porção, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional que compreende, por exemplo, um domínio scFv que se liga à PD-1, de modo que o composto terapêutico, por exemplo, quando ligado ao alvo, ative a PD-1. O composto terapêutico tem como alvo um aloenxerto e confere privilégio imunológico local ao aloenxerto.

[0175] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento que se liga preferencialmente a um antígeno da Tabela 3 e está localizado no alvo em um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que tem um transtorno autoimune, por exemplo, um transtorno autoimune da Tabela 3. Em algumas modalidades, ele não se liga, ou não se liga substancialmente, a outros tecidos. Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM, por exemplo, uma molécula contraligante da molécula inibidora, por exemplo, que compreende um fragmento de um ligante de PD-1 (por exemplo, um fragmento de PD-L1 ou PD-L2) ou outra porção, por exemplo, uma molécula de anticorpo funcional que compreende, por exemplo, um domínio scFv que se liga à PD-1, de modo que o composto terapêutico, por exemplo, quando ligado ao alvo, ative a PD-1. O composto terapêutico tem como alvo um tecido

do indivíduo para proteger contra ataque autoimune e confere privilégio imunológico local ao tecido.

[0176] PD-L1 e PD-L2, ou polipeptídeos derivados, podem constituir porções de ligação ICIM candidatas. No entanto, na forma de monômero, por exemplo, quando o composto terapêutico está em circulação no sangue ou na linfa, esta molécula pode ter um efeito indesejado de antagonizar a via de PD-L1/PD-1 e pode funcionar como agonista da via de PD-1 apenas quando agrupada ou multimerizada na superfície de um alvo, por exemplo, um órgão alvo. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula de anticorpo funcional, por exemplo, um domínio scFv, que é inerte, ou substancialmente inerte, à via PD-1 em uma forma solúvel, porém, é agonista e ativa um sinal inibidor quando multimerizado (pela porção de alvejamento) sobre a superfície de um tecido.

A VIA DE HLA-G: KIR2DL4/LILRB1/LILRB2

[0177] KIR2DL4, LILRB1 e LILRB2 são moléculas inibidoras encontradas em células T, células K e células mieloides. HLA-G é um contraligante para cada uma.

[0178] KIR2DL4 também é conhecida como CD158D, G9P, KIR-103AS, KIR103, KIR103AS, KIR, KIR-2DL4, receptor similar à imunoglobulina de células assassinas e tem dois domínios

de Ig e uma cauda citoplasmática longa 4. LILRB1 também é conhecida como LILRB1, CD85J, ILT-2, ILT2, LIR-1, LIR1, MIR-7, MIR7, PIR-B, PIRB, receptor B1 de tipo imunoglobulina leucocitária. LILRB2 também é conhecida como CD85D, ILT-4, LIR-2, LIR2, MIR-10, MIR10 e ILT4.

[0179] Um composto terapêutico que compreende uma molécula de HLA-G pode ser usado para fornecer sinais inibidores a uma célula imune que compreende qualquer uma de KIR2DL4, LILRB1 e LILRB2, por exemplo, com moléculas de composto terapêutico multimerizado que compreende uma molécula de HLA-G e, assim, conferir privilégio imunológico específico para uma localização.

[0180] Um composto terapêutico que compreende uma molécula de anticorpo agonista anti-KIR2DL4, anti-LILRB1 ou anti-LILRB2 pode ser usado para fornecer sinais inibidores a uma célula imune que compreende qualquer uma de KIR2DL4, LILRB1 e LILRB2.

[0181] HLA-G fornece um sinal inibidor apenas quando multimerizada, por exemplo, quando expressa sobre a superfície de uma célula ou quando conjugada à superfície de uma esfera. Em modalidades, é fornecido um composto terapêutico que compreende uma molécula de HLA-G, composto terapêutico o qual não multimeriza em solução (ou não multimeriza o suficiente para resultar em níveis

significativos de ação agonística da molécula inibidora). O uso de moléculas de HLA-G que minimizam a multimerização em solução minimizará a ação agonística sistêmica das células imunes e a supressão imune indesejada.

[0182] Embora não deseje estar preso pela teoria, acredita-se que a HLA-G não seja eficaz na regulação negativa, a menos que seja multimerizada, que a ligação do composto terapêutico ao alvo, através da porção de alvejamento, multimeriza a entidade de ligação ICIM e que a ligação multimerizada da entidade ICIM liga e agrupa moléculas inibidoras sobre a superfície de uma célula imune, deste modo, mediando um sinal negativo que regula negativamente a célula imune. Assim, células imunes infiltradas que tentam danificar o tecido alvo, incluindo células apresentadoras de antígeno e outras células mieloides, células NK e células T, são negativamente reguladas.

[0183] Embora as moléculas de HLA-G minimizem o antagonismo quando desejável na forma monomérica, a redundância de LILRB1 e LILRB2 minimizará o impacto sistêmico, mesmo com algum antagonismo monomérico.

[0184] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula de HLA-G, por exemplo, uma isoforma

livre de B2M (por exemplo, HLA-G5); vide Carosella et al., *Advances in Immunology*, 2015, 127: 33. Em um formato livre de B2M, a HLA-G se liga preferencialmente à LILRB2.

[0185] Sequências adequadas para a construção de moléculas de HLA-G incluem GenBank PI 7693.1 RecName: Completo = antígeno de histocompatibilidade HLA classe I, cadeia alfa G; AltName: Completo = antígeno HLA G; AltName: Completo = antígeno MHC classe I G; Sinalizadores: precursor ou

MVVMAPRTLFLLLSGALTTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVR
FDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHT
LQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVA
EQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAE
IILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFOKWAAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLM
LRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAAVVTGAAVA AVLWRKKSSD (SEQ ID NO: 5).

Uma molécula de HLA-G candidata pode ser testada quanto à adequabilidade para uso em métodos e compostos, por exemplo, por meio de métodos análogos àqueles descritos em "Synthetic HLA-G Proteins For Therapeutic Use in Transplantation", LeMaoult et al., 2013 *The FASEB Journal* 27: 3643.

[0186] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento que se liga preferencialmente a um antígeno do doador que não está presente, presente em níveis substancialmente mais baixos no

indivíduo, por exemplo, um antígeno do doador da Tabela 2, e está localizado no tecido de enxerto do doador em um indivíduo. Em algumas modalidades, ele não se liga, ou não se liga substancialmente, a outros tecidos. Em algumas modalidades, um composto terapêutico pode incluir uma porção de alvejamento que é específica para HLA-A2 e se liga especificamente a um aloenxerto do doador, mas não se liga a tecidos do hospedeiro e é combinada com uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula de HLA-G que se liga à KIR2DL4, LILRB1 ou LILRB2, de modo que o composto terapêutico, por exemplo, quando ligado ao alvo, ative a KIR2DL4, LILRB1 ou LILRB2. O composto terapêutico tem como alvo um aloenxerto e confere privilégio imunológico local ao aloenxerto.

[0187] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento que se liga preferencialmente a um antígeno tecido-específico, por exemplo, um antígeno da Tabela 3, e está localizado na localização alvo em um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que tem um transtorno autoimune, por exemplo, um transtorno autoimune da Tabela 3. Em algumas modalidades, ele não se liga, ou não se liga substancialmente, a outros tecidos. Em modalidades, o composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula de HLA-G

que se liga à KTR2DL4, LILRB1 ou LILRB2, de modo que o composto terapêutico, por exemplo, quando ligado ao alvo, ative a KIR2DL4, LILRB1 ou LILRB2. O composto terapêutico tem como alvo um tecido do indivíduo para proteger contra ataque autoimune e confere privilégio imunológico local ao tecido.

[0188] É provável que seja possível conceber uma proteína de fusão HLA-G-B2M estável e solúvel que também possa se ligar à LILRB1. Por exemplo, a estrutura cristalina de HLA-G foi determinada usando monômeros de HLA-G/B2M (Clements *et al.*, 2005 *PNAS* 102: 3360).

FAMÍLIA FCRL

[0189] FCRL1-6 geralmente inibe a ativação ou função de células B. Estas glicoproteínas transmembrana de tipo 1 são compostas por diferentes combinações de 5 tipos de domínios de tipo imunoglobulina, com cada proteína consistindo em 3 a 9 domínios e nenhum tipo de domínio individual conservado em todas as proteínas FCRL. Em geral, a expressão de FCRL é restrita aos linfócitos, com expressão primária em linfócitos B. Em geral, as FCRLs funcionam para reprimir a ativação de células B.

[0190] Uma porção de ligação/modulação ICIM pode compreender uma molécula de anticorpo anti-BCMA agonística. Em algumas modalidades, o composto terapêutico

compreende uma molécula de anticorpo anti-FCRL e uma molécula de anticorpo antirreceptor de células B (BCR). Embora não deseje estar preso à teoria, acredita-se que um composto terapêutico que compreende moléculas de anticorpo de ambas as especificidades manterá a FCRL em estreita proximidade com o BCR e inibirá a sinalização ao BCR.

BUTIRROFILINAS E MOLÉCULAS DE TIPO BUTIRROFILINAS

[0191] A porção de ligação/modulação efetora pode compreender um agonista ou antagonista de uma butirofilina. Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação efetora é uma molécula de BTN1A1, molécula de BTN2A2, molécula de BTL2 ou molécula de BTNL1 agonística ou funcional.

[0192] Uma molécula de BTNXi funcional (em que Xi = 1A1, 2A2, L2 ou L1), conforme o termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência de BTNXi suficiente que, como parte de um composto terapêutico, inibe células T. Em algumas modalidades, uma molécula de BTNXi tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com uma butirofilina que ocorre naturalmente ou uma molécula de tipo butirofilina.

[0193] Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação efetora é uma molécula de BTNL8 antagonista.

[0194] Uma molécula de BTNL8 antagonista, conforme o termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência suficiente de BTNL8 que, como parte de um composto terapêutico, inibe a ativação, proliferação ou secreção de citocinas por uma célula T em repouso. Em algumas modalidades, uma molécula de BTNL8 tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com uma butirofilina de ocorrência natural.

PORÇÕES DE LIGAÇÃO/MODULAÇÃO IIC: PORÇÕES DE
LIGAÇÃO/MODULAÇÃO EFETORAS QUE RECRUTAM CÉLULAS T
IMUNOSSUPRESSORAS

[0195] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação IIC, que se liga, ativa ou retém células imunossupressoras, por exemplo, células T imunossupressoras, na localização mediada pela porção de alvejamento, conferindo privilégio imunológico específico para uma localização. A porção de ligação/modulação IIC, por exemplo, uma porção de ligação/modulação IIC que compreende uma molécula de

anticorpo que compreende, por exemplo, um domínio de ligação a scFv, se liga a tipos de células imunossupressoras, por exemplo, Tregs, por exemplo, Tregs Foxp3+ CD25+. A tolerância específica para tipos de órgãos, tecidos ou células está associada a um aumento esmagador de Tregs proximais e infiltrantes no órgão alvo; nas modalidades, os métodos e compostos descritos aqui recriam sinteticamente e imitam este estado fisiológico. Após o acúmulo de Tregs, é criado um microambiente imunossupressor que serve para proteger o órgão de interesse contra o sistema imune.

LIGANTES DE GARP COMO UMA MOLÉCULA DE ALVEJAMENTO TREG E TGFB

[0196] GARP é um receptor de proteínas na membrana para TGF-beta latente expresso sobre a superfície de Tregs ativadas (Tran et al. 2009 *PNAS* 106: 13445 e Wang et al. 2009 *PNAS* 106: 13439). Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma entidade de ligação IIC que se liga tanto a células que expressam GARP como GARP solúvel, tais como Tregs humanas ativadas, e uma porção de alvejamento que tem como alvo o composto terapêutico no tecido alvo de interesse. As porções de ligação/modulação IIC que compreendem um ligante de GARP incluem, por exemplo, uma porção de ligação/modulação IIIC que compreende uma molécula de anticorpo anti-GARP, por exemplo, um domínio scFv anti-

GARP. Embora não deseje estar preso pela teoria, acredita-se que o composto terapêutico que compreende um ligante de GARP efetue o acúmulo de Tregs que expressam GARP na localização alvo da porção de alvejamento do composto terapêutico, por exemplo, um local de transplante ou lesão de órgão. Novamente, embora não deseje estar preso pela teoria, acredita-se que um composto terapêutico que compreende os efeitos do ligante de GARP também possa afetar o acúmulo de GARP solúvel no local da lesão do órgão, o que servirá para ligar e ativar TGF β 1, uma imunocitocina supressora, de maneira localizada (Fridrich *et al.* 2016 *PLoS One* 11: e0153290; doi: 10.1371/journal.pone.0153290 e Hahn *et al.* 2013 *Blood* 15: 1182). Assim, uma porção de ligação/modulação efetora que compreende um ligante de GARP pode atuar como uma porção de ligação/modulação IIC ou uma porção de ligação/modulação SM.

CTLA4 COMO UMA MOLÉCULA SILENCIADORA DE CÉLULAS T EFETORAS E DE ALVEJAMENTO TREGS

[0197] Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, compreende uma molécula de anticorpo, por exemplo, um domínio scFv, que se liga à CTLA4 expressa sobre a superfície de Tregs. A molécula terapêutica acumula ou retém Tregs CTLA4+ na localização alvo, com imunossupressão localizada como consequência.

[0198] Embora expressa mais altamente em Tregs, a CTLA4 também é expressa em células T ativadas. Um composto terapêutico que compreende uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, um anticorpo anti-CTLA4 ou um anticorpo anti-CTLA4 funcional, pode regular negativamente a célula T que expressa CTLA4. Assim, em um composto terapêutico que compreende uma porção de ligação/modulação efetora que se liga à CTLA4, a porção efetora também pode atuar como uma porção de ligação/modulação ICIM.

[0199] Em algumas modalidades, o ligante anti-CTLA4 não é antagonista ou é agonista quando em um formato monomérico e é agonista apenas quando agrupado ou multimerizado após ligação ao alvo.

[0200] Embora não deseje estar limitado pela teoria, acredita-se que a ligação do composto terapêutico ao alvo, através da porção de alvejamento, afeta a multimerização do composto terapêutico. No caso de células T de memória e células T ativadas, a CTLA4 ligada à porção de ligação/modulação efetora do composto terapêutico é agrupada e gera um sinal inibidor pela ativação de CTLA4 expressa pelas células T de memória e células T ativadas.

[0201] Em algumas modalidades, o ligante anti-CTLA4 não é antagonista ou é agonista quando em um formato

monomérico e é agonista apenas quando agrupado ou multimerizado após ligação ao alvo.

MOLECULAS DE MUTEÍNA DE IL-2: LIGANTES DE RECEPTORES DE IL2 QUE ATIVAM TREGS

[0202] Moléculas de muteína de IL-2 que expandem ou estimulam preferencialmente células Treg (em relação a células T citotóxicas) podem ser usadas como uma porção de ligação/modulação IIC.

[0203] Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação IIC compreende uma molécula de muteína de IL-2. Conforme usado aqui, o termo "molécula de muteína de IL-2" ou "muteína de IL-2" se refere a uma variante de IL-2 que ativa preferencialmente células Treg. Em algumas modalidades, isoladamente ou como componente de um composto terapêutico, uma molécula de muteína de IL-2 ativa Tregs pelo menos 2, 5, 10 ou 100 vezes mais que células T citotóxicas. Um ensaio adequado para avaliar a ativação preferencial de células Treg pode ser encontrado na Patente dos Estados Unidos Nº 9.580.486, por exemplo, nos Exemplos 2 e 3, ou no documento WO2016014428, por exemplo, nos Exemplos 3, 4 e 5, cada um dos quais é incorporado por referência na íntegra. A sequência da IL-2 madura é

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
 EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL
 NRWITFCQSIISTLT (sequência de IL-2 madura) (SEQ ID NO: 6)

[0204] A sequência da IL-2 imatura pode ser representada por

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRM
 LTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG
 SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 15).

[0205] Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação IIC compreende uma muteína de IL-2, ou fragmento ativo da mesma, acoplada, por exemplo, fundida, a outro polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo que estende a meia-vida *in vivo*, por exemplo, de uma região constante de imunoglobulina, ou um multímero ou dímero do mesmo.

[0206] Uma molécula de muteína de IL-2 pode ser preparada através de mutação de um ou mais dos resíduos de IL-2. Exemplos não limitativos de muteínas de IL-2 podem ser encontrados nos documentos WO2016/164937, US9580486, US7105653, US9616105, US 9428567, US2017/0051029, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428 A2, WO2016025385A1 e US20060269515, cada um dos quais é incorporado por referência na íntegra.

[0207] Em algumas modalidades, a alanina na posição 1 da sequência acima é excluída. Em algumas modalidades, a

molécula de muteína de IL-2 compreende uma serina substituída por cisteína na posição 125 da sequência madura de IL-2. Outras combinações de mutações e substituições para moléculas de muteína de IL-2 são descritas no documento US20060269515, o qual é incorporado por referência na íntegra. Em algumas modalidades, a cisteína na posição 125 também é substituída por uma valina ou alanina. Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma substituição V91K. Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma substituição N88D. Em algumas modalidades, a molécula de IL-2 muteína compreende uma substituição N88R. Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma substituição H16E, D84K, V91N, N88D, V91K ou V91R ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, estas moléculas de muteína de IL-2 também compreendem uma substituição na posição 125, conforme descrito aqui. Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo que consiste em: T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20H, D20I, D20Y, D20F, D20G, D20T M23R, R81A, R81G, R81 S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D,

N88E, N88I, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V N88W, V91D, V91E, V91G, V91 S, I92K, I92R, E95G e Q126. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos da molécula de muteína de IL-2 difere da sequência de aminoácidos apresentada na sequência de IL-2 madura por uma substituição C125A ou C125S e por uma substituição selecionada a partir de T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L16S D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88I, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R, E95G, Q126I, Q126L e Q126F. Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 difere da sequência de aminoácidos apresentada na sequência de IL-2 madura por uma substituição C125A ou C125S e por uma substituição selecionada a partir de D20H, D20I, D20Y, D20E, D20G, D20W, D84A, D84S, H16D, H16G, H16K, H16R, H16T, H16V, I92K, I92R, L12K, L19D, L19N, L19T, N88D, N88R, N88S, V91D, V91G, V91K e V91S. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende as mutações N88R e/ou D20H.

[0208] Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma mutação na sequência polipeptídica em uma posição selecionada a partir do grupo que consiste no

aminoácido 30, aminoácido 31, aminoácido 35, aminoácido 69 e aminoácido 74. Em algumas modalidades, a mutação na posição 30 é N30S. Em algumas modalidades, a mutação na posição 31 é Y31H. Em algumas modalidades, a mutação na posição 35 é K35R. Em algumas modalidades, a mutação na posição 69 é V69A. Em algumas modalidades, a mutação na posição 74 é Q74P. Em algumas modalidades, a muteína compreende uma mutação V69A, uma mutação Q74P, uma mutação N88D ou N88R e uma ou mais mutações L53I, L56I, L80I ou L118I. Em algumas modalidades, a muteína compreende uma mutação V69A, uma mutação Q74P, uma mutação N88D ou N88R e uma mutação L para I selecionada a partir do grupo que consiste em: uma mutação L53I, L56I, L80I e L118I. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação V69A, Q74P, N88D ou N88R e uma mutação L53I. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação V69A, Q74P, N88D ou N88R e uma mutação L56I. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação V69A, Q74P, N88D ou N88R e uma mutação L80I. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação V69A, Q74P, N88D ou N88R e uma mutação LI 181. Conforme apresentado aqui, as muteínas também podem compreender uma mutação C125A ou C125S.

[0209] Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma substituição selecionada a partir do

grupo que consiste em: N88R, N88I, N88G, D20H, D109C, Q126L, Q126F, D84G ou D84I em relação à sequência de IL-2 humana madura fornecida acima. Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 compreende uma substituição D109C e uma ou ambas de uma substituição N88R e uma substituição C125S. Em algumas modalidades, a cisteína que está na molécula de muteína de IL-2 na posição 109 está ligada a uma porção de polietileno glicol, em que a porção de polietileno glicol tem um peso molecular entre 5 e 40 kDa.

[0210] Em algumas modalidades, qualquer uma das substituições descritas aqui é combinada com uma substituição na posição 125. A substituição pode ser uma substituição C125S, C125A ou C125V.

[0211] Além das substituições ou mutações descritas aqui, em algumas modalidades, a muteína de IL-2 tem uma substituição/mutação em uma ou mais das posições 73, 76, 100 ou 138 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou em uma ou mais das posições 53, 56, 80 ou 118 que correspondem à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação nas posições 73 e 76; 73 e 100; 73 e 138; 76 e 100; 76 e 138; 100 e 138; 73, 76 e 100; 73, 76 e 138; 73, 100 e 138; 76, 100 e 138; ou em cada uma das posições 73, 76, 100 e 138 que correspondem à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação nas

posições 53 e 56; 53 e 80; 53 e 118; 56 e 80; 56 e 118; 80 e 118; 53, 56 e 80; 53, 56 e 118; 53, 80 e 118; 56, 80 e 118; ou em cada uma das posições 53, 56, 80 e 118 que correspondem à SEQ ID NO: 6. Uma vez que a IL-2 pode ser fundida ou unida a outras proteínas, conforme usado aqui, o termo que corresponde à referência a uma de SEQ ID NOs: 6 ou 15 se refere a como as sequências se alinham às configurações padrão do software de alinhamento, tal como aquele que pode ser usado a partir do site da NCBI. Em algumas modalidades, a mutação é leucina para isoleucina. Assim, a muteína de IL-2 pode compreender uma ou mais isoleucinas nas posições 73, 76, 100 ou 138 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou em uma ou mais das posições 53, 56, 80 ou 118 que correspondem à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína compreende uma mutação em L53 que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína compreende uma mutação em L56 que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína compreende uma mutação L80 que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína compreende uma mutação L118 que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a mutação é leucina para isoleucina. Em algumas modalidades, a muteína também compreende uma mutação nas posições 69, 74, 88, 125 ou qualquer combinação das mesmas nestas muteínas que correspondem à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a

mutação é uma mutação V69A. Em algumas modalidades, a mutação é uma mutação Q74P. Em algumas modalidades, a mutação é uma mutação N88D ou N88R. Em algumas modalidades, a mutação é uma mutação C125A ou C125S.

[0212] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação em uma ou mais das posições 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou uma ou mais das posições 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 e 125 que correspondem à SEQ ID NO: 6. As substituições podem ser usadas individualmente ou em combinação umas com as outras. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende substituições nas posições 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou em cada uma das posições 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145. Exemplos não limitativos de tais combinações incluem, porém sem limitações, uma mutação nas posições 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145; 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94 e 108; 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91 e 94; 49, 51, 55, 57, 68, 89 e 91; 49, 51, 55, 57, 68 e 89; 49, 51, 55, 57 e 68; 49, 51, 55 e 57; 49, 51 e 55; 49 e 51; 51, 55, 57 e 68; 49, 51, 55 e 57; 49, 51 e 55; 49 e 51; 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145; 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94 e 108; 51, 55, 57, 68, 89, 91 e 94; 51, 55, 57, 68, 89 e 91; 51, 55, 57, 68 e 89; 55, 57 e 68; 55 e 57; 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145; 55, 57, 68, 89, 91, 94 e 108; 55, 57, 68, 89, 91 e 94; 55, 57, 68, 89 e

91; 55, 57, 68 e 89; 55, 57 e 68; 55 e 57; 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145; 57, 68, 89, 91, 94 e 108; 57, 68, 89, 91 e 94; 57, 68, 89 e 91; 57, 68 e 89; 57 e 68; 68, 89, 91, 94, 108 e 145; 68, 89, 91, 94 e 108; 68, 89, 91 e 94; 68, 89 e 91; 68 e 89; 89, 91, 94, 108 e 145; 89, 91, 94 e 108; 89, 91 e 94; 89 e 91; 91, 94, 108 e 145; 91, 94 e 108; 91 e 94; ou 94 e 108. Cada mutação pode ser combinada entre si. As mesmas substituições podem ser feitas em SEQ ID NO: 6, porém, a numeração seria ajustada adequadamente, conforme é evidente a partir da presente invenção (20 menos do que a numeração para SEQ ID NO: 15 nas posições correspondentes em SEQ ID NO: 6).

[0213] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação em uma ou mais das posições 35, 36, 42, 104, 115 ou 146 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições equivalentes em SEQ ID NO: 6 (por exemplo, posições 15, 16, 22, 84, 95 ou 126). Estas mutações podem ser combinadas com outras mutações de leucina para isoleucina descritas aqui ou a mutação nas posições 73, 76, 100 ou 138 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou em uma ou mais das posições 53, 56, 80 ou 118 que correspondem à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a mutação é uma mutação E35Q, H36N, Q42E, D104N, E115Q ou Q146E ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, uma ou mais destas

substituições são de tipo selvagem. Em algumas modalidades, a muteína compreende um resíduo de tipo selvagem em uma ou mais das posições 35, 36, 42, 104, 115 ou 146 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições equivalentes em SEQ ID NO: 6 (por exemplo, posições 15, 16, 22, 84, 95 e 126).

[0214] As mutações nestas posições podem ser combinadas com qualquer uma das outras mutações descritas aqui incluindo, dentre outras, substituições nas posições 73, 76, 100 ou 138 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições em uma ou mais das posições 53, 56, 80 ou 118 que correspondem à SEQ ID NO: 6 descritas aqui e acima. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação N49S que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação Y51S ou Y51H que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação K55R que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação T57A que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação K68E que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação V89A que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação N91R que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2

compreende uma mutação Q94P que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação N108D ou N108R que corresponde à SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação C145A ou C145S que corresponde à SEQ ID NO: 15. Estas substituições podem ser usadas individualmente ou em combinação umas com as outras. Em algumas modalidades, a muteína compreende cada uma destas substituições. Em algumas modalidades, a muteína compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 destas mutações. Em algumas modalidades, a muteína compreende um resíduo de tipo selvagem em uma ou mais das posições 35, 36, 42, 104, 115 ou 146 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições equivalentes em SEQ ID NO: 6 (por exemplo, posições 15, 16, 22, 84, 95 e 126).

[0215] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação N29S que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação Y31S ou Y31H que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação K35R que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação T37A que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação K48E que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma

mutação V69A que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação N71R que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação Q74P que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação N88D ou N88R que corresponde à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma mutação C125A ou C125S que corresponde à SEQ ID NO: 6. Estas substituições podem ser usadas individualmente ou em combinação umas com as outras. Em algumas modalidades, a muteína compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 destas mutações. Em algumas modalidades, a muteína compreende cada uma destas substituições. Em algumas modalidades, a muteína compreende um resíduo de tipo selvagem em uma ou mais das posições 35, 36, 42, 104, 115 ou 146 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições equivalentes em SEQ ID NO: 6 (por exemplo, posições 15, 16, 22, 84, 95 e 126).

[0216] Para qualquer uma das muteínas de IL-2 descritas aqui, em algumas modalidades, uma ou mais das posições 35, 36, 42, 104, 115 ou 146 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições equivalentes em SEQ ID NO: 6 (por exemplo, posições 15, 16, 22, 84, 95 ou 126) são de tipo selvagem (por exemplo, conforme mostrado em SEQ ID NOs: 6 ou 15). Em algumas modalidades, 2, 3, 4, 5, 6 ou cada uma das

posições 35, 36, 42, 104, 115 ou 146 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições equivalentes em SEQ ID NO: 6 (por exemplo, posições 15, 16, 22, 84, 95 e 126) são de tipo selvagem.

[0217] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma sequência de:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPKATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 16)

[0218] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma sequência de:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPKATELKHIQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 17)

[0219] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma sequência de:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 18)

[0220] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 compreende uma sequência de:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 19)

[0221] Em algumas modalidades, as sequências de muteína de IL-2 descritas aqui não compreendem a sequência líder de IL-2. A sequência líder de IL-2 pode ser representada pela sequência MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 20). Portanto, em algumas modalidades, as sequências ilustradas acima também podem incluir peptídeos sem a sequência líder. Embora SEQ ID NOs: 16-20 sejam ilustradas com mutação apenas em uma das posições 73, 76, 100 ou 138 que correspondem à SEQ ID NO: 15 ou posições em uma ou mais das posições 53, 56, 80 ou 118 que correspondem à SEQ ID NO : 6, os peptídeos podem compreender uma, duas, três ou 4 das mutações nestas posições. Em algumas modalidades, a substituição em cada posição é isoleucina ou outro tipo de substituição de aminoácidos conservativa. Em algumas modalidades, a leucina nas posições citadas é substituída, independentemente, por isoleucina, valina, metionina ou fenilalanina.

[0222] Em algumas modalidades, a molécula de muteína de IL-2 é fundida com uma região Fc ou outra região de ligação, conforme descrito aqui. Exemplos de tais proteínas de fusão podem ser encontrados nos documentos US9580486, US7105653, US9616105, US9428567, US2017/0051029, WO2016/164937, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428 A2, WO2016025385A1,

US2017/0037102 e US2006/0269515, cada um dos quais é incorporado por referência na íntegra.

[0223] Em algumas modalidades, a região Fc compreende aquilo que é conhecido como a mutação LALA. Usando a numeração de Kabat da região Fc, isto corresponderia a L247A, L248A e G250A. Em algumas modalidades, usando a numeração EU da região Fc, a região Fc compreende uma mutação L234A, uma mutação L235A e/ou uma mutação G237A.

[0224] Independentemente do sistema de numeração usado, em algumas modalidades, a porção Fc pode compreender mutações que correspondem a estes resíduos. Em algumas modalidades, a região Fc compreende mutações N297G ou N297A (numeração de Kabat). A numeração de Kabat é baseada em uma sequência completa, porém, poderia ser usada em um fragmento com base em um alinhamento tradicional usado por aqueles versados na técnica para a região Fc.

[0225] Em algumas modalidades, a região Fc compreende uma sequência de:

DKTHTCPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG. (SEQ ID
 NO: 21)

ou

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG. (SEQ ID
 NO: 28)

[0226] Em algumas modalidades, a muteína de IL-2 está ligada à região Fc. Exemplos não limitativos de ligantes são ligantes de glicina/serina. Por exemplo, um ligante de glicina/serina pode ser uma sequência GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22) ou GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30). Este é simplesmente um exemplo não limitativo e o ligante pode ter um número variável de repetições GGGGS (SEQ ID NO: 23) ou GGGGA (SEQ ID NO: 29). Em algumas modalidades, o ligante compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 das repetições GGGGS (SEQ ID NO: 23) ou GGGGA (SEQ ID NO: 29).

[0227] Assim, a fusão IL-2/Fc pode ser representada pela fórmula $Z_{IL-2M}-L_{gs}-Z_{Fc}$, em que Z_{IL-2M} é uma muteína de IL-2 conforme descrito aqui, L_{gs} é uma sequência ligante conforme descrito aqui (por exemplo, ligante de glicina/serina) e Z_{Fc} é uma região Fc descrita aqui ou conhecida por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, a fórmula pode estar na orientação inversa $Z_{Fc}-L_{gs}-Z_{IL-2M}$.

[0228] Em algumas modalidades, a fusão IL-2/Fc compreende uma sequência de

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPEKATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTH
TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
24)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPEKATELKHIQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTH
TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
25)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPEKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTH
TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD

GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
26)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGISNHKNPRLARM
LTFKFYMPEKATELKHLOCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKG
SETTFMCEYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTH
TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
27) .

[0229] Em algumas modalidades, a fusão IL-2/Fc compreende uma sequência selecionada a partir da Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Sequências de aminoácidos da proteína de fusão IL-2/Fc

Identificação de sequência	Sequência
SEQ ID NO: 7	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE</p> <p>LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFM</p> <p>CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGAGGGGDKHTCPCPAPEL</p> <p>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</p> <p>AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK</p> <p>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN</p> <p>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS</p> <p>LSPGK</p>
SEQ ID NO: 8	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE</p> <p>LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFM</p> <p>CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP</p> <p>KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST</p> <p>FRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL</p> <p>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS</p> <p>FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO: 9	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATE</p> <p>LKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFM</p> <p>CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTDKHTCPCPAPELLGGPSVFLF</p> <p>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</p> <p>YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</p> <p>VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD</p> <p>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>

Identificação de sequência	Sequência
SEQ ID NO: 10	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E</p> <p>LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFM</p> <p>CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGP</p> <p>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</p> <p>PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ</p> <p>PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT</p> <p>PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G</p>
SEQ ID NO: 11	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E</p> <p>LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFM</p> <p>CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE</p> <p>LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH</p> <p>NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS</p> <p>KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</p> <p>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L</p> <p>SLSPG</p>
SEQ ID NO: 12	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E</p> <p>LKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFM</p> <p>CEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPP</p> <p>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD</p> <p>GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</p> <p>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</p> <p>GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F S C S V M H E A L H N Y H</p> <p>TQKSLSLSPG</p>

Identificação de sequência	Sequência
SEQ ID NO: 13	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S R I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F S Q S I I S T L T G G G G S G G G G S G G G G S G G G S D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
SEQ ID NO: 14	APTSSSTKKTQLQLEHLLHLQMI L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F S Q S I I S T L T G G G G S G G G G S G G G S D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y P V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G

[0230] Em algumas modalidades, as muteínas de IL-2 compreendem uma ou mais das sequências fornecidas na tabela a seguir a qual, em algumas modalidades, mostra a muteína de IL-2 fundida com outras proteínas ou ligantes. A tabela também fornece sequências para uma variedade de domínios Fc ou variantes com as quais a IL-2 pode ser fundida:

SEQ ID NO:	Breve descrição	Sequência de aminoácidos

31	IL-2 humana com mutação C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
32	IL-2 humana com mutações C125S e T3A	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
33	IL-2 humana com N88R e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
34	IL-2 humana com mutações V69A, Q74P e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
35	IL-2 humana com mutações V69A, Q74P, N88D e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
36	IL-2 humana com mutações V69A, Q74P, N88R e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT

37	IL-2 humana com N88D e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
38	IL-2 humana com mutações L53I, V69A, Q74P, N88D e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATEIKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
39	IL-2 humana com mutações L56I, V69A, Q74P, N88D e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHIQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
40	IL-2 humana com mutações V69A, Q74P, L80I, N88D e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHIRP RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLT
41	IL-2 humana com mutações V69A, Q74P, N88D, L118I, e C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADx`ETATIVEFINRW ITFSQSIISTLT
42	Fc de IgG1 humana (fusões N- terminais)	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

	com mutações L234A, L235A e G237A	GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	Ligante GGGGSGGGGSGGG GS (15 aminoácidos)	GGGGSGGGGSGGGGS
22	Ligante GGGGSGGGGSGGG GSGGGGS (20 aminoácidos)	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
23	Ligante GGGGS (5 aminoácidos)	GGGGS
43	Fc de IgG1 humana (truncada) com mutação N297G	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQRP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	Domínios CH1- CH2-CH3 de cadeia pesada de anticorpo (IgG1 humana com L234A,	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV

	L235A e G237A)	SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
45	Domínio constante Kappa de anticorpo (humano)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
46	IL-2-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
47	IL-2 T3A- G4Sx3-Fc	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT

		KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
48	IL-2 N88R- G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
49	IL-2 V69A, Q74P, -G4Sx3- Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG

50	IL-2 N88D V69A, Q74P- G4Sx3-Fc	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</p> <p>APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</p> <p>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</p> <p>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT</p> <p>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS</p> <p>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL</p> <p>SLSPG</p>
51	IL-2 N88R V69A, Q74P- G4Sx3-Fc	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP</p> <p>RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</p> <p>APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</p> <p>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</p> <p>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT</p> <p>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS</p> <p>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL</p> <p>SLSPG</p>
52	IL-2 N88D- G4Sx3-Fc	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAG</p> <p>APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</p>

		<p>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</p> <p>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT</p> <p>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS</p> <p>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSL</p> <p>SLSPG</p>
53	<p>IL-2 L53I</p> <p>N88D V69A,</p> <p>Q74P-G4Sx4-Fc</p>	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATEIKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPA</p> <p>PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE</p> <p>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</p> <p>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</p> <p>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP</p> <p>PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY</p> <p>TQKSLSLSPG</p>
54	<p>IL-2 L56I</p> <p>N88D V69A,</p> <p>Q74P-G4Sx4-Fc</p>	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHILQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPA</p> <p>PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE</p> <p>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</p> <p>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</p> <p>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP</p> <p>PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHY</p> <p>TQKSLSLSPG</p>

55	IL-2 L80I N88D V69A, Q74P-G4Sx4-Fc	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHIRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPA</p> <p>PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</p> <p>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</p> <p>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</p> <p>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP</p> <p>PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY</p> <p>TQKSLSLSPG</p>
56	IL-2 L118I N88D V69A, Q74P-G4Sx4-Fc	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFINRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPA</p> <p>PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</p> <p>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</p> <p>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</p> <p>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP</p> <p>PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY</p> <p>TQKSLSLSPG</p>
57	IL-2 N88D V69A, Q74P- G4Sx4-Fc	<p>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT</p> <p>FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRP</p> <p>RDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</p> <p>FSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPA</p>

		PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
58	Fc-G4S-IL-2 N88D V69A, Q74P	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT

[0231] Em algumas modalidades, as sequências mostradas na tabela ou ao longo do presente pedido compreendem ou não compreendem uma ou mais mutações que correspondem às posições L53, L56, L80 e L118. Em algumas modalidades, as sequências mostradas na tabela ou ao longo do presente pedido compreendem ou não compreendem uma ou mais mutações que correspondem às posições L59I, L63I, I24L, L94I, L96I ou L132I ou outras substituições nas mesmas posições. Em algumas modalidades, a mutação é leucina em isoleucina. Em algumas

modalidades, a muteína não compreende outra mutação além daquelas mostradas ou descritas aqui. Em algumas modalidades, o peptídeo compreende uma sequência de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 ou SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 ou SEQ ID NO: 58.

[0232] Em algumas modalidades, a porção Fc da fusão não está incluída. Em algumas modalidades, o peptídeo consiste essencialmente em uma muteína de IL-2 fornecida aqui. Em algumas modalidades, a proteína é livre de uma porção Fc.

[0233] Apenas para fins ilustrativos, modalidades das muteínas de IL-2 fundidas com uma Fc e com uma porção de alvejamento são ilustradas na FIG. 19.

[0234] As sequências são apenas para fins ilustrativos e não se destinam a ser limitativas. Em algumas modalidades, o composto compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, 54, 55 ou 56. Em algumas modalidades, o composto

compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, 54, 55 ou 56 com ou sem uma mutação C125A ou C125S.

[0235] Em uma modalidade, uma molécula de muteína de IL-2 compreende pelo menos 60, 70, 80, 85, 90, 95 ou 97 % de identidade ou homologia de sequência com uma molécula de IL-2 humana de ocorrência natural, por exemplo, a sequência de uma IL-2 de ocorrência natural descrita ou incorporada aqui por referência.

[0236] Conforme descrito aqui, as muteínas de IL-2 podem ser parte de uma molécula biespecífica com uma porção de união, tal como um anticorpo MAdCAM que terá como alvo a muteína de IL-2 em uma célula que expressa MAdCAM. Conforme descrito aqui, a molécula biespecífica pode ser produzida a partir de duas cadeias polipeptídicas. Em algumas modalidades, o seguinte pode ser usado:

Tabela de Compostos Biespecíficos de MAdCAM- IL-2 Muteína		
Detalhes	Cadeia 1 N-terminal aos IDs de sequência do componente da molécula C-terminal	Cadeia 2 N-terminal aos IDs de sequência de componente da molécula C-terminal

	Domínio VH de anticorpo	Domínios CH1-CH2- CH3 de cadeia pesada de anticorpo	Ligante 1	Porção C-termi nal	Domínio VK de cadeia leve	Domínio CK de cadeia leve
1. Anti- MAdCam-Fc- IL-2 N88D V69A, Q74P	Anti- MAdCam-VH1 de rato	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 35	Anti- MAdCam- VK1 de rato	SEQ ID NO: 45
2. Anti- MAdCam - Fc-IL-2 N88D V69A, Q74P	Anti- MAdCam-VH2 de rato	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 35	Anti- MAdCam- VK2 de rato	SEQ ID NO: 45
3. Anti- MAdCam - Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Anti- MAdCam-VH1 de rato	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Anti- MAdCam- VK3 de rato	SEQ ID NO: 45
4. TTJ2- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	TTJ2-VH humana	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	TTJ2-VK humana	SEQ ID NO: 45

5. anti hu.MAdCAM- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Anti- MAdCam-VH3 humana	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Anti- MAdCam- VK3 humana	SEQ ID NO: 45
6. anti hu.MAdCAM- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Anti- MAdCam-VH4 humana	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Anti- MAdCam- VK4 humana	SEQ ID NO: 45
7. anti hu.MAdCAM- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Anti- MAdCam-VH5 humana	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Anti- MAdCam- VK5 humana	SEQ ID NO: 45

[0237] As proteínas podem ser produzidas com ou sem uma mutação C125A ou C125S na muteína de IL-2.

[0238] Em algumas modalidades, o domínio kappa constante em qualquer uma das cadeias leves pode ser substituído por um domínio lambda constante.

Ligantes de GITR

[0239] GITR (CD357) é um marcador na superfície celular presente em Tregs. O bloqueio da interação GITR-GITRL mantém a função de Tregs. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma entidade de ligação IIC

que se liga a células Tregs que expressam GITR e uma porção de alvejamento que tem como alvo o composto terapêutico no tecido alvo de interesse.

[0240] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma molécula de anticorpo anti-GITR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GITR que inibe a ligação de GITR ao GITRL.

[0241] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma molécula de anticorpo anti-GITR, molécula de anticorpo anti-GITR a qual inibe a ligação de GITR ao GITRL e é agonista de PD-1, molécula de muteína de IL-2 ou outro efector descrito aqui.

[0242] Embora não deseje estar limitado pela teoria, acredita-se que o composto terapêutico que compreende um ligante de GITR efetue o acúmulo de Tregs que expressam GITR na localização alvo da porção de alvejamento do composto terapêutico, por exemplo, um transplante ou local de lesão de órgão.

BUTIROFILINAS/MOLÉCULAS DE TIPO BUTIRROFILINA

[0243] A porção de ligação/modulação efetora pode compreender uma molécula agonística de BTNL2. Embora não deseje estar preso à teoria, acredita-se que as moléculas agonísticas de BTL2 induzam a células Treg.

[0244] Uma molécula agonística de BTNL2, conforme o termo é usado aqui, se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência de BTNL2 suficiente que, como parte de um composto terapêutico, induz a células Treg. Em algumas modalidades, uma molécula de BTL2 tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100 % de identidade de sequência, ou identidade de sequência substancial, com uma butirofilina de ocorrência natural.

[0245] Em algumas modalidades, uma porção de ligação/modulação efetora é uma molécula antagonista de BTNL8.

COMPOSTOS TERAPÊUTICOS QUE COMPREENDEM UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO/MODULAÇÃO SM: MANIPULAÇÃO DO MICROAMBIENTE LOCAL

[0246] Um composto terapêutico pode compreender uma porção de ligação/modulação efetora que promove um microambiente local imunossupressor, por exemplo, ao fornecer, na proximidade do alvo, uma substância que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo, denominada aqui como porção de ligação/modulação SM.

[0247] Em algumas modalidades, a porção de ligação/modulação SM compreende uma molécula que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo (denominada aqui como uma porção de ligação/modulação SM). Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção

de ligação/modulação SM que se liga e acumula uma substância solúvel, por exemplo, uma substância endógena ou exógena, que tem função imunossupressora. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação SM, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73 ou molécula de fosfatase alcalina, que se liga, inibe, captura, degrada ou neutraliza uma substância solúvel, tipicamente uma substância solúvel endógena, por exemplo, ATP no caso de uma molécula de CD39 ou molécula de fosfatase alcalina ou AMP no caso de uma molécula de CD73, que promove um ataque imune. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma porção de ligação/modulação SM que compreende uma substância imunossupressora, por exemplo, um fragmento de proteína que é imunossupressor.

COMPOSTOS TERAPÊUTICOS QUE COMPREENDEM UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO/MODULAÇÃO ICSM: INIBIÇÃO DE ESTIMULAÇÃO, POR EXEMPLO, INIBIÇÃO DE COESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES

[0248] Um composto terapêutico pode compreender uma porção de ligação/modulação ICSM que inibe ou antagoniza a um par de ligação estimulador, por exemplo, coestimulador, por exemplo, OX40 e OX40L. A porção de ligação/modulação ICSM pode se ligar e antagonizar qualquer membro do par.

[0249] Em uma modalidade, a porção de ligação/modulação ICSM compreende uma molécula de anticorpo que se liga e antagoniza qualquer membro de um par de ligação estimulador, por exemplo, coestimulador. Em uma modalidade, a porção de ligação/modulação ICSM compreende um análogo antagonista de um dos membros do par de ligação. Em tais modalidades, a porção de ligação/modulação ICSM pode compreender um fragmento solúvel de um dos membros que se liga ao outro. Tipicamente, o análogo terá pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 98 % de homologia ou identidade de sequência com um membro de ocorrência natural que se liga ao membro alvo do par. No caso de uma porção de ligação/modulação ICSM que se liga ao membro presente sobre a superfície de uma célula imune, a porção de ligação/modulação ICSM normalmente se liga, porém não ativa, ou permite que o membro endógeno oposto ligue e ative.

[0250] Assim, no caso do par de ligação que inclui, por exemplo, o membro da célula imune OX40 e o membro oposto OX40L, uma porção de ligação/modulação ICSM pode compreender qualquer um dos seguintes:

[0251] a) uma molécula de anticorpo que se liga ao membro da célula imune OX40 e antagoniza a estimulação, por exemplo, pelo bloqueio da ligação do membro oposto OX40L endógeno;

[0252] b) uma molécula de anticorpo que se liga ao membro oposto OX40L e antagoniza a estimulação, por exemplo, pelo bloqueio da ligação efetiva do membro endógeno oposto OX40L ao membro da célula imune OX40;

[0253] c) um fragmento solúvel ou análogo do membro oposto OX40L que se liga ao membro da célula imune OX40 e antagoniza a estimulação; e

[0254] d) um fragmento solúvel ou análogo do membro da célula imune OX40 que se liga ao membro OX40L e antagoniza a estimulação.

[0255] Por exemplo, a porção de ligação/modulação ICSM, por exemplo, uma molécula de anticorpo ou um análogo antagonista ou o membro oposto, pode se ligar à CD2, ICOS, CD40L, CD28, LFA1, SLAM, TIM1, CD30, OX40 (CD134), 41BB (CD137), CD27, HVEM, DR3, GITR, BAFFR, TACI, BCMA ou CD30 e CD40. Em outra modalidade, a porção de ligação/modulação ICSM, por exemplo, uma molécula de anticorpo ou um análogo antagonista ou o membro oposto, pode se ligar à B7.1, B7.2, ICOSL (B7-H2, B7RP1), LFA3, CD48, CD58, ICAM1, SLAM, TIM4, CD40, CD30L, OX40L (CD252), 41BBL (CD137L), CD70, LIGHT, TLIA, GITRL, BAFF, APRIL ou CD30 e CD40L.

[0256] Em algumas modalidades, a molécula de ligação/modulação ICSM se liga e antagoniza uma molécula ativadora ou coestimuladora, por exemplo, uma molécula

coestimuladora, presente em uma célula imune, ou se liga ao membro oposto, impedindo que o membro oposto ative a molécula coestimuladora presente na célula imune. Em algumas modalidades, a ICSM compreende uma molécula de anticorpo antagonista, por exemplo, uma molécula de anticorpo que se liga à molécula coestimuladora em uma célula imune ou se liga ao membro oposto da ICSM, impedindo que o membro oposto ative a molécula coestimuladora na célula imune e resultando em inibição de atividade da molécula coestimuladora. Em algumas modalidades, a ICSM compreende uma molécula de contraparte antagonista, por exemplo, um fragmento de uma molécula que se liga à molécula coestimuladora e resulta em inibição de atividade da molécula coestimuladora.

[0257] Em algumas modalidades, um membro do par de ligação estará sobre a superfície de uma célula imune, por exemplo, uma célula T, B ou NK ou célula dendrítica, enquanto que o membro oposto estará em outra célula imune ou em uma APC, tal como uma célula dendrítica, ou células não imunes, tais como células do músculo liso ou células endoteliais.

[0258] A tabela a seguir fornece exemplos não limitativos de pares de moléculas coestimuladoras e contraestrutura:

TABELA 2: Pares de molécula coestimuladora e contraestrutura	
Molécula coestimuladora (por exemplo, sobre células T)	Contraestrutura
CD28	B7.1 ou B7.2
ICOS	ICOSL (B7H-2, B7RP1)
CD2	LFA3, CD48, CD58
LFA1	ICAM1
SLAM	SLAM
TIM1	TIM4
CD40L	CD40
CD30	CD30L
OX40/CD134	OX40L (CD252)
41BB/CD137	41BBL (CD137L)
CD27	CD70
HVEM	LIGHT
DR3	TL1A
GITR	GITRL
Molécula coestimuladora (por exemplo, sobre células B)	Contraestrutura
BAFFR	BAFF

TACI	BAFF e APRIL
BCMA	BAFF e APRIL
CD40	CD40L
CD30L	CD30

TECIDO DO DOADOR

[0259] Os compostos e métodos terapêuticos descritos aqui podem ser usados em conjunto com um transplante de tecido do doador para um indivíduo e podem minimizar a rejeição, minimizar o dano mediado por células imunes efetoras, prolongar a aceitação ou prolongar a vida funcional do tecido transplantado do doador. O tecido pode ser um tecido de xenoenxerto ou aloenxerto. O tecido transplantado pode compreender todo ou parte de um órgão, por exemplo, fígado, rim, coração, pâncreas, timo, pele ou pulmão. Em modalidades, os compostos terapêuticos descritos aqui reduzem ou eliminam a necessidade de supressão imune sistêmica. Os compostos e métodos terapêuticos descritos aqui também podem ser usados para tratar GVHD. Em algumas modalidades, as células hospedeiras são revestidas com um composto terapêutico que compreende, como uma porção de ligação/modulação efetora, uma molécula de PD-L1.

[0260] A Tabela 2 fornece moléculas alvo para indicações de transplante. Uma molécula alvo é o alvo ao qual uma porção de alvejamento se liga. Conforme discutido

em outra parte aqui, em algumas modalidades, é selecionada uma porção de alveamento que se liga a um produto de um alelo presente no tecido do doador e que não é expresso pelo indivíduo (receptor) ou expresso em um nível diferente (por exemplo, reduzido ou substancialmente reduzido).

Tabela 2: Moléculas Alvo para Indicações de Transplante		
Indicação	Órgão / tipo de célula	Alvo
Tecido transplantado de aloenxerto, por exemplo, transplante de órgão sólido de aloenxerto, GvHD	Todos	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ ou HLA-DR
Transplante	Rim	Antígenos expressos no rim onde células imunes se infiltram, por exemplo, incluindo, porém não limitado a, a região intestinal tubular, por exemplo, Uromodulina, SLC22A2, SLC22A6, FXYD4, SLC5A10, SLC6A13, AQP6, SLC13A3, TMEM72, BSND, NPR3, e o epitélio tubular proximal e distal, tal como OAT1, OCT2

TRANSTORNOS AUTOIMUNES

[0261] Os compostos e métodos terapêuticos descritos aqui podem ser usados para tratar um indivíduo com ou em risco de ter uma resposta autoimune indesejada, por exemplo, uma resposta autoimune em Diabetes de Tipo 1, Esclerose Múltipla, Cardiomiosite, vitiligo, alopecia, doença inflamatória intestinal (IBD, por exemplo, doença de Crohn ou colite ulcerativa), síndrome de Sjogren, esclerose glomerular segmentada focal (FSGS), esclerodermia/esclerose sistêmica (SSc) ou artrite reumatoide. Em algumas modalidades, o tratamento minimiza a rejeição, minimiza o dano mediado por células imunes efetoras, prolonga a sobrevivência do tecido do indivíduo que está sofrendo ou um risco de sofrer um ataque autoimune. A Tabela 3 fornece moléculas alvo para várias indicações autoimunes e tipos de órgão/célula. Uma molécula alvo é o alvo ao qual uma porção de alvejamento se liga.

Tabela 3: Moléculas alvo para indicações autoimunes		
Indicação	Órgão / tipo de célula	Molécula alvo
Diabetes de tipo 1 e transplante	Pâncreas/ilhotas pancreáticas, células beta	SEZ6L2, LRP11, DISP2, SLC30A8, FXYD2 TSPAN7 TMEM27 (referência: Hald et al., 2012 <i>Diabetologia</i> 55:154); FXYD2; GPR119; HEPACAM2,

		DPP6 ou MAdCAM
Esclerose múltipla	CNS / bainha de mielina de oligodendróцитos	MOG, PLP, MBP
Cardiomiosite, artrite reumatoide	Cardiomiócitos, monócitos, macrófagos, células mieloides	SIRPA (CD172a)
Doença inflamatória do intestino (colite ulcerativa, doença de Crohn) ou GVHD; doença celíaca	Intestino	MAdCAM
Hepatite autoimune (AIH); colangite esclerosante primária (PSC); esclerose biliar primária (PBC); transplante	Fígado	MAdCAM
Esclerose glomerular segmentada focal (FSGS) e outras doenças que podem	Rim, podócitos, túbulos, células epiteliais	COL1A1, Caderina 2, VCAM-1, Thyl, Podocina, KIM1 (Hodgin et al., <i>Am</i> <i>J Pathol</i> 177: 1675; 2010);

afetar os rins, por exemplo, nefrite por lúpus, escleroderma sistêmico, nefropatia glomerular membranosa (MGN); nefropatia membranosa (MN); doença de alteração mínima (MCD); nefropatia por IgA; vasculite associada à ANCA (AAV)		PLA2R; OAT1; OCT2; K-caderina 6
Síndrome de Sjogren	Glândulas salivares, células epiteliais, rim	FCGR3B, HLAB, KIM1 (Hu et al., <i>Arth and Rheum</i> 56: 3588; 2007)
Escleroderma, esclerose sistêmica (SSc)	Pele, rim, pulmão, fibroblastos, tecido conectivo	Colágeno I, III, VI, VII, fibronectina (Wang et al., <i>Arth and Rheum</i> 54: 2271; 2006)
Vitiligo	Pele, epiderme, células de Langerhans,	COL17A1, CD1A, CD207, desmogleína 1-4, queratina 1

	queratinócitos, melanócitos	
Alopecia areata	Pele, folículo capilar / bulbo capilar, derme	CD133 (Yang e Cotsarelis, <i>J Dermatol Sci</i> 57: 2; 2010)

[0262] Outros exemplos de transtornos e doenças autoimunes que podem ser tratados com os compostos descritos aqui incluem, porém sem limitações, miocardite, síndrome pós-infarto de miocárdico, síndrome pós-pericardiotomia, endocardite bacteriana subaguda, nefrite da membrana basal antiglomerular, cistite intersticial, nefrite por lúpus, glomerulonefropatia membranosa, doença renal crônica ("CKD"), hepatite autoimune, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, síndrome antissintetase, alopecia areata, angioedema autoimune, dermatite autoimune à progesterona, urticária autoimune, penfigoide bolhoso, penfigoide cicatricial, lúpus eritematoso, epidermólise bolhosa adquirida, eritema nodoso, penfigoide gestacional, hidradenite supurativa, líquen plano, líquen escleroso, doença morfeia linear por IgA (LAD), pênfigo vulgar, pitiríase liquenoide e varioliforme aguda, doença de Mucha-Habermann, psoríase, escleroderma sistêmico, vitiligo, doença de Addison, síndrome poliendócrina autoimune (APS) de tipo 1, síndrome poliendócrina autoimune (APS) de tipo 2,

síndrome poliendócrina autoimune (APS) de tipo 3, pancreatite autoimune (AIP), diabetes mellitus de tipo 1, tireoidite autoimune, tireoidite de Ord, doença de Grave, ooforite Autoimune, endometriose, orquite autoimune, síndrome de Sjogren, enteropatia autoimune, doença celíaca, doença de Crohn, colite microscópica, colite ulcerativa, trombocitopenia, adipose dolorosa, doença de Still de início adulto, espondilite anquilosante, síndrome de CREST, lúpus induzido por fármacos, artrite relacionada à entesite, fasciíte eosinofílica, síndrome de Felty, doença relacionada à IgG4, artrite juvenil, doença de Lyme (crônica), doença mista do tecido conjuntivo (MCTD), reumatismo palindrômico, síndrome de Parry-Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, artrite psoriática, artrite reativa, policondrite recidivante, fibrose retroperitoneal, febre reumática, artrite reumatoide, sarcoidose, síndrome de Schnitzler, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), doença do tecido conjuntivo indiferenciada (UCTD), dermatomiosite, fibromialgia, miosite por corpos de inclusão, miosite, miastenia grave, neuromiotonia, degeneração cerebelar paraneoplásica, polimiosite, encefalomielite disseminada aguda (ADEM), neuropatia axonal motora aguda, encefalite pelo antirreceptor de N-metil-D-aspartato (anti-NMDA), esclerose concêntrica de Baló, encefalite de Bickerstaff,

desmielinização inflamatória crônica, polineuropatia, síndrome de Guillain-Barre, encefalopatia de Hashimoto, doença idiopática, doenças inflamatórias desmielinizantes, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, esclerose múltipla, síndrome de Oshtoran, transtorno neuropsiquiátrico autoimune pediátrico associado a estreptococos (PANDAS), neuropatia inflamatória progressiva, síndrome das pernas inquietas, síndrome da pessoa rígida, coreia de Sydenham, mielite transversal, retinopatia autoimune, uveíte autoimune, síndrome de Cogan, oftalmopatia de Graves, uveíte intermediária, conjuntivite lineal, úlcera de Mooren, neuromielite óptica, síndrome de Opsoclonus mioclonus, neurite óptica, esclerite, síndrome de Susac, oftalmia simpática, síndrome de Tolosa-Hunt, doença autoimune do ouvido interno (AIED), doença de Meniere, doença de Behcet, granulomatose eosinofílica com poliangiíte (EGPA), arterite de células gigantes, granulomatose com poliangiíte (GPA), vasculite por IgA (IgAV), doença de Kawasaki, vasculite leucocitoclástica, vasculite por lúpus, poliangiíte microscópica (MPA), poliarterite nodosa (PAN), polimialgia reumática, vasculite, imunodeficiência primária e semelhantes.

[0263] Outros exemplos de possíveis transtornos e doenças autoimunes, bem como comorbidades autoimunes, que

podem ser tratados com os compostos descritos aqui incluem, dentre outros, síndrome da fadiga crônica, síndrome complexa de dor regional, esofagite eosinofílica, gastrite, doença pulmonar intersticial, síndrome POEMS, fenômeno de Raynaud, imunodeficiência primária, pioderma gangrenoso, agamaglobulinemia, amiloidose, esclerose lateral amiotrófica, nefrite antitubular de membrana basal, alergia atópica, dermatite atópica, neuropatia periférica autoimune, doença de Blau, doença de Chagas, doença pulmonar obstrutiva crônica, osteomielite multifocal recorrente, deficiência de componente 2 do complemento, dermatite de contato, síndrome de Cushing, angiíte leucocitoclástica cutânea, doença de Dego, eczema, gastroenterite eosinofílica, pneumonia eosinofílica, eritroblastose fetal, fibrodisplasia ossificante progressiva, penfigoide gastrintestinal, hipogamaglobulinemia, miocardite de células gigantes idiopática, fibrose pulmonar idiopática, nefropatia por IgA, lipoproteínas imunorreguladoras, síndrome IPEX, conjuntivite ligenosa, síndrome de Majeed, narcolepsia, encefalite de Rasmussen, esquizofrenia, doença do soro, espondiloartropatia, síndrome de Sweet, arterite de Takayasu e semelhantes.

[0264] Em algumas modalidades, o transtorno autoimune não compreende pênfigo vulgar ou pênfigo. Em algumas

modalidades, o transtorno autoimune não compreende pênfigo foliáceo. Em algumas modalidades, o transtorno autoimune não compreende penfigoide bolhoso. Em algumas modalidades, o transtorno autoimune não compreende a doença de Goodpasture. Em algumas modalidades, o transtorno autoimune não compreende psoríase. Em algumas modalidades, o transtorno autoimune não compreende um transtorno cutâneo. Em algumas modalidades, o transtorno não compreende um transtorno neoplásico, por exemplo, câncer.

COMPOSTOS TERAPÊUTICOS

[0265] Um composto terapêutico compreende uma porção de alvejamento específica funcionalmente associada a uma porção de ligação/modulação efetora. Em algumas modalidades, a porção de alvejamento específica e a porção de ligação/modulação efetora são ligadas uma à outra através de uma ligação covalente ou não covalente, por exemplo, uma ligação covalente ou não covalente que liga diretamente uma à outra. Em outras modalidades, uma porção de alvejamento específica e uma porção de ligação/modulação efetora são ligadas, por exemplo, de forma covalente ou não covalente, através de uma porção ligante. Por exemplo, no caso de um polipeptídeo de fusão, uma sequência polipeptídica que compreende a porção de alvejamento específica e uma sequência polipeptídica podem ser diretamente ligadas uma à outra ou

ligadas através de uma ou mais sequências ligantes. Em algumas modalidades, a porção ligante compreende um polipeptídeo. Os ligantes não estão, no entanto, limitados a polipeptídeos. Em algumas modalidades, uma porção ligante compreende outras estruturas principais, por exemplo, um polímero não peptídico, por exemplo, um polímero de PEG. Em algumas modalidades, uma porção ligante pode compreender uma partícula, por exemplo, uma nanopartícula, por exemplo, uma nanopartícula polimérica. Em algumas modalidades, uma porção ligante pode compreender uma molécula ramificada ou um dendrímero. No entanto, em modalidades nas quais a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICIM (a qual se liga a um efetor, tal como PD-1), estruturas que resultam em agrupamento na ausência de ligação ao alvo devem ser evitadas, uma vez que podem causar agrupamento na ausência de ligação ao alvo. Assim, em modalidades, o composto terapêutico tem uma estrutura, por exemplo, onde as cópias de uma ICIM são suficientemente limitadas, de modo que o agrupamento na ausência de ligação ao alvo seja minimizado ou substancialmente eliminado, ou eliminado, ou seja suficientemente minimizado para que supressão imune sistêmica substancial não ocorra.

[0266] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende um polipeptídeo que compreende uma porção de

alvejamento específica conjugada de forma covalente ou não covalente a uma porção de ligação/modulação efetora. Em algumas modalidades, uma molécula terapêutica compreende uma proteína de fusão que compreende uma porção de alvejamento específica fundida, por exemplo, diretamente ou através de uma porção de ligação que compreende um ou mais resíduos de aminoácidos, a uma porção de ligação/modulação efetora. Em algumas modalidades, uma molécula terapêutica compreende um polipeptídeo que compreende uma porção de alvejamento específica ligada através de uma ligação não covalente ou uma ligação covalente, por exemplo, uma ligação covalente que não uma ligação peptídica, por exemplo, uma ligação de sulfidrila, a uma porção de ligação/modulação efetora.

[0267] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende um polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo de fusão, que compreende:

1.a) uma porção de alvejamento específica que compreende um polipeptídeo de ligação específico para o alvo;

1.b) uma porção de alvejamento específica que compreende uma molécula de ligação de ligante do alvo;

1.c) uma porção de alvejamento específica que compreende uma molécula de anticorpo;

1.d) uma porção de alvejamento específica que compreende uma molécula de anticorpo com uma única cadeia, por exemplo, um domínio scFv; ou

1.e) uma porção de alvejamento específica que compreende uma primeira da região variável de cadeia leve ou pesada de uma molécula de anticorpo e em que a outra região variável está associada de forma covalente ou não covalente à primeira;

e

2.a) uma porção de ligação/modulação efetora que compreende um polipeptídeo de ligação específico efetor;

2.b) uma porção de ligação/modulação efetora que compreende uma molécula de ligação de ligante do efetor;

2.c) uma porção de ligação/modulação efetora que compreende uma molécula de anticorpo;

2.d) uma porção de ligação/modulação efetora que compreende uma molécula de anticorpo com uma única cadeia, por exemplo, um domínio scFv; ou

2.e) uma porção de ligação/modulação efetora que compreende uma primeira região variável de cadeia leve ou pesada de uma molécula de anticorpo e em que a outra região variável está associada de forma covalente ou não covalente à primeira.

[0268] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.a e 2.a.

[0269] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.a e 2.b.

[0270] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.a e 2.c.

[0271] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.a e 2.d.

[0272] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.a e 2.e.

[0273] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.b e 2.a.

[0274] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.b e 2.b.

[0275] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.b e 2.c.

[0276] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.b e 2.d.

[0277] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.b e 2.e.

[0278] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.c e 2.a.

[0279] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.c e 2.b.

[0280] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.c e 2.c.

[0281] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.c e 2.d.

[0282] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.c e 2.e.

[0283] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.d e 2.a.

[0284] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.d e 2.b.

[0285] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.d e 2.c.

[0286] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.d e 2.d.

[0287] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.d e 2.e.

[0288] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.e e 2.a.

[0289] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.e e 2.b.

[0290] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.e e 2.c.

[0291] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.e e 2.d.

[0292] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende 1.e e 2.e.

[0293] Os compostos terapêuticos descritos aqui podem, por exemplo, compreender uma pluralidade de porções de ligação/modulação efetoras e porções para alvejamento específicas. Qualquer ligante ou plataforma adequada pode ser usada para apresentar a pluralidade de porções. O ligante é, tipicamente, acoplado ou fundido a uma ou mais porções de ligação/modulação efetoras e porções de alvejamento.

[0294] Em algumas modalidades, dois (ou mais) ligantes se associam, de forma covalente ou ao não covalente, por exemplo, para formar um composto terapêutico Hetero- ou homodimérico. Por exemplo, o ligante pode compreender uma região Fc e duas regiões Fc associadas uma à outra. Em algumas modalidades de um composto terapêutico que compreende duas regiões ligantes, as regiões ligantes podem se auto-associar, por exemplo, como duas regiões Fc idênticas. Em algumas modalidades de um composto terapêutico que compreende duas regiões ligantes, as regiões ligantes não são capazes ou não são capazes de auto-associação substancial, por exemplo, as duas regiões Fc podem ser membros de um par *knob and hole*.

[0295] Configurações exemplificativas não limitativas de compostos terapêuticos compreendem o seguinte (por exemplo, na ordem do N- para o C-terminal):

R1 --- Região do Ligante A --- R2

R3 --- Região do Ligante B --- R4,

[0296] em que,

[0297] R1, R2, R3 e R4, cada um independentemente, compreendem uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação ICSM; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

[0298] as regiões do Ligante A e Ligante B compreendem porções que podem se associar umas às outras, por exemplo, o ligante A e o ligante B compreendem uma porção Fc, contanto que uma porção de ligação/modulação efetoras e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0299] Em algumas modalidades:

[0300] R1 compreende uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM, ou está ausente;

[0301] R2 compreende uma porção de alveamento específica ou está ausente;

[0302] R3 compreende uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM, ou está ausente;

[0303] R4 compreende uma porção de alveamento específica ou está ausente;

[0304] As regiões do Ligante A e Ligante B compreendem porções que podem se associar, por exemplo, o Ligante A e o Ligante B compreendem uma porção Fc, contanto que um de R1 ou R3 esteja presente e um de R2 ou R4 esteja presente.

[0305] Em algumas modalidades:

[0306] R1 compreende uma porção de alveamento específica ou está ausente;

[0307] R2 compreende uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM, ou está ausente;

[0308] R3 compreende uma porção de alveamento específica ou está ausente;

[0309] R4 compreende uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM, ou está ausente;

[0310] as regiões do Ligante A e Ligante B compreendem porções que podem se associar, por exemplo, o Ligante A e o Ligante B compreendem uma porção Fc, contanto que um de R1 ou R3 esteja presente e um de R2 ou R4 esteja presente.

[0311] Exemplos não limitativos incluem, porém não estão limitados a:

R1	Região do Ligante A	R2	R3	Região do Ligante B	R4	Outros
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes de Auto- emparelhamento
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes sem auto- emparelhamento

HCVR e LCVR (ou ausen te)	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR (ou ausente)	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes de Auto- emparelhamento Um de R1 ou R3 está ausente.
HCVR e LCVR (ou ausen te)	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR (ou ausente)	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes sem auto- emparelhamento Um de R1 ou R3 está ausente.
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv (ou ausente)	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv (ou ausente)	Regiões de Ligantes de Auto- emparelhamento Um de R2 ou R4 está ausente.
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv (ou ausente)	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv (ou ausente)	de Regiões de Ligantes sem auto- emparelhamento Um de R2 ou R4 está ausente.

HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes de Auto- emparelhamento R1 e R3 são os mesmos
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes Sem auto- emparelhamento R1 e R3 são diferentes
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes de Auto- emparelhamento R2 e R4 são os mesmos
HCVR e LCVR	Região Fc	fcFv	HCVR e LCVR	Região Fc	scFv	Regiões de Ligantes sem auto- emparelhamento R2 e R4 são diferentes
HCVR e LCVR: se refere a uma porção que compreende uma porção de ligação a antígeno de uma região variável de cadeias pesada e leve, tipicamente						

com a cadeia pesada fundida à região do Ligante.

Auto-emparelhamento: em que uma região Ligante pode emparelhar consigo mesma, por exemplo, uma região Fc que pode emparelhar com uma cópia de si mesma.

Auto-emparelhamento: em que uma região Ligante pode emparelhar consigo mesma, por exemplo, uma região Fc que pode emparelhar com uma cópia de si mesma (*knob and hole*).

[0312] Em algumas modalidades:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, independentemente: uma porção moduladora de ligação efetora que ativa um receptor inibidor em uma célula imune, por exemplo, uma célula T ou uma célula B, por exemplo, uma molécula de PD-L1 ou uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional (um agonista de PD-1); uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma porção de ligação efetora e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0313] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0314] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma porção moduladora de ligação efetora que ativa um receptor inibidor em uma célula imune, por exemplo, uma célula T ou uma célula B, por exemplo, uma molécula de PD-L1 ou uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional (um agonista de PD-1); e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0315] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0316] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional (um agonista de PD-1); e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0317] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0318] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, um anticorpo contra um antígeno tecidual; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional (um agonista de PD-1), por exemplo, uma molécula de scFv.

[0319] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0320] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma molécula de PD-L1 (um agonista de PD-1); e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0321] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0322] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, um anticorpo contra um antígeno tecidual; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, uma molécula de PD-L1 (um agonista de PD-1).

[0323] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0324] Em algumas modalidades:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma porção de ligação/modulação SM que modula, por exemplo,

se liga e inibe, captura, degrada ou de outra forma neutraliza uma substância, por exemplo, uma molécula solúvel que modula uma resposta imune, por exemplo, ATP ou AMP, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma porção de ligação/modulação SM e uma porção de alvejamento específica estejam presentes. Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0325] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma porção de ligação/modulação SM que modula, por exemplo, se liga e inibe, captura, degrada ou de outra forma neutraliza uma substância, por exemplo, uma molécula solúvel que modula uma resposta imune, por exemplo, ATP ou AMP, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0326] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-

emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0327] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0328] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0329] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, cada um, uma molécula de CD39; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual; e

em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0330] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, cada um, uma molécula de CD73; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0331] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0332] Em algumas modalidades:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de CD39 e o outro compreende uma molécula de CD73; e R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0333] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0334] Em algumas modalidades:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma molécula de HLA-G; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma molécula de HLA-G e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0335] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-

emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0336] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem uma molécula de HLG-A; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0337] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0338] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 agonística; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0339] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0340] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, cada um, uma molécula de anticorpo anti-KIR2DL4 agonística; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0341] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0342] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-LILRB2 agonística; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0343] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0344] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-KG2A agonística; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0345] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0346] Em algumas modalidades:

um de R1 e R3 compreende uma primeira porção escolhida dentre, e a outra compreende uma porção diferente escolhida entre: uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 antagonista, uma molécula de anticorpo anti-KG2A agonista e uma molécula de anticorpo anti-NKG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0347] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0348] Em algumas modalidades:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 antagonista e o outro compreende uma molécula de anticorpo anti-KG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0349] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0350] Em algumas modalidades:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 antagonista e o outro compreende uma molécula de anticorpo anti-NKG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0351] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0352] Em uma modalidade:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma molécula de muteína de IL-2; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma molécula de muteína de IL-2 e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0353] Em uma modalidade, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-

emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0354] Um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma molécula de muteína de IL-2, um compreende uma molécula de anticorpo anti-GITR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GITR que inibe a ligação de GITRL à GITR, e um compreende uma porção de alvejamento específica.

[0355] Em uma modalidade, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0356] Em uma modalidade:

R1 e R3 compreendem uma molécula de muteína de IL-2; e
R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0357] Em uma modalidade, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0358] Em uma modalidade:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GARP, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GARP ou uma molécula de ligação à GITR, por exemplo, uma molécula de

anticorpo anti-GITR e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0359] Em uma modalidade, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0360] Em uma modalidade:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GARP, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GARP, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0361] Em uma modalidade, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0362] Em uma modalidade:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GITR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GITR, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0363] Em uma modalidade, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0364] Em algumas modalidades:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma porção moduladora de ligação efetora que ativa um receptor inibidor em uma célula B, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma porção de ligação efetora e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0365] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0366] Na modalidade, a molécula anti-FCRL compreende: uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista, dirigida ao FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ou FCRL6.

[0367] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0368] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0369] Na modalidade, a molécula anti-FCRL compreende: uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista dirigida ao FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ou FCRL6.

[0370] Em algumas modalidades:

R1 e R3 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de anticorpo contra um antígeno tecidual; e

R2 e R4 compreendem, cada um, uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista, por exemplo, uma molécula de scFv.

[0371] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-

emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0372] Na modalidade, a molécula anti-FCRL compreende: uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista dirigida ao FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ou FCRL6.

[0373] Em algumas modalidades:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma molécula de anticorpo anti-BCR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-BCR antagonista, um compreende uma molécula de anticorpo anti FCRL e outro compreende uma porção de alvejamento específica.

[0374] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0375] Em algumas modalidades, a molécula anti-FCRL compreende: uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista dirigida ao FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ou FCRL6.

[0376] Em algumas modalidades:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma molécula de anticorpo biespecífica que compreende uma molécula de anticorpo anti-BCR, por exemplo, uma molécula de anticorpo

anti-BCR antagonista e uma molécula de anticorpo anti FCRL, e um compreende uma porção de alvejamento específica.

[0377] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0378] Na modalidade, a molécula anti-FCRL compreende: uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-FCRL agonista dirigida ao FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ou FCRL6.

[0379] Em algumas modalidades:

R1, R2, R3 e R4 compreendem independentemente:

i) uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM que minimiza ou inibe a atividade, expansão ou função celular de células T (uma porção de ligação/modulação efetora de células T);

ii) uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, uma porção de ligação/modulação ICSM ou uma porção de ligação/modulação SM que minimiza ou inibe a atividade, expansão ou função celular de células B função (uma porção de ligação/modulação efetora de células B);

iii) uma porção de alvejamento específica; ou

iv) está ausente;

contanto que uma porção de ligação/modulação efetora de células T, uma porção de ligação/modulação efetora de células B e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0380] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento).

[0381] Em algumas modalidades, um de R1, R2, R3 e R4 compreende um anticorpo anti-PD-1 agonista e um compreende uma molécula de HLA-G.

[0382] Em algumas modalidades, um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma porção de ligação/modulação SM, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73. Em algumas modalidades, um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma entidade que se liga, ativa ou mantém uma célula imune reguladora, por exemplo, uma célula Treg ou uma célula Breg, por exemplo, uma molécula de muteína de IL-2.

[0383] Em algumas modalidades, um de R1, R2, R3 e R4 compreende um anticorpo anti-PD-1 agonista ou um compreende uma molécula de HLA-G e um compreende uma molécula de muteína de IL-2. Em algumas modalidades, o anticorpo PD-1 é substituído por uma molécula de muteína de IL-2. Em algumas modalidades, um de R1, R2, R3 e R4 compreende um anticorpo

anti-PD-1 agonista, um compreende uma molécula de HLA-G e um compreende uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73. Em algumas modalidades, o anticorpo PD-1 é substituído por uma molécula de muteína de IL-2.

Regiões Ligante

[0384] Conforme discutido em outra parte no presente documento, porções para alvejamento e porções de ligação/modulação efetoras específicas podem ser ligadas por regiões ligantes. Qualquer região Ligante descrita aqui pode ser usada como um ligante. Por exemplo, as regiões Ligantes A e B podem compreender regiões Fc. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma região Ligante que pode se auto-associar. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma região Ligante que tem uma porção que minimiza a auto-associação e, tipicamente, a região Ligante A e a região Ligante B são heterodímeros. Os ligantes também incluem ligantes de glicina/serina. Em algumas modalidades, o ligante pode compreender uma ou mais repetições GGGGS (SEQ ID NO: 23). Em algumas modalidades, o ligante compreende 1, 2, 3, 4 ou 5 repetições de SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o ligante compreende GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22) ou GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30). Estes ligantes podem ser usados em qualquer

um dos compostos ou composições terapêuticas fornecidas no presente documento.

[0385] A região Ligante pode compreender uma região Fc que foi modificada (por exemplo, sofreu mutação) para produzir um heterodímero. Em algumas modalidades, o domínio CH3 da região Fc pode ter sofrido mutação. Exemplos de tais regiões Fc podem ser encontrados, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos Nº 9,574,010, a qual é aqui incorporada por referência na íntegra. A região Fc, conforme definido aqui, compreende um domínio CH3 ou um fragmento do mesmo e pode, adicionalmente, compreender um ou mais domínios da região constante ou fragmentos dos mesmos, incluindo dobradiça, CH1 ou CH2. Será entendido que a numeração dos resíduos de aminoácidos Fc é aquela do índice EU conforme em Kabat et al., 1991, Publicação NIH 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va. O "índice EU", conforme apresentado em Kabat, se refere à numeração de Kabat no índice EU do anticorpo IgG1 humano. Por conveniência, a Tabela B da Patente dos Estados Unidos Nº 9.574.010 fornece os aminoácidos numerados de acordo com o índice EU, conforme apresentado em Kabat, do domínio CH2 e CH3 de IgG1 humana, o qual é aqui incorporado por referência. A Tabela 1.1 da Patente dos Estados Unidos Nº 9.574.010 fornece mutações de heterodímeros variantes de Fc

que podem ser usados como regiões Ligantes. A Tabela 1.1 da Patente dos Estados Unidos Nº 9,574,010 é aqui incorporada por referência.

[0386] Em algumas modalidades, a região Ligante A compreende um primeiro polipeptídeo de domínio CH3 e a região Ligante B compreende um segundo polipeptídeo de domínio CH3, os primeiro e segundo polipeptídeos de domínio CH3 compreendendo, independentemente, modificações de aminoácidos comparado com um polipeptídeo de domínio CH3 de tipo selvagem, em que o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende modificações de aminoácidos nas posições T350, L351, F405 e Y407 e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende modificações de aminoácidos nas posições T350, T366, K392 e T394, em que a modificação de aminoácidos na posição T350 é T350V, T350I, T350L ou T350M; a modificação de aminoácidos na posição L351 é L351Y; a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, F405V, F405T ou F405S; a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, Y407A ou Y407I; a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366L, T366I, T366V ou T366M, a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392F, K392L ou K392M e a modificação de aminoácidos na posição T394 é T394W e em que a numeração de resíduos de aminoácidos está de acordo com o índice EU, conforme apresentado em Kabat.

[0387] Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392M ou K392L. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição T350 é T350V. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma ou mais modificações de aminoácidos selecionadas a partir de Q347R e uma de S400R ou S400E. Em algumas modalidades, o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma ou mais modificações de aminoácidos selecionadas a partir de L351 Y, K360E e uma de N390R, N390D ou N390E. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma ou mais modificações de aminoácidos selecionadas a partir de Q347R e uma de S400R ou S400E e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma ou mais modificações de aminoácidos selecionadas a partir de L351Y, K360E e uma de N390R, N390D ou N390E. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição T350 é T350V. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366L ou T366I. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é e Y407V, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366L

ou T366I e a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392M ou K392L. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400E, F405V e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390R, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351 Y, S400E, F405T e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390R, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400E, F405S e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390R, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400E, F405A e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, T366L, N390R, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos Q347R, T350V, L351Y, S400E, F405A e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, K360E,

T366L, N390R, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400R, F405A e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390D, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400R, F405A e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390E, K392M e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400E, F405A e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390R, K392L e T394W. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, L351Y, S400E, F405A e Y407V e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende as modificações de aminoácidos T350V, T366L, N390R, K392F e T394W.

[0388] Em algumas modalidades, um heteromultímero isolado que compreende um domínio CH3 heterodimérico que compreende um primeiro polipeptídeo de domínio CH3 e um segundo polipeptídeo de domínio CH3, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreendendo modificações de aminoácidos nas

posições F405 e Y407 e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreendendo modificações de aminoácidos nas posições T366 e T394, em que: (i) o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma modificação de aminoácidos na posição L351 e (ii) o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma modificação de aminoácidos na posição K392, em que a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, F405T, F405S ou F405V; e a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, Y407A, Y407L ou Y407I; a modificação de aminoácidos na posição T394 é T394W; a modificação de aminoácidos na posição L351 é L351Y; a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392L, K392M, K392V ou K392F e a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366I, T366L, T366M ou T366V, em que o domínio CH3 heterodimérico tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 70°C ou maior e uma pureza maior do que cerca de 90%, e em que a numeração de resíduos de aminoácidos está de acordo com o índice EU, conforme apresentado em Kabat.

[0389] Em algumas modalidades, a região Ligante A compreende um primeiro polipeptídeo de domínio CH3 e a região Ligante B compreende um segundo polipeptídeo de domínio CH3, em que o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende modificações de aminoácidos nas posições F405 e Y407 e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 que compreende amino

modificações de ácido nas posições T366 e T394, em que: (i) o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma modificação de aminoácidos na posição L351, e (ii) o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma modificação de aminoácidos na posição K392, em que a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, F405T, F405S ou F405V; e a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, Y407A, Y407L ou Y407I; a modificação de aminoácidos na posição T394 é T394W; a modificação de aminoácidos na posição L351 é L351Y; a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392L, K392M, K392V ou K392F e a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366I, T366L, T366M ou T366V, em que o domínio CH3 heterodimérico tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 70°C ou maior e uma pureza maior do que cerca de 90% e em que a numeração de resíduos de aminoácidos está de acordo com o índice EU, conforme apresentado em Kabat. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366I ou T366L. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366I ou T366L e a modificação de aminoácidos na posição K392 é

K392L ou K392M. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366L e a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392M. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366L e a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392L. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366I e a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392M. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y407V, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366I e a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392L. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda uma modificação de aminoácidos na posição S400 selecionada a partir de S400D e S400E e o segundo polipeptídeo de domínio CH3 compreende ainda a modificação de aminoácidos N390R. Em algumas modalidades, a modificação de aminoácidos na posição F405 é F405A, a modificação de aminoácidos na posição Y407 é Y405V, a modificação de

aminoácidos na posição S400 é S400E, a modificação de aminoácidos na posição T366 é T366L e a modificação de aminoácidos na posição K392 é K392M.

[0390] Em algumas modalidades, o primeiro e segundo domínios CH3 modificados são compreendidos por uma construção Fc com base em uma imunoglobulina de tipo G (IgG). A IgG pode ser uma IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

[0391] Outras Regiões Ligante A e Regiões Ligante B que compreendem domínios CH3 variantes são descritas nas Patentes dos Estados Unidos N^{os} 9,499,634 e 9,562,109, cada uma das quais é incorporada por referência na íntegra.

[0392] Uma região Ligante A e uma região Ligante B podem ser fragmentos complementares de uma proteína, por exemplo, uma proteína de ocorrência natural, tal como albumina sérica humana. Em modalidades, uma da região Ligante A e da região Ligante B compreende um primeiro, por exemplo, um fragmento N-terminal da proteína, por exemplo, hSA, e o outro compreende um segundo, por exemplo, um fragmento C-terminal da proteína, por exemplo. Em uma modalidade, os fragmentos compreendem um fragmento N-terminal e um C-terminal. Em uma modalidade, os fragmentos compreendem dois fragmentos internos. Normalmente, os fragmentos não se sobrepõem. Em uma modalidade, o primeiro e segundo fragmentos, juntos, constituem toda a sequência da proteína

original, por exemplo, hSA. O primeiro fragmento fornece um N-terminal e um C-terminal para ligação, por exemplo, fusão, a outras sequências, por exemplo, sequências de R1, R2, R3 ou R4 (conforme definido aqui).

[0393] A região Ligante A e a região Ligante B podem ser derivadas do polipeptídeo de albumina. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de albumina é selecionado a partir do polipeptídeo de albumina sérica humana nativa e do polipeptídeo de aloalbumina humana. O polipeptídeo de albumina pode ser modificado de modo que a região Ligante A e a região Ligante B interajam uma com a outra para formar heterodímeros. Exemplos de polipeptídeos de albumina modificados são descritos nas Patentes dos Estados Unidos N^{os} 9,388,231 e 9,499,605, cada uma das quais é aqui incorporada por referência na íntegra.

[0394] Consequentemente, são fornecidas aqui proteínas heteromultiméricas multifuncionais da fórmula R1 --- Região Ligante A --- R2 e R3 --- Região Ligante B --- R4, em que a região Ligante A e a região Ligante B formam um heteromultímero. Em algumas modalidades, a região Ligante A compreende um primeiro polipeptídeo e a região Ligante B compreende um segundo polipeptídeo; em que cada um dos ditos primeiro e segundo polipeptídeos compreende uma sequência de aminoácidos que compreende um fragmento de um polipeptídeo

de albumina selecionado a partir do polipeptídeo de albumina sérica humana nativa e polipeptídeo de aloalbumina humana; em que os ditos primeiro e segundo polipeptídeos são obtidos por meio de segmentação do dito polipeptídeo de albumina em um sítio de segmentação, de modo que a segmentação resulte em uma eliminação de zero a 3 resíduos de aminoácidos no sítio de segmentação; em que o dito primeiro polipeptídeo compreende pelo menos uma mutação selecionada a partir de A194C, L198C, W214C, A217C, L331C e A335C e o dito segundo polipeptídeo compreende pelo menos uma mutação selecionada a partir de L331C, A335C, V343C, L346C, A350C, V455C e N458C; e em que os ditos primeiro e segundo polipeptídeos se auto-associam para formar uma estrutura quase nativa da forma monomérica do polipeptídeo de albumina.

[0395] Em algumas modalidades, o sítio de segmentação reside em um loop do polipeptídeo de albumina que tem uma área de superfície acessível a solvente (SASA) e contato limitado com o restante da estrutura da albumina, b) a segmentação resulta em uma interface complementar entre os polipeptídeos transportadores. Estes sítios de segmentação são descritos, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos Nº 9,388,231, a qual é aqui incorporada por referência na íntegra.

[0396] Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo compreende os resíduos 1-337 ou resíduos 1-293 do polipeptídeo de albumina com uma ou mais das mutações descritas aqui. Em algumas modalidades, o segundo polipeptídeo compreende resíduos 342-585 ou 304-585 do polipeptídeo de albumina com uma ou mais das mutações descritas aqui. Em algumas modalidades, o primeiro polipeptídeo compreende os resíduos 1-339, 1-300, 1-364, 1-441, 1-83, 1-171, 1-281, 1-293, 1-114, 1-337 ou 1-336 da proteína albumina. Em algumas modalidades, o segundo polipeptídeo compreende os resíduos 301-585, 365-585, 442-585, 85-585, 172-585, 282-585 ou 115-585, 304-585, 340-585 ou 342-585 da proteína albumina.

[0397] Em algumas modalidades, o primeiro e segundo polipeptídeos compreendem os resíduos da proteína albumina, conforme mostrado na tabela abaixo. A sequência da proteína albumina é descrita abaixo.

Resíduos do primeiro polipeptídeo	Resíduos do segundo polipeptídeo
1-300	301-585
1-364	365-585
1-441	442-585

1-83	85-585
1-171	172-585
1-281	282-585
1-114	115-585
1-339	340-585
1-337	342-585
1-293	304-585
1-336	342-585

[0398] Em algumas modalidades, o primeiro e segundo polipeptídeos compreendem um ligante que pode formar uma ligação covalente um com o outro, tal como uma ligação de dissulfeto. Um exemplo não limitativo do ligante é um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende GGGGS. O ligante pode ser fundido ao C-terminal do primeiro polipeptídeo e ao N-terminal do segundo polipeptídeo. O ligante também pode ser usado para fixar as porções descritas aqui sem anular a capacidade dos ligantes de formar uma ligação de dissulfeto. Em algumas modalidades, o primeiro e segundo polipeptídeos não compreendem um ligante que pode formar uma ligação covalente. Em algumas modalidades, o primeiro e segundo polipeptídeos têm as seguintes substituições.

Substituição no primeiro polipeptídeo	Substituição no segundo polipeptídeo
A217C	V343C
L331C	A350C
A217C	L346C
W214C	V343C
A335C	L346C
L198C	V455C
A217C	A335C
A217C	L331C
L198C	N458C
A194C	V455C

[0399] A sequência do polipeptídeo de albumina pode ser a sequência da albumina humana e é mostrada na forma de pós-proteína com os resíduos de sinalização do N-terminal (MKWVTFISLLFLFSSAYS RGVFRR) removidos:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESA
 ENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRP
 EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAC
 LLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT
 DLT KVHTECCHGDLLECADD RADLAKY ICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN

DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLLAKTYE
 TTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALLVRYTK
 KVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDR
 VTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE
 LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

(albumina humana)

[0400] Em algumas modalidades, a região Ligante A e a região Ligante B formam um heterodímero conforme descrito no presente documento.

[0401] Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende, no N-terminal, um anticorpo composto por F(ab')₂ em uma estrutura de Fc de IgG1 fundida com scFvs no C-terminal da estrutura da Fc de IgG. Em algumas modalidades, a estrutura da Fc de IgG é uma estrutura de Fc de IgG1. Em algumas modalidades, a estrutura de IgG1 é substituída por uma estrutura de IgG4, estrutura de IgG2 ou outra estrutura de IgG similar. As estruturas de IgG descritos neste parágrafo podem ser usados ao longo do presente pedido, em que uma região Fc é citada como parte do composto terapêutico. Assim, em algumas modalidades, o anticorpo composto de F(ab')₂ em uma estrutura de Fc de IgG1 pode ser um anticorpo anti-MAdCAM ou um anticorpo anti-PD-1 em uma Fc de IgG1 ou qualquer outra porção de alvejamento ou porção de ligação/modulação efetora fornecida aqui. Em algumas

modalidades, os segmentos scFV fundidos ao C-terminal podem ser um anticorpo anti-PD-1 se a região N-terminal for um anticorpo anti-MAdCAM ou anticorpo anti-MAdCAM se a região N-terminal for um anticorpo anti-PD-1. Neste exemplo não limitativo, o N-terminal pode ser a porção de alvejamento, tal como qualquer uma daquelas fornecidas aqui, e o C-terminal pode ser a porção de ligação/modulação efetora, tal como qualquer uma daquelas fornecidas aqui. Alternativamente, em algumas modalidades, o N-terminal pode ser a porção de ligação/modulação efetora, tal como qualquer uma daquelas fornecidas aqui, e o C-terminal pode ser a porção de alvejamento, tal como qualquer uma daquelas fornecidas aqui.

[0402] Em algumas modalidades, o N-terminal pode ser a porção de alvejamento, tal como qualquer uma daquelas fornecidas aqui e o C-terminal pode ser a porção de ligação/modulação efetora, tal como qualquer uma daquelas fornecidas aqui.

[0403] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende dois polipeptídeos que homodimerizam. Em algumas modalidades, o N-terminal do polipeptídeo compreende uma porção de ligação/modulação efetora que é fundida com um domínio Fc de IgG1 humana (por exemplo, domínios CH2 e/ou CH3). Em algumas modalidades, o C-terminal do domínio Fc é

outro ligante que é fundido à porção de alveamento. Assim, em algumas modalidades, a molécula pode ser representada usando a fórmula R1 --- Ligante A --- Região Fc --- Ligante B --- R2, em que R1 pode ser uma porção de ligação/modulação efetora, R2 é uma porção de alveamento, o Ligante A e o Ligante B são ligantes independentes, conforme fornecido aqui. Em algumas modalidades, o Ligante 1 e o Ligante 2 são diferentes.

[0404] Em algumas modalidades, a molécula pode ser representada usando a fórmula R1 --- Ligante A --- Região Fc --- Ligante B --- R2, em que R1 pode ser uma porção de alveamento, R2 é uma porção de ligação/modulação efetora, o Ligante A e o Ligante B são ligantes independentes, conforme fornecido no presente documento. Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B são diferentes. Os ligantes podem ser escolhidos dentre os exemplos não limitativos fornecidos aqui. Em algumas modalidades, R1 e R2 são independentemente selecionados a partir dos domínios de anticorpo F(ab')₂ e scFV. Em algumas modalidades, R1 e R2 são diferentes domínios de anticorpo. Em algumas modalidades, o scFV está na orientação do domínio VL-VH.

[0405] Em algumas modalidades, o composto terapêutico é um anticorpo biespecífico. Em algumas modalidades, os

anticorpos biespecíficos são compostos de quatro cadeias polipeptídicas que compreendem o seguinte:

Cadeia 1: nt-VH1-CH1-CH2-CH3-Ligante A-scFv [VL2-Ligante B-VH2]-ct

Cadeia 2: nt-VH1-CH1-CH2-CH3-Ligante A-scFv [VL2-Ligante B-VH2]-ct

Cadeia 3: nt-VL1-CL-ct

Cadeia 4: nt-VL1-CL-ct,

em que as cadeias 1 e 2 são idênticas entre si e as cadeias 3 e 4 são idênticas entre si,

em que a cadeia 1 forma um homodímero com a cadeia 2; e as cadeias 3 e 4 se associam às cadeias 1 e 2. Isto é, quando cada cadeia leve se associa a cada cadeia pesada, VL1 se associa à VH1 e CL se associa à CH1 para formar duas unidades Fab funcionais. Sem estar preso a nenhuma teoria em particular, cada unidade de scFv é intrinsecamente funcional, uma vez que VL2 e VH2 são ligadas juntas de forma covalente com um ligante conforme fornecido aqui (por exemplo, GGGGSG (SEQ ID NO: 23), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22) ou GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) As sequências do Ligante A e do Ligante B, que são independentes umas das outras, podem ser iguais ou diferentes e conforme descrito ao longo do presente pedido. Assim, em algumas modalidades, o Ligante A compreende GGGGS (SEQ ID NO: 23), ou duas

repetições GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) ou GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22). Em algumas modalidades, o Ligante B compreende GGGGS (SEQ ID NO: 23), ou duas repetições da mesma, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) ou GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22). O scFv pode estar posicionado na orientação NT-VH2-VL2-CT ou NT-VL2-VH2-CT. NT ou nt significa N-terminal e CT ou ct significa C-terminal da proteína. CH1, CH2 e CH3 são os domínios da região Fc de IgG e CL significa cadeia leve constante, que pode ser a cadeia leve da família capa ou lambda. As outras definições representam o modo conforme normalmente empregado na técnica.

[0406] Em algumas modalidades, os domínios VH1 e VL1 são derivados da molécula efetora e os domínios VH2 e VL2 são derivados da porção de alvejamento. Em algumas modalidades, os domínios VH1 e VL1 são derivados de uma porção de alvejamento e os domínios VH2 e VL2 são derivados de uma porção de ligação/modulação efetora.

[0407] Em algumas modalidades, os domínios VH1 e VL1 são derivados de um anticorpo anti-PD-1 e os domínios VH2 e VL2 são derivados de um anticorpo anti-MAdCAM. Em algumas modalidades, os domínios VH1 e VL1 são derivados de um anticorpo anti-MAdCAM e os domínios VH2 e VL2 são derivados de um anticorpo anti-PD-1.

[0408] Em algumas modalidades, o Ligante A compreende 1, 2, 3, 4 ou 5 repetições GGGGS (SEQ ID NO: 23). Em algumas modalidades, o Ligante B compreende 1, 2, 3, 4 ou 5 repetições GGGGS (SEQ ID NO: 23). Para evitar dúvidas, as sequências do Ligante A e do Ligante B, usadas ao longo do presente pedido, são independentes umas das outras. Portanto, em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B podem ser iguais ou diferentes. Em algumas modalidades, o Ligante A compreende GGGGS (SEQ ID NO: 23), ou duas repetições da mesma, GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) ou GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22). Em algumas modalidades, o Ligante B compreende GGGGS (SEQ ID NO: 23) ou duas repetições GGGSGGGSSGGGS (SEQ ID NO: 30) ou GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22).

[0409] Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Em algumas modalidades, a cadeia leve e pesada começa no N-terminal com o domínio VH de uma porção de alvejamento seguido pelo domínio CH1 de uma IgG1 humana, o qual é fundido a uma região Fc (por exemplo, CH2-CH3) de IgG1 humana. Em algumas modalidades, o C-terminal da região Fc é fundido a um ligante conforme fornecido aqui tal como, sem limitação, GGGGS (SEQ ID NO: 23), ou duas ou três repetições da mesma, ou GGGSGGGSSGGGS (SEQ ID NO: 22). O ligante pode, então, ser

fundido a uma porção de ligação/modulação efetora, tal como qualquer uma das porções efetoras fornecidas no presente documento. Os polipeptídeos podem homodimerizar porque, através de homodimerização da cadeia pesada, isto resulta em um composto terapêutico com duas porções efetoras, tal como dois anticorpos anti-PD-1. Nesta orientação, a porção de alvejamento é um formato de IgG, há dois braços Fab que reconhecem cada parceiro de ligação da porção de alvejamento, por exemplo, MAdCAM, que são ligados pela porção de alvejamento anti-MAdCAM.

[0410] Em algumas modalidades, se o composto terapêutico compreender uma porção Fc, o domínio Fc (porção) sofrerá mutações para tornar a região Fc "sem efeito", ou seja, incapaz de se ligar a FcRs. Mutações que tornam as regiões Fc sem efeito são conhecidas. Em algumas modalidades, as mutações na região Fc, as quais estão de acordo com o sistema de numeração conhecido, são selecionadas a partir do grupo que consiste em: K322A, L234A, L235A, G237A, L234F, L235E, N297, P331 S ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, as mutações Fc compreendem uma mutação em L234 e/ou L235 e/ou G237. Em algumas modalidades, as mutações Fc compreendem mutações L234A e/ou L235A, as quais podem ser denominadas como mutações LALA. Em alguns casos, as mutações Fc compreendem as mutações L234A, L235A e G237A.

[0411] São descritos aqui polipeptídeos da região Ligante, peptídeos terapêuticos e ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos (por exemplo, compostos terapêuticos), vetores que compreendem as sequências de ácidos nucleicos e células que compreendem os ácidos nucleicos ou vetores.

[0412] Os compostos terapêuticos podem compreender uma pluralidade de porções de alvejamento específicas. Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma pluralidade de porções de alvejamento específicas, uma pluralidade de cópias de uma porção de alvejamento doadora específica ou uma pluralidade de porções de alvejamento específicas para tecido. Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma primeira e uma segunda porção de alvejamento específica para doador, por exemplo, uma primeira porção de alvejamento específica para doador específica para um primeiro alvo do doador e uma segunda porção de alvejamento específica para doador específica para um segundo alvo do doador, por exemplo, em que o primeiro e segundo alvo são encontrados no mesmo tecido do doador. Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende, por exemplo, uma primeira porção de alvejamento específica para um alvo específico para tecido e uma segunda porção de alvejamento específica para um segundo alvo, por exemplo, em

que o primeiro e segundo alvos são encontrados no mesmo ou em outro tecido alvo.

[0413] Em algumas modalidades, um composto terapêutico compreende uma pluralidade de porções de ligação/modulação efetoras, cada uma compreendendo uma porção de ligação/modulação ICIM, o número de porções de ligação/modulação ICIM sendo suficientemente baixo de modo que o agrupamento da porção de ligação/modulação ICIM nas células imunes (na ausência de ligação ao alvo) seja minimizado, por exemplo, para evitar agonismo sistêmico das células imunes na ausência de ligação do composto terapêutico ao alvo.

POLYPEPTÍDEOS DERIVADOS DE REFERÊNCIA, POR EXEMPLO,
POLYPEPTÍDEOS HUMANOS

[0414] Em algumas modalidades, um componente de uma molécula terapêutica é derivado de ou com base em uma molécula de referência, por exemplo, no caso de uma molécula terapêutica para uso em seres humanos, de um polipeptídeo humano de ocorrência natural. Por exemplo, em algumas modalidades, toda ou parte de uma molécula de CD39, uma molécula de CD73, um ligante de molécula na superfície celular, uma porção de alvejamento específica para doador, uma molécula de ligação a ligantes efetora, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC,

uma molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune, uma molécula contraligante de molécula inibidora, uma porção de ligação/modulação SM, uma porção de alvejamento específica, uma molécula para alvejamento específica, uma molécula de ligação a ligante alvo ou uma porção de alvejamento específica para tecido, pode ser com base ou derivada de um polipeptídeo humano de ocorrência natural. Por exemplo, uma molécula de PD-L1 pode ser com base ou derivada de uma sequência de PD-L1 humana.

[0415] Em algumas modalidades, um componente do composto terapêutico, por exemplo, uma molécula de PD-L1:

a) compreende toda ou uma porção, por exemplo, de uma porção ativa de uma forma de ocorrência natural do polipeptídeo humano;

b) compreende toda ou uma parte, por exemplo, de uma porção ativa de um polipeptídeo humano que tem uma sequência que aparece em um banco de dados, por exemplo, banco de dados GenBank, em 11 de janeiro de 2017, uma forma natural do polipeptídeo humano que não está associado a um estado patológico;

c) compreende um polipeptídeo humano que tem uma sequência que não difere em mais de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 ou 30 resíduos de aminoácidos em relação a uma sequência de a) ou b);

d) compreende um polipeptídeo humano que tem uma sequência que não difere em mais de 1, 2, 3, 4, 5 10, 20 ou 30% de seus resíduos de aminoácidos em relação à sequência de a) ou b);

e) compreende um polipeptídeo humano que tem uma sequência que não difere substancialmente de uma sequência de a) ou b); ou

f) compreende um polipeptídeo humano que tem uma sequência de c), d) ou e) que não difere substancialmente quanto a uma atividade biológica, por exemplo, capacidade de melhorar ou inibir uma resposta imune, de um polipeptídeo humano que tem a sequência de a) ou b).

[0416] Em algumas modalidades, os compostos terapêuticos podem compreender uma pluralidade de porções de ligação/modulação efectoras. Por exemplo, um composto terapêutico pode compreender dois ou mais dos seguintes selecionados a partir de:

- (a) uma porção de ligação/modulação ICIM;
- (b) uma porção de ligação/modulação IIC;
- (c) uma porção de ligação/modulação SM ou
- (d) uma porção de ligação/modulação ICSM.

[0417] Em algumas modalidades, por exemplo, um composto terapêutico pode compreender uma pluralidade, por exemplo, duas porções de ligação/modulação ICIM (as quais

são iguais ou diferentes); a título de exemplo, duas que ativam ou são agonistas de PD-1; uma pluralidade, por exemplo, duas porções de ligação/modulação IIC (as quais são iguais ou diferentes); uma pluralidade, por exemplo, duas porções de ligação/modulação SM (as quais são iguais ou diferentes) ou uma pluralidade, por exemplo, duas, porções de ligação/modulação ICSM (as quais são iguais ou diferentes). Em algumas modalidades, o composto terapêutico pode compreender uma porção de ligação/modulação ICIM e uma porção de ligação/modulação IIC; uma porção de ligação/modulação ICIM e uma porção de ligação/modulação SM; uma porção de ligação/modulação IIC e uma porção de ligação/modulação SM, uma porção de ligação/modulação ICIM e uma porção de ligação/modulação ICSM; uma porção de ligação/modulação IIC e uma porção de ligação/modulação ICSM; ou uma porção de ligação/modulação ICSM e uma porção de ligação/modulação SM. Em algumas modalidades, o composto terapêutico compreende uma pluralidade de porções para alvejamento. Em algumas modalidades, as porções para alvejamento podem ser iguais ou diferentes.

COMPOSIÇÕES E KITS FARMACÊUTICOS

[0418] Em outro aspecto, as presentes modalidades fornecem composições, por exemplo, composições farmaceuticamente aceitáveis, as quais incluem um composto

terapêutico descrito aqui formulado juntamente com um carreador farmacêuticamente aceitável. Conforme usado aqui, "carreador farmacêuticamente aceitável" inclui todo e qualquer solvente, meio de dispersão, agentes isotônicos, agentes de retardo de absorção e assim por diante que sejam fisiologicamente compatíveis.

[0419] O carreador pode ser adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parentérica, retal, local, oftálmica, tópica, espinhal ou epidérmica (por exemplo, através de injeção ou infusão). Conforme usado aqui, o termo "carreador" significa um diluente, adjuvante ou excipiente com o qual um composto é administrado. Em algumas modalidades, os carreadores farmacêuticos também podem ser líquidos, tal como água e óleos, incluindo aqueles de origem animal, vegetal ou sintética, tais como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e assim por diante. Os carreadores farmacêuticos também podem ser solução salina, goma acácia, gelatina, pasta de amido, talco, queratina, sílica coloidal, ureia e assim por diante. Além disso, podem ser usados agentes auxiliares, estabilizantes, espessantes, lubrificantes e corantes. Os carreadores podem ser usados em composições farmacêuticas que compreendem os compostos terapêuticos fornecidos aqui.

[0420] As composições e compostos das modalidades fornecidas aqui podem estar em uma variedade de formas. Isto inclui, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semissólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e para infusão), dispersões ou suspensões, lipossomos e supositórios. A forma preferida depende do modo de administração pretendido e da aplicação terapêutica. As composições típicas estão na forma de soluções injetáveis ou para infusão. Em algumas modalidades, o modo de administração é parentérico (por exemplo, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular). Em algumas modalidades, a molécula terapêutica é administrada por meio de infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade, a molécula terapêutica é administrada por meio de injeção intramuscular ou subcutânea. Em outra modalidade, a molécula terapêutica é administrada localmente, por exemplo, por meio de injeção ou aplicação tópica, a um local alvo.

[0421] As frases "administração parentérica" e "administrada pela via parentérica", conforme usado aqui, significam modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular,

intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

[0422] As composições terapêuticas devem ser, normalmente, estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossomo ou outra estrutura ordenada adequada para molécula terapêutica em alta concentração. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo (isto é, molécula terapêutica) na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de esterilização por filtração. Em geral, as dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários dentre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e liofilização, os quais produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente filtrada estéril. A fluidez adequada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um

revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de uma dispersão e pelo uso de tensoativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser alcançada pela inclusão, na composição, de um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[0423] Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, a via e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Em determinadas modalidades, o composto ativo pode ser preparado com um carreador que protegerá o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem ser usados polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, tais como acetato de etileno vinila, polianidretos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0424] Em determinadas modalidades, um composto terapêutico pode ser administrado por via oral, por exemplo,

com um diluente inerte ou um carreador comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) também pode ser encerrado em uma cápsula de gelatina dura ou mole, prensado em comprimidos ou incorporado diretamente na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas e assim por diante. Para administrar um composto através de outra via de administração que não parentérica, pode ser necessário revestir o composto com ou coadministrar o composto com um material para impedir sua inativação. As composições terapêuticas também podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica.

[0425] Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta ideal desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parentéricas na forma de unidades de dosagem para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. Forma de unidades de dosagem, conforme usado aqui,

se refere a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem é orientada e diretamente dependente (a) das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico específico a ser alcançado; e (b) das limitações inerentes à técnica de composição de tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

[0426] Uma faixa exemplificativa e não limitativa para uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um composto terapêutico é de 0,1 a 30 mg/kg, mais preferivelmente 1 a 25 mg/kg. As dosagens e regimes terapêuticos do composto terapêutico podem ser determinados por aqueles versados na técnica. Em determinadas modalidades, o composto terapêutico é administrado por meio de injeção (por exemplo, através da via subcutânea ou intravenosa) em uma dose de cerca de 1 a 40 mg/kg, por exemplo, 1 a 30 mg/kg, por exemplo, cerca de 5 a 25 mg/kg, cerca de 10 a 20 mg/kg, cerca de 1 a 5 mg/kg, 1 a 10 mg/kg, 5 a 15 mg/kg, 10 a 20 mg/kg, 15 a 25 mg/kg ou cerca de 3 mg/kg. O esquema de dosagem pode variar, por exemplo, uma

vez por semana a uma vez a cada 2, 3 ou 4 semanas. Em uma modalidade, o composto terapêutico é administrado em uma dose de cerca de 10 a 20 mg/kg a cada duas semanas. O composto terapêutico pode ser administrado por meio de infusão intravenosa em uma taxa de mais de 20 mg/min, por exemplo, 20-40 mg/min e, tipicamente, maior do que ou igual a 40 mg/min, para atingir uma dose de cerca de 35 a 440 mg/m², tipicamente cerca de 70 a 310 mg/m² e, mais tipicamente, cerca de 110 a 130 mg/m². Em modalidades, a taxa de infusão de cerca de 110 a 130 mg/m² atinge um nível de cerca de 3 mg/kg. Em outras modalidades, o composto terapêutico pode ser administrado por meio de infusão intravenosa em uma taxa abaixo de 10 mg/min, por exemplo, menor ou igual a 5 mg/min, para atingir uma dose de cerca de 1 a 100 mg/m², por exemplo, cerca de 5 a 50 mg/m², cerca de 7 a 25 mg/m² ou cerca de 10 mg/m². Em algumas modalidades, o composto terapêutico é infundido durante um período de cerca de 30 min. Deve ser observado que os valores de dosagem podem variar de acordo com o tipo e a gravidade da condição a ser aliviada. Deve ser entendido ainda que, para qualquer indivíduo em particular, regimes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo, de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições,

e que as faixas de dosagem fornecidas aqui são apenas exemplificativas e não se destinam a limitar o escopo ou a prática da composição reivindicada.

[0427] As composições farmacêuticas podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de uma molécula terapêutica. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula terapêutica pode variar de acordo com fatores tais como o estado patológico, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do composto terapêutico de provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais de uma molécula terapêutica são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" inibe preferencialmente um parâmetro mensurável, por exemplo, ataque imune, em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 40%, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 60% e, mais preferivelmente, pelo menos cerca de 80% em relação a indivíduos não tratados. A capacidade de um composto de inibir um parâmetro mensurável, por exemplo, ataque imune,

pode ser avaliada em um sistema de modelo animal preditivo de eficácia na rejeição de transplantes ou transtornos autoimunes. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada ao examinar a capacidade de inibição do composto, tal como inibição *in vitro*, por meio de ensaios conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0428] Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática é usada em indivíduos antes ou em um estágio inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz sendo menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[0429] Também dentro do escopo das modalidades está um kit que compreende um composto terapêutico descrito aqui. O kit pode incluir um ou mais de outros elementos, incluindo: instruções de uso; outros reagentes, por exemplo, um marcador, um agente terapêutico ou um agente útil para quelar ou de outra forma acoplar uma molécula terapêutica a um marcador ou outro agente terapêutico ou uma composição radioprotetora; dispositivos ou outros materiais para preparar uma molécula terapêutica para administração; carreadores farmacologicamente aceitáveis; e dispositivos ou outros materiais para administração a um indivíduo.

[0430] Em algumas modalidades, as modalidades fornecidas aqui também incluem, porém sem limitações:

[0431] 1. Um composto terapêutico caracterizado por compreender:

[0432] i) uma porção de alvejamento específica selecionada a partir de:

[0433] a) uma porção de alvejamento específica para doador a qual, por exemplo, se liga preferencialmente a um alvo do doador; ou

[0434] b) uma porção de alvejamento específica para tecido a qual, por exemplo, se liga preferencialmente ao tecido alvo de um indivíduo; e

[0435] ii) uma porção de ligação/modulação efetora selecionada a partir de:

[0436] (a) uma porção de ligação/modulação de molécula inibidora de células imunes (porção de ligação/modulação ICIM);

[0437] (b) uma porção de ligação/modulação de célula imune imunossupressora (porção de ligação/modulação IIC); ou

[0438] (c) uma porção de ligação/modulação efetora que, como parte de um composto terapêutico, promove um microambiente local imunossupressor, por exemplo, ao fornecer, na proximidade do alvo, uma substância que inibe

ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo (porção de ligação/modulação SM).

[0439] 2. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora se liga e ativa diretamente um receptor inibidor.

[0440] 3. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 2, em que a porção de ligação/modulação efetora é uma molécula inibidora do ponto de verificação imune.

[0441] 4. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-3, em que a a porção de ligação/modulação efetora é expressa por uma célula imune.

[0442] 5. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 4, em que a célula imune contribui para uma resposta imune indesejada.

[0443] 6. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 4 ou 5, em que a célula imune causa uma patologia.

[0444] 7. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a capacidade da molécula terapêutica de ser agonista da molécula à qual a porção de ligação/modulação efetora se liga é maior, por exemplo, 2, 5, 10, 100, 500 ou 1.000 vezes maior, quando o composto terapêutico está ligado a um alvo através da porção de alvejamento do que quando o

composto terapêutico não está ligado ao alvo através da porção de alvejamento.

[0445] 8. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 1-7 em que, quando ele se liga como um monômero (ou ligação quando o composto terapêutico não é multimerizado) ao seu ligante cognato, por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune, ele não é agonista, ou é substancialmente agonista, do ligante cognato.

[0446] 9. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 1-8, em que em uma dose terapeuticamente eficaz do composto terapêutico, há uma ação agonista sistêmica significativa da molécula à qual a porção de ligação/modulação efetora se liga.

[0447] 10. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 1-9, em que em uma dose terapeuticamente eficaz do composto terapêutico, a é agonista ação da molécula à qual a porção de ligação/modulação efetora se liga ocorre substancialmente apenas em um local de destino ao qual a porção de alvejamento se liga a.

[0448] 11. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 1-9, em que a ligação do composto terapêutico ao seu ligante cognato, por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune, não inibe ou não inibe

substancialmente a ligação de um contraligante endógeno ao ligante cognato, por exemplo, uma molécula inibidora do ponto de verificação imune.

[0449] 12. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 1-11, em que a ligação da porção de ligação/modulação efetora ao seu ligante cognato inibe a ligação de um contraligante endógeno ao ligante cognato da porção de ligação/modulação efetora em menos de 60, 50, 40, 30, 20, 10 ou 5%.

[0450] 14. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 1-11, em que a ligação da porção de ligação/modulação efetora ao ligante cognato, não resulta substancialmente em antagonismo do ligante cognato da molécula de ligação/modulação efetora.

[0451] 15. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICIM.

[0452] 16. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 15, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune.

[0453] 17. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 16, em que a molécula contraligante da molécula imune inibidora compreende uma molécula de PD-L1.

[0454] 18. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 15, em que a ICIM é aquela em que a molécula contraligante da molécula imune inibidora se acopla a uma molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata selecionada a partir de PD-1, KIR2DL4, LILRB 1, LILRB ou CTLA-4.

[0455] 19. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 18, em que a ICIM é um anticorpo.

[0456] 20. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 18, em que a ICIM compreende um anticorpo que se liga à PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB ou CTLA-4.

[0457] 21. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 20, em que o anticorpo é um anticorpo que se liga à PD-1.

[0458] 22. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 20, em que o anticorpo é um anticorpo que se liga à PD-1 e é um agonista de PD-1.

[0459] 23. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 20, em que o anticorpo é um anticorpo que se liga à PD-1 e é um agonista de PD-1 quando amarrado na localização alvo.

[0460] 24. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 16, em que a molécula contraligante da molécula imune inibidora compreende uma molécula HLA-G.

[0461] 25. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 15, em que a ICIM é aquela em que a molécula contraligante da molécula imune inibidora se acopla a uma molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata selecionada a partir de PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB ou CTLA-4.

[0462] 26. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 15, em que a molécula contraligante da molécula inibidora imune inibidora se acopla a uma molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata selecionada a partir da Tabela 1.

[0463] 27. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 15 em que, quando a ligação como um monômero, à sua molécula inibidora do ponto de verificação imune cognata, ele não é agonista, ou é substancialmente agonista, da molécula inibidora do ponto de verificação imune.

[0464] 28. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 15, em que o contraligante inibidor da molécula imune tem pelo menos 60, 70, 80, 90, 95, 99 ou 100% de homologia com um ligante da molécula inibidora do ponto de verificação imune de ocorrência natural.

[0465] 29 O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação ICIM que compreende uma molécula de anticorpo funcional para uma molécula inibidora na superfície celular.

[0466] 30. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a molécula inibidora na superfície celular é uma molécula inibidora do ponto de verificação imune.

[0467] 31. O composto, de acordo com a modalidade 30, em que a molécula inibidora do ponto de verificação imune é selecionada a partir de PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB2, CTLA-4 ou selecionada a partir da Tabela 1.

[0468] 32. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o nível de supressão imune sistêmica em uma dose terapeuticamente eficaz do composto terapêutico é menor do que aquele fornecido pelo padrão de atendimento com um imunossupressor sistêmico (se relevante) ou é menor do que aquele fornecido por uma quantidade equimolar de molécula de ligação/modulação efetora livre (não como componente de um composto terapêutico).

[0469] 33. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1-32, em que o nível de ativação imune sistêmica,

por exemplo, em uma dose terapeuticamente eficaz do composto terapêutico, é menor do que aquele indicado por uma quantidade equimolar de molécula de ligação/modulação efetora livre (não como um componente de um composto terapêutico).

[0470] 34. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-33, que compreende ainda uma segunda porção de ligação/modulação efetora.

[0471] 35. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 34, em que a segunda porção de ligação/modulação efetora se liga a um alvo diferente da porção de ligação/modulação efetora.

[0472] 36. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 34 ou 35, em que a segunda porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação IIC.

[0473] Composto terapêutico, de acordo com as modalidades 34 ou 35, em que a segunda porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação SM.

[0474] 37. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação IIC.

[0475] 38. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação IIC que aumenta, recruta ou acumula uma célula imune imunossupressora na localização alvo.

[0476] 39. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende um ligante da molécula na superfície celular que se liga, ou se liga especificamente, a uma molécula na superfície celular em uma célula imune imunossupressora.

[0477] 40. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma molécula ligante da molécula na superfície celular que se liga, ou se liga especificamente, a uma molécula na superfície celular em uma célula imune imunossupressora.

[0478] 41. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma molécula de anticorpo que se liga uma molécula na superfície celular em uma célula imune imunossupressora.

[0479] 42. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 38-41, em que a célula imune imunossupressora compreende uma célula T reguladora, tal como uma célula T reguladora Foxp3+ CD25+.

[0480] 43. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-42, em que a porção de ligação/modulação efetora se liga à GARP e, por exemplo, compreende uma molécula de anticorpo que se liga à GARP em células imunossupressoras que expressam GARP, por exemplo, Tregs.

[0481] 44. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende uma porção de ligação/modulação SM.

[0482] 45. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 44, em que a porção de ligação/modulação SM promove um microambiente local imunossupressor.

[0483] 46. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44 e 45, em que a porção de ligação da molécula efetora aumenta a disponibilidade, por exemplo, ao aumentar a concentração ou quantidade local de uma substância que inibe a função da célula imune, por exemplo, uma substância que inibe a ativação de uma célula imune ou a função de uma célula imune ativada.

[0484] 47. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-46, em que a porção de ligação da molécula efetora se liga e acumula uma substância solúvel, por exemplo, uma substância endógena ou exógena, que tem função imunossupressora.

[0485] 48. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-47, em que a porção de ligação à molécula efetora diminui a disponibilidade, por exemplo, ao diminuir a concentração ou quantidade local, ou capturar, uma substância que promove a função celular imune, por exemplo, uma substância que promove a ativação de uma célula imune ou a função de uma célula imune ativada.

[0486] 49. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-48, em que a porção de ligação/modulação SM promove um microambiente local imunossupressor, por exemplo, ao fornecer, na proximidade, do alvo uma substância que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo.

[0487] 50. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-49, em que a porção de ligação/modulação SM compreende uma molécula que inibe ou minimiza o ataque pelo sistema imune do alvo.

[0488] 51. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-50, em que a porção de ligação/modulação SM se liga e/ou acumula uma substância solúvel, por exemplo, uma substância endógena ou exógena, que tem função imunossupressora.

[0489] 52. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-51, em que a porção de

ligação/modulação SM se liga e/ou inibe, captura, degrada ou, de outra forma, neutraliza uma substância, por exemplo, uma substância solúvel, normalmente uma substância solúvel endógena, que promove o ataque imune.

[0490] 53. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-52, em que a porção de ligação da molécula efetora diminui a disponibilidade de ATP ou AMP.

[0491] 54. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-53, em que a porção de ligação/modulação SM se liga, ou compreende, uma substância, por exemplo, CD39 ou CD73, que esgota um componente que promove a função da célula efetora imune, por exemplo, ATP ou AMP.

[0492] 55. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-54, em que a porção de ligação/modulação SM compreende uma molécula CD39.

[0493] 56. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-54, em que a porção de ligação/modulação SM compreende uma molécula CD73.

[0494] 57. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-54, em que a porção de ligação/modulação SM compreende uma molécula anti-CD39.

[0495] 58. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-54, em que a porção de ligação/modulação SM compreende uma molécula de anticorpo anti-CD73.

[0496] 59. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44 a 54, em que a porção de ligação da molécula efetora compreende uma substância imunossupressora, por exemplo, um fragmento de uma proteína imunossupressora.

[0497] 60. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 44-54, em que a porção de ligação/modulação SM compreende a molécula de fosfatase alcalina.

[0498] 61. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que o composto tem a fórmula, a partir do N-terminal para o C-terminal:

R1 --- Região Ligante A --- R2 ou R3 --- Região Ligante B -
-- R4,

em que:

R1, R2, R3 e R4, cada um independentemente, compreendem uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC, ou uma porção de ligação/modulação SM; uma porção de alvejamento específica; ou está

ausente; contanto que uma porção de ligação/modulação efetora e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0499] 62. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que cada uma das regiões Ligante A e Ligante B compreende uma região Fc.

[0500] 63. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que um de R1 e R2 é um anticorpo anti-PD-1 e um de R1 e R2 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0501] 64. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que R1 é um anticorpo anti-PD-1 e R2 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0502] 65. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que R1 é um anticorpo anti-MAdCAM e R2 é um anticorpo anti-PD-1.

[0503] 66. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que um de R3 e R4 é um anticorpo anti-PD-1 e um de R3 e R4 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0504] 67. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que R3 é um anticorpo anti-PD-1 e R4 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0505] 68. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que R3 é um anticorpo anti-MAdCAM e R4 é um anticorpo anti-PD-1.

[0506] 69. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 61-68, em que o ligante está ausente.

[0507] 70. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 61-68, em que o ligante é uma região Fc.

[0508] 71. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 61-68, em que o ligante é um ligante de glicina/serina, tal como 1, 2, 3, 4 ou 5 repetições GGGGS (SEQ ID NO: 23).

[0509] 72. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 61-68, em que o ligante compreende uma região Fc e um ligante de glicina/serina, tal como 1, 2, 3, 4 ou 5 repetições de GGGGS (SEQ ID NO: 23).

[0510] 73. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 61-72, em que o anticorpo PD-1 é um agonista de PD-1.

[0511] 74. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional (um agonista de PD-1); e R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0512] 75. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 73 e 74, em que:

R1 e R3 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, um anticorpo contra um antígeno tecidual; e R2 e R4 compreendem, independentemente, uma molécula de anticorpo anti-PD-1 funcional (um agonista de PD-1).

[0513] 76. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 73 e 74, em que:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma porção de ligação/modulação SM que modula, por exemplo, se liga e inibe, captura, degrada ou de outra forma neutraliza uma substância, por exemplo, uma molécula solúvel que modula uma resposta imune, por exemplo, ATP ou AMP, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma porção de ligação/modulação SM e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0514] 77. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que:

R1 e R3 compreendem, independentemente, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0515] 78. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 77, em que:

R1 e R3 compreendem, cada um, uma molécula de CD39; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0516] 79. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 61 ou 77, em que:

R1 e R3 compreendem, cada um, uma molécula de CD73; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0517] 80. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de CD39 e o outro compreende uma molécula de CD73; e R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0518] 81. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 61, em que:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma molécula de HLA-G; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente;

contanto que uma molécula de HLA-G e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0519] 82. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 61 ou 81, em que:

R1 e R3 compreendem uma molécula de HLG-A; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0520] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0521] 83. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81 e 82, em que:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0522] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-

emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0523] 84. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81 e 82, em que:

R1 e R3 compreendem, cada um, uma molécula de anticorpo anti-KIR2DL4 agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0524] Em algumas modalidades, o Ligante A e o Ligante B compreendem porções Fc (por exemplo, porções Fc de auto-emparelhamento ou porções Fc sem auto-emparelhamento, ou sem auto-emparelhamento substancial).

[0525] 85. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-LILRB2 agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0526] 86. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

R1 e R3 compreendem uma molécula de anticorpo anti-KG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0527] 87. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

um de R1 e R3 compreende uma primeira porção escolhida, e a outra compreende uma porção diferente escolhida dentre: uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 antagonista, uma molécula de anticorpo anti-KG2A agonista e uma molécula de anticorpo anti-NKG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0528] 88. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 antagonista e o outro compreende uma molécula de anticorpo anti-KG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0529] 89. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de anticorpo anti-LILRB1 antagonista e o outro compreende uma molécula de anticorpo anti-NKG2A agonista; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0530] 89A. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente: uma molécula de muteína de IL-2; uma porção de alvejamento específica; ou está ausente; e

contanto que uma molécula de muteína de IL-2 e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0531] 89B. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89A, em que:

R1 e R3 compreendem uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0532] 89C. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89A ou 89B, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à MAdCAM, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-MAdCAM, ou uma molécula de ligação à GITR, por exemplo, uma molécula

de anticorpo anti-GITR, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0533] 89D. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89A ou 89B, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GARP, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GARP, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0534] 89E. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89A ou 89B, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GARP, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GARP, ou uma molécula de ligação à GITR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GITR, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0535] 89F. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89A ou 89B, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GARP, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GARP, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0536] 89G. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89A ou 89B, em que:

um de R1 e R3 compreende uma molécula de ligação à GITR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-GITR, e o outro compreende uma molécula de muteína de IL-2; e

R2 e R4 compreendem, independentemente, porções para alvejamento específicas, por exemplo, moléculas de scFv contra um antígeno tecidual.

[0537] 89H. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 1, em que o composto é um polipeptídeo ou proteína, em que o polipeptídeo ou proteína compreende uma porção de alvejamento que se liga a uma célula alvo e uma porção de ligação/modulação efetora, em que a porção de ligação/modulação efetora é um polipeptídeo de IL-2 mutante (muteína de IL-2).

[0538] 89I. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89H, em que a porção de alvejamento compreende um anticorpo que se liga a uma proteína alvo sobre a superfície de uma célula alvo.

[0539] 89J. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89I, em que o anticorpo é um anticorpo que se liga à MAdCAM, OAT1 (SLC22A6), OCT2 (SLC22A2), FXD2, TSPAN7, DPP6, HEPACAM2, TMEM27 ou GPR119.

[0540] 89K. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89I, em que a proteína de IL-2 se liga a um receptor expresso por uma célula imune.

[0541] 89L. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89I, em que a célula imune contribui para uma resposta imune indesejada.

[0542] 89M. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89L, em que a célula imune causa uma patologia da doença.

[0543] 89N. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89M, em que a porção de alvejamento compreende um anticorpo anti-MAdCAM.

[0544] 89O. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89H, em que o composto tem a fórmula, a partir do N-terminal para o C-terminal:

R1 --- Região Ligante A --- R2 ou R3 --- Região Ligante B -
 -- R4,

em que:

R1, R2, R3 e R4 compreendem, cada um independentemente, a porção de ligação/modulação efetora, a porção de alvejamento ou está ausente.

[0545] 89P. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89O, em que cada uma das regiões Ligante A e Ligante B compreende uma região Fc.

[0546] 89Q. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89O ou 89P ou, em que um de R1 e R2 é a muteína de IL-2 e um de R1 e R2 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0547] 89R. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89O, 89P ou 89Q, em que R1 é a muteína de IL-2 e R2 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0548] 89S. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89O, 89P ou 89Q, em que R1 é um anticorpo anti-MAdCAM e R2 é um anticorpo anti-PD-1.

[0549] 89T. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89O, 89P ou 89Q, em que um de R3 e R4 é a muteína de IL-2 e um de R3 e R4 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0550] 89U. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89O, 89P ou 89Q, em que R3 é a muteína de IL-2 e R4 é um anticorpo anti-MAdCAM.

[0551] 89V. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89O, 89P ou 89Q, em que R3 é um anticorpo anti-MAdCAM e um R4 é a muteína de IL-2.

[0552] 89W. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89O-89W, em que o ligante está ausente.

[0553] 89X. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89O-89W, em que o ligante é ou compreende uma região Fc.

[0554] 89Y. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89O-89W, em que o ligante compreende um ligante de glicina/serina.

[0555] 89X. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89O-89W, em que o ligante compreende uma sequência GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS ou GGGGS.

[0556] 89Y. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89H, em que a muteína de IL-2 compreende uma sequência de IL-2 de SEQ ID NO: 6, em que o peptídeo compreende uma mutação em uma posição que corresponde à posição 53, 56, 80 ou 118 de SEQ ID NO: 6

[0557] 89Z. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89Y, em que a muteína de IL-2 compreende uma sequência de IL-2 de SEQ ID NO: 6, em

que o peptídeo compreende uma mutação em uma posição que corresponde à posição 53, 56, 80 ou 118 de SEQ ID NO: 6.

[0558] 89AA. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89Y, em que a mutação é uma mutação de L para I na posição 53, 56, 80 ou 118.

[0559] 89BB. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89Z, em que a mutação é uma mutação de L para I na posição 53, 56, 80 ou 118.

[0560] 89CC. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89BB, em que a muteína de IL-2 compreende ainda uma mutação em uma ou mais posições de 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 e 125 correspondentes àquelas posições em SEQ ID NO: 6.

[0561] 89DD. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89CC, em que a muteína de IL-2 compreende ainda uma mutação em uma ou mais das posições E15, H16, Q22, D84, E95 ou Q126 ou 1, 2, 3, 4, 5 ou cada uma das posições E15, H16, Q22, D84, E95 ou Q126 é de tipo selvagem.

[0562] 89EE. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89DD, em que a mutação na muteína é uma ou mais de E15Q, H16N, Q22E, D84N, E95Q ou Q126E.

[0563] 89FF. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89EE, em que a muteína compreende uma mutação N29S em SEQ ID NO: 6.

[0564] 89GG. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89FF, em que a muteína compreende uma mutação Y31 S ou Y51H.

[0565] 89HH. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89GG, em que a muteína compreende uma mutação K35R.

[0566] 89II. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89HH, em que a muteína compreende uma mutação T37A.

[0567] 89JJ. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89II, em que a muteína compreende uma mutação K48E.

[0568] 89KK. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89JJ, em que a muteína compreende uma mutação V69A.

[0569] 89LL. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89KK, em que a muteína compreende uma mutação N71R.

[0570] 89MM. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89LL, em que a muteína compreende uma mutação Q74P.

[0571] 89NN. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89MM, em que a muteína compreende uma mutação N88D ou N88R.

[0572] 89OO. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89NN, em que a muteína compreende uma mutação C125A ou C125S.

[0573] 89PP. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89H-89OO, em que a muteína de IL-2 é fundida ou ligada a um peptídeo de Fc.

[0574] 89PP1. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89PP, em que o peptídeo de Fc compreende uma mutação em uma ou mais das posições L234, L247, L235, L248, G237 e G250.

[0575] 89PP2. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89PP1, em que a mutação é L para A ou G para A.

[0576] 89PP3. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89PP1, em que o peptídeo de Fc compreende mutações L247A, L248A e/ou G250A (numeração de Kabat).

[0577] 89PP4. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89PP1, em que o peptídeo de Fc compreende uma mutação L234A, uma mutação L235A e/ou uma mutação G237A (numeração EU).

[0578] 89QQ. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89H, em que o composto compreende um polipeptídeo

que compreende uma primeira cadeia e uma segunda cadeia que formam o polipeptídeo, em que:

a primeira cadeia compreende:

V_H-H_c-Ligante-Ci, em que V_H é um domínio pesado variável que se liga à célula alvo com um domínio V_L da segunda cadeia; H_c é uma cadeia pesada de anticorpo que compreende domínios CH1-CH2-CH3, o ligante é um ligante de glicina/serina e Ci é a IL-2 humana fundida ou ligada a uma proteína Fc na orientação N-terminal ou C-terminal; e

a segunda cadeia compreende:

V_L-L_c, em que V_L é um domínio variável de cadeia leve que se liga à célula alvo com o domínio V_H da primeira cadeia e o domínio L_c é um domínio de cadeia leve CK.

[0579] 89QQ1. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ, em que os domínios V_H e V_L são domínios variáveis anti-MAdCAM que se ligam à MAdCAM expressa em uma célula.

[0580] 89QQ2. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ ou 89QQ1, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação em uma posição que corresponde à posição 53, 56, 80 ou 118 de SEQ ID NO: 6.

[0581] 89QQ3. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ2, em que a mutação é uma mutação de L para I na posição 53, 56, 80 ou 118.

[0582] 89QQ4. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89QQ2 ou 89QQ3, em que a muteína compreende ainda uma mutação em uma posição que corresponde à posição 69, 75, 88 e/ou 125, ou qualquer combinação dos mesmos.

[0583] 89QQ5. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 89QQ2 ou 89QQ3, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação selecionada a partir do grupo que consiste em: uma de L53I, L56I, L80I e LI 181 e as mutações V69A, Q74P, N88D ou N88R e opcionalmente C125A ou C125S.

[0584] 89QQ6. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ5, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação L53I.

[0585] 89QQ7. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ5, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação L56I.

[0586] 89QQ8. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ5, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação L80I.

[0587] 89QQ9. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ5, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação L118I.

[0588] 89TQ10. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 89QQ5, em que a muteína de IL-2 não compreende nenhuma outra mutação.

[0589] 89TQ11. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89QQ-89QQ10, em que a proteína Fc compreende mutações L247A, L248A e G250A ou uma mutação L234A, uma mutação L235A e/ou uma mutação G237A de acordo com a numeração de KABAT.

[0590] 89TQ12. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89QQ-89QQ11, em que o ligante compreende uma sequência GGGGSGGGGSGGGGS ou GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

[0591] 89TQ13. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 89QQ-89QQ11, em que o polipeptídeo compreende um peptídeo de Fc que compreende uma sequência descrita aqui.

[0592] 90. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma molécula de anticorpo anti-BCR, por exemplo, uma molécula de anticorpo anti-BCR antagonista, um compreende uma molécula de anticorpo anti FCRL e uma porção de alvejamento específica.

[0593] 91. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 90, em que:

a molécula anti-FCRL compreende: uma molécula de anticorpo anti-FCRL, por exemplo, uma molécula de anticorpo

anti-FCRL agonista, dirigida ao FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 ou FCRL6.

[0594] 92. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 81-84, em que:

R1, R2, R3 e R4 compreendem independentemente:

i) uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC ou uma porção de ligação/modulação SM, que minimiza ou inibe a atividade, expansão ou função das células T (uma porção de ligação/modulação efetora de células T);

ii) uma porção de ligação/modulação efetora, por exemplo, uma porção de ligação/modulação ICIM, uma porção de ligação/modulação IIC ou uma porção de ligação/modulação SM que minimiza ou inibe a atividade, expansão ou função das células B (uma porção de ligação/modulação efetora de células B);

iii) uma porção de alvejamento específica; ou

iv) está ausente; contanto que uma porção de ligação/modulação efetora de células T, uma porção de ligação/modulação efetora de células B e uma porção de alvejamento específica estejam presentes.

[0595] 93. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 92, em que:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende um anticorpo anti-PD-1 agonista e um compreende uma molécula de HLA-G.

[0596] 94. Composto terapêutico, de acordo com as modalidades 92-93, em que:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma porção de ligação/modulação SM, por exemplo, uma molécula de CD39 ou uma molécula de CD73.

[0597] 95. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 92-94, em que:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende uma entidade que se liga, ativa ou mantém uma célula imune reguladora, por exemplo, uma célula Treg ou uma célula Breg.

[0598] 96. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 92-95, em que:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende um anticorpo anti-PD-1 agonista ou um compreende uma molécula de HLA-G.

[0599] 97. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 96, em que:

um de R1, R2, R3 e R4 compreende um anticorpo anti-PD-1 agonista, um compreende uma molécula HLA-G e um compreende a molécula de CD39 ou uma molécula de CD73.

[0600] 98. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-97, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende um polipeptídeo.

[0601] 99. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-98, em que a porção de ligação/modulação efetora compreende um polipeptídeo que tem pelo menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 150, 200 ou 250 resíduos de aminoácidos.

[0602] 100. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-99, em que a porção de ligação/modulação efetora tem um peso molecular de 5, 10, 15, 20 ou 40 Kd.

[0603] 101. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-100, em que a porção de ligação/modulação efetora não compreende um inibidor da expressão de apolipoproteína CIII, proteína quinase A, Src quinase ou Betal integrina.

[0604] 102. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-100, em que a porção de ligação/modulação efetora não compreende um inibidor da atividade de apolipoproteína CIII, proteína quinase A, Src quinase ou Betal integrina.

[0605] 103. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico um tecido selecionado a partir de pulmão, pele, pâncreas, retina,

próstata, ovário, linfonodo, glândula adrenal, fígado ou tecido intestinal.

[0606] 104. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico células tubulares, por exemplo, células epiteliais tubulares proximais.

[0607] 105. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico TIE-2, APN, TEM4, TEM6, ICAM-1, receptor de nucleolina P2Z, Trk-A, FLJ10849, HSPA12B, APP ou OX-45.

[0608] 106. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico uma proteína expressa luminalmente.

[0609] 107. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o alvo do doador não compreende um alvo específico para coração.

[0610] 108. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido pulmonar.

[0611] 109. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido renal.

[0612] 110. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido pulmonar e do pâncreas.

[0613] 111. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido intestinal.

[0614] 112. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido da próstata.

[0615] 113. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido cerebral.

[0616] 114. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico CD71.

[0617] 115. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico CD90.

[0618] 116. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico MAdCAM.

[0619] 117. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico a albumina.

[0620] 118. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico a anidrase carbônica IV.

[0621] 119. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico ZG16-p.

[0622] 120. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico a dipeptidil peptidase IV.

[0623] 121. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico a superfície luminal de uma membrana celular endotelial vascular.

[0624] 121. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido cardíaco.

[0625] 122. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto

terapêutico não tem como alvo específico um tumor, tumor sólido ou região vascular de um tumor sólido.

[0626] 123. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido cutâneo.

[0627] 124. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico o tecido epidérmico.

[0628] 125. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico a membrana basal.

[0629] 126. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico um polipeptídeo Dsg.

[0630] 127. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico Dsg1.

[0631] 128. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico Dsg3.

[0632] 129. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico BP180.

[0633] 130. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não tem como alvo específico a desmogleína.

[0634] 131. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende um modulador de complemento, por exemplo, um inibidor de complemento tal como, porém sem limitações, aqueles descritos na Patente norte-americana Nº US 8,454,963, a qual é aqui incorporada por referência na íntegra.

[0635] 133. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende um agente de imagiologia.

[0636] 134. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende um agente de imagiologia selecionado a partir do grupo de: um agente radioativo, um radioisótopo, um radiofármaco, um agente de contraste, uma nanopartícula; uma enzima, um grupo protético, um material fluorescente, um material luminescente e um material bioluminescente tais como, porém sem limitações, aqueles descritos na Patente norte-americana Nº US 8,815,235, a qual é aqui incorporada por referência na íntegra.

[0637] 135. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende um radionuclídeo tal como, porém sem limitações, aqueles descritos na Patente norte-americana Nº US 6,232,287, a qual é aqui incorporada por referência na íntegra.

[0638] 136. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, o qual não é internalizado por uma célula doadora à qual ele se liga.

[0639] 137. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não entra na célula que é alvejada pela porção de alvejamento específica.

[0640] 138. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não mata a célula que é alvejada pela porção de alvejamento específica.

[0641] 139. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não entra na célula à qual a porção de ligação/modulação efetora se liga.

[0642] 140. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto

terapêutico não mata a célula à qual a porção de ligação/modulação efetora se liga.

[0643] 141. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende um peptídeo ou polipeptídeo autoantigênico.

[0644] 142. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende um peptídeo ou polipeptídeo autoantigênico, por exemplo, não compreende um peptídeo ou polipeptídeo contra o qual o indivíduo tem autoanticorpos.

[0645] 143. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende uma molécula de anticorpo derivada de um mamífero, por exemplo, um ser humano, que tem um transtorno autoimune.

[0646] 144. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende uma molécula de anticorpo derivada de um mamífero, por exemplo, um ser humano, que tem PV mucocutâneo agudo.

[0647] 145. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende uma molécula de anticorpo

derivada de um mamífero, por exemplo, um ser humano, que tem síndrome de Goodpasture.

[0648] 146. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-101, em que o composto terapêutico não compreende uma molécula de anticorpo derivada de um mamífero, por exemplo, um ser humano, que tem pênfigo vulgar.

[0649] 141. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-146, que compreende uma porção de alveamento específica para doador.

[0650] 142. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141, que se localiza preferencialmente em um tecido do doador transplantado em oposição ao tecido de um receptor.

[0651] 143. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 141-142, em que a porção de alveamento específica para doador confere privilégio imunológico específico para localização a um tecido de transplante, por exemplo, um órgão, de um doador.

[0652] 144. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 141-143, em que a porção de alveamento específica para doador se liga a um produto, por exemplo, um polipeptídeo, de um alelo presente em uma localização no

doador, alelo que não está presente na localização no receptor.

[0653] 145. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-144, em que a porção de alveamento específica para doador se liga preferencialmente a um alelo de um gene expresso no tecido do doador, por exemplo, um tecido de transplante, por exemplo, um órgão, comparado com um alelo do gene expresso no tecido do indivíduo.

[0654] 146. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 141-145, em que a porção de alveamento específica para doador tem uma afinidade de ligação por um alelo de um gene expresso no tecido do doador, por exemplo, um tecido de transplante, por exemplo, um órgão, que é pelo menos 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 vezes maior do que sua afinidade por um alelo do gene expresso no tecido do indivíduo.

[0655] 147. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-146, em que a porção de alveamento específica para doador se liga ao produto, por exemplo, um polipeptídeo de um alelo presente em uma localização no doador, alelo que não está presente na localização no receptor.

[0656] 148. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-147, em que a ligação é suficientemente específica a qual, por exemplo, em uma dose clinicamente eficaz do composto terapêutico, ocorre supressão imune sistêmica indesejada, substancial ou clinicamente inaceitável.

[0657] 149. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-148, em que o composto terapêutico se acumula na localização alvo, por exemplo, ligação da porção de alvejamento específica para doador resulta em acúmulo do composto terapêutico na localização alvo.

[0658] 150. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-149, em que a porção de alvejamento específica para doador se liga a um produto de um alelo de um *locus* selecionado a partir da Tabela 2, por exemplo, o *locus* de HLA, por exemplo, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ ou HLA-DR, alelo o qual está presente no doador, mas não no receptor.

[0659] 151. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-150, em que a porção de alvejamento específica para doador se liga a um alelo de HLA-A, um alelo de HLA-B, um alelo de HLA-C, um alelo de HLA-D, um alelo de HLA-DQ ou um alelo de HLA-DR.

[0660] 152. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-151, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, terá ou precisará de um transplante.

[0661] 153. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 152, em que o transplante compreende todo ou parte de um órgão, por exemplo, um fígado, rim, coração, pâncreas, timo, pele ou pulmão.

[0662] 154. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-153, em que a porção de alveamento específica para doador compreende uma molécula de anticorpo.

[0663] 155. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 141-153, em que a porção de alveamento específica para doador compreende um polipeptídeo de ligação específica ao alvo ou uma molécula de ligação a ligante alvo.

[0664] 156. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-155, que compreende uma porção de alveamento específica para tecido.

[0665] 157. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 156, em que a porção de alveamento específica para tecido é uma molécula que se liga especificamente à MAdCAM.

[0666] 158. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 156, em que a porção de alvejamento específica para tecido é um anticorpo que se liga especificamente à MAdCAM.

[0667] 159. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-158, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, um transtorno autoimune, por exemplo, um transtorno autoimune descrito no presente documento.

[0668] 160. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-159, em que o composto terapêutico se acumula na localização alvo, por exemplo, a ligação da porção de alvejamento específica para tecido resulta em acúmulo do composto terapêutico na localização alvo.

[0669] 161. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-160, em que o composto terapêutico que localiza preferencialmente um tecido alvo em oposição a outro tecido de um indivíduo.

[0670] 162. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-161, em que o composto terapêutico confere privilégio imunológico específico para localização a um tecido alvo indivíduo, por exemplo, um

tecido alvo que sofre, ou corre risco, ou risco elevado, de ataque imunológico indesejado, por exemplo, em um transtorno autoimune.

[0671] 163. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-161, em que a porção de alvejamento específica para tecido, como um componente do composto terapêutico, se liga preferencialmente a um tecido alvo indivíduo que sofre ataque imunológico indesejado, por exemplo, em um transtorno autoimune.

[0672] 164. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-163, em que uma porção de alvejamento específica para tecido se liga ao produto, por exemplo, um polipeptídeo, que não está presente fora do tecido alvo, ou está presente em níveis suficientemente baixos que, em concentrações terapêuticas da molécula terapêutica, níveis inaceitáveis de supressão imune estão ausentes ou substancialmente ausentes.

[0673] 165. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-164, em que a porção de alvejamento específica para tecido se liga um produto, ou local em um produto, que é mais abundante no tecido alvo do que no tecido não alvo.

[0674] 166. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-165, em que o composto

terapêutico se liga um produto, ou um local em um produto, que está presente ou substancialmente de forma exclusiva no tecido alvo.

[0675] 167. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-166, em que o produto, ou local em um produto, ao qual a porção de alveamento específica se liga está suficientemente limitada ao tecido alvo de modo que, no nível terapeuticamente eficaz do composto terapêutico, o indivíduo não sofre um nível inaceitável, por exemplo, um nível clinicamente significativo, de supressão imune sistêmica.

[0676] 168. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-167, em que o composto terapêutico se liga preferencialmente a um tecido ou antígeno do tecido alvo, por exemplo, tem uma afinidade de ligação pelo tecido ou antígeno alvo que é maior para o antígeno ou tecido alvo, por exemplo, pelo menos 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 vezes maior do que sua afinidade pelo tecido ou antígeno não alvo presente fora do tecido alvo.

[0677] 169. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-168, em que a porção de alveamento específica para tecido se liga a um produto, por exemplo, um produto polipeptídico ou local em um produto,

presente em um local pré-selecionado, por exemplo, um local de resposta imune indesejada em um transtorno autoimune.

[0678] 170. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-169, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter diabetes de tipo 1.

[0679] 171. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-170, em que o tecido alvo compreende tecido pancreático, por exemplo, ilhotas pancreáticas ou células beta pancreáticas, tecido intestinal (por exemplo, células endoteliais intestinais), tecido renal (por exemplo, células epiteliais renais) ou tecido hepático (por exemplo, células epiteliais hepáticas).

[0680] 172. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-171, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado dentre aqueles descritos aqui, tais como aqueles listados na Tabela 3, por exemplo, SEZ6L2, LRP11, DISP2, SLC30A8, FXYP2, TSPAN7 ou TMEM27.

[0681] 173. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-168, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que

tem, ou está em risco ou risco elevado de ter esclerose múltipla.

[0682] 174. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 173, em que o tecido alvo compreende tecido do CNS, bainha de mielina ou bainha de mielina de oligodendrócitos.

[0683] 175. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 173-174, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado dentre aqueles descritos aqui e inclui, porém sem limitações, a Tabela 3, por exemplo, MOG, PLP ou MBP.

[0684] 176. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-168, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter cardiomiosite.

[0685] 177. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 176, em que o tecido alvo compreende cardiomiócitos, monócitos, macrófagos ou células mieloides.

[0686] 178. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 176-177, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo conforme descrito aqui, incluindo dugugina, mas não limitado

àqueles selecionados a partir da Tabela 3, por exemplo, SIRPA (CD172a).

[0687] 179. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-168, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, doença inflamatória intestinal, hepatite autoimune (AIH); Colangite Esclerosante Primária (PSC); Esclerose Biliar Primária; (PBC); ou transplante.

[0688] 180. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-168, em que o indivíduo com tem, está em risco ou risco elevado de ter, doença de Crohn ou colite ulcerativa.

[0689] 181. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 179 ou 180, em que o tecido alvo compreende células intestinais, tais como células epiteliais intestinais, ou células hepáticas, tais como células epiteliais hepáticas.

[0690] 182. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 179-181, em que a porção de ligação/modulação efetora se liga um polipeptídeo conforme descrito aqui incluindo, porém sem limitações, aqueles selecionados a partir da Tabela 3, por exemplo, PD-1.

[0691] 182. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 179-181, em que a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo conforme descrito aqui incluindo, porém sem limitações, MAdCAM.

[0692] 183. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-168, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, artrite reumatoide.

[0693] 184. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 183, em que o tecido alvo compreende cardiomiócitos, monócitos, macrófagos ou células mieloides.

[0694] 185. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 183 ou 184, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado a partir da Tabela 3, por exemplo, SIRPA (CD172a).

[0695] 186. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-185, em que a porção de alvejamento específica para tecido compreende uma molécula de anticorpo.

[0696] 187. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-185, em que a porção de alvejamento específica para tecido compreende um

polipeptídeo de ligação específica para o alvo ou uma molécula de ligação a ligante alvo.

[0697] 188. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 156-185, em que a porção de alvejamento específica para tecido compreende um polipeptídeo de ligação específica para o alvo que se liga à MAdCAM.

[0698] 189. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-188, em que o composto terapêutico se liga a uma molécula na superfície celular de uma célula efetora do sistema imune, por exemplo, uma célula T, célula B, célula NK ou outra célula imune, célula a qual propaga uma resposta pró-imune.

[0699] 190. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-189, em que o composto terapêutico reduz a capacidade de uma célula efetora imune, por exemplo, uma célula T, célula B, célula NK ou outra célula imune, de propagar uma resposta pró-imune.

[0700] 191. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-190, em que a porção de alvejamento específica tem como alvo um alvo de mamífero, por exemplo, um polipeptídeo de mamífero, e a porção de ligação/modulação efetora se liga/modula um componente imune

de mamífero, por exemplo, uma célula imune humana, por exemplo, uma célula B, célula T ou macrófago de mamífero.

[0701] 192. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-191, em que a porção de alvejamento específica tem como alvo um alvo humano, por exemplo, um polipeptídeo humano, e a porção de ligação/modulação efetora se liga/modula um componente imune humano, por exemplo, uma célula imune humana, por exemplo, uma célula B humana, célula T ou macrófago.

[0702] 193. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-192, em que o composto terapêutico está configurado para uso em um ser humano.

[0703] 194. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-191, em que o composto terapêutico está configurado para uso em um mamífero não humano.

[0704] 195. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-194, em que o composto terapêutico, por exemplo, a porção de ligação/modulação efetora, compreende um agonista de PD-1.

[0705] 195.1 O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades anteriores, em que o composto terapêutico compreende uma muteína de IL-2 de SEQ ID NO: 15,

em que a muteína compreende uma mutação na posição 73, 76, 100 ou 138.

[0706] 195.2 O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 195.1, em que a mutação é uma mutação de L para I na posição 73, 76, 100 ou 138.

[0707] 195.3. O composto terapêutico, de acordo com as modalidades 195.1 ou 195.2, em que a muteína de IL-2 compreende ainda uma mutação em uma ou mais das posições 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 e 145.

[0708] 195.4. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.3, em que a muteína compreende ainda uma mutação em uma ou mais das posições E35, H36, Q42, D424, E1 15 ou Q146 ou 1, 2, 3, 4, 5 ou cada uma de E35, H36, Q42, D104, E115 ou Q146 é de tipo selvagem.

[0709] 195.5. O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 195.4, em que a mutação é um ou mais de E35Q, H36N, Q42E, D104N, E115Q ou Q146E.

[0710] 195.6. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.5, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação N49S.

[0711] 195.7. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.6, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação Y51S ou Y51H.

[0712] 195.8. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.7, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação K55R.

[0713] 195.9. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.8, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação T57A.

[0714] 195.10. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.8, em que a muteína de IL-2 compreende uma mutação K68E, uma mutação V89A (V69A), uma mutação N91R (N71R), uma mutação Q94P ou Q74P, uma mutação (N88D) ou uma mutação N108R (N88R), C145A (C125A) ou C145S (C125S).

[0715] 195.11. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.10, em que o composto terapêutico compreende uma muteína de IL-2 de SEQ ID NO: 6, em que a muteína compreende uma mutação na posição 53, 56, 80 ou 118 e uma ou mais das mutações citadas nas modalidades 195.1-195.10.

[0716] 195.12 O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 195.1-195.11, em que a muteína de IL-2 é fundida ou ligada a um peptídeo de Fc.

[0717] 195.13 O composto terapêutico, de acordo com a modalidade 195.12, em que o peptídeo de Fc compreende uma

mutação em uma ou mais das posições L234, L247, L235, L248, G237 e G250 (numeração EU).

[0718] 196. Um método de tratamento de um indivíduo que tem doença inflamatória intestinal, o método compreendendo administrar um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13.13 ao indivíduo para tratar a doença inflamatória intestinal.

[0719] 197. O método, de acordo com a modalidade 196, em que o indivíduo que tem doença inflamatória intestinal tem doença de Crohn.

[0720] 198. O método, de acordo com a modalidade 196, em que o indivíduo que tem doença inflamatória intestinal tem colite ulcerativa.

[0721] 199. Um método de tratamento de um indivíduo que tem hepatite autoimune, o método compreendendo administrar um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13 ao indivíduo para tratar a hepatite autoimune.

[0722] 200. Método de tratamento de colangite esclerosante primária, o método compreendendo administrar um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13 ao indivíduo para tratar a colangite esclerosante primária.

[0723] 201. Um método de tratamento de diabetes tipo 1, o método compreendendo administrar um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13, tratando, assim, o indivíduo que tem diabetes de tipo 1.

[0724] 202. Um método de tratamento de um indivíduo que sofreu transplante que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13 ao indivíduo, tratando, assim, um indivíduo que sofreu transplante (receptor).

[0725] 203. Um método de tratamento de GVHD em um indivíduo que sofreu transplante de um tecido do doador que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13 ao indivíduo.

[0726] 204. O método, de acordo com a modalidade 203, em que o composto terapêutico é administrado ao indivíduo antes de receber o transplante; antes de desenvolver um sintoma de GVHD; após ou concomitantemente à recepção do transplante; ou após ou concorrentemente ao desenvolvimento de um sintoma de GVHD.

[0727] 205. Um método de tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, um

transtorno autoimune que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13, tratando, assim, o indivíduo.

[0728] 206. O método, de acordo com a modalidade 205, em que o indivíduo recebeu, receberá ou precisará de tecido de aloenxerto de doador.

[0729] 207. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-206, em que o tecido do doador compreende um órgão sólido, por exemplo, um fígado, rim, coração, pâncreas, timo ou pulmão.

[0730] 208. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-206, em que o tecido do doador compreende todo ou parte de um órgão, por exemplo, um fígado, rim, coração, pâncreas, timo ou pulmão.

[0731] 209. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-206, em que o tecido do doador compreende pele.

[0732] 210. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-206, em que o tecido do doador não compreende pele.

[0733] 211. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-210, em que o tecido do doador apresenta ou

expressa um produto de um alelo de um *locus*, alelo o qual não está presente ou expresso no indivíduo.

[0734] 212. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-210, em que o tecido do doador apresenta ou expressa um produto de um alelo de um *locus* selecionado a partir da Tabela 2, por exemplo, o *locus* de HLA, por exemplo, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ ou HLA-DR, alelo o qual não está presente ou expresso no indivíduo.

[0735] 213. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 205-212, que compreende introduzir o tecido de transplante no indivíduo.

[0736] 214. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-213, que compreende monitorar o indivíduo quanto à inativação de células imunes (por exemplo, monitorar a ação agonista indesejada de uma molécula do ponto de verificação inibidora imune) em um local distante do local alvo, por exemplo, na circulação periférica ou no sistema linfático.

[0737] 215. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-214, que compreende monitorar o indivíduo quanto à ativação da célula imune (por exemplo, para monitorar a ação antagonista indesejada de uma molécula do ponto de verificação imune) em um local distante do local

alvo, por exemplo, na circulação periférica ou no sistema linfático.

[0738] 216. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-215, em que a resposta ao resultado do monitoramento é selecionar um curso de tratamento para o indivíduo, por exemplo, aumentar a dose do composto terapêutico, diminuir a dose do composto terapêutico, continuar o tratamento com o composto terapêutico sem alteração da dose.

[0739] 217. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-216, que compreende administrar o composto de acordo com as modalidades 1-195.13 ao receptor.

[0740] 218. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-216, em que a administração compreende administração sistêmica, por exemplo, no sistema circulatório periférico.

[0741] 219. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-216, em que a administração compreende administração local, por exemplo, no tecido alvo, no tecido do doador ou no local em que o tecido alvo ou o tecido do doador está ou estará localizado.

[0742] 220. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 219, que compreende administrar o composto

terapêutico ao receptor antes de introdução do tecido do doador no receptor.

[0743] 221. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 219, que compreende administrar o composto terapêutico ao receptor após introdução do tecido do doador no receptor.

[0744] 222. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 213, que compreende administrar o composto terapêutico ao receptor simultaneamente com a introdução do tecido do doador no receptor.

[0745] 223. O método, de acordo com a modalidade 213, que compreende contatar o composto terapêutico com o tecido do doador antes de introdução do tecido do doador no receptor.

[0746] 224. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 213, que compreende fornecer o composto terapêutico ao indivíduo, em que o tecido de transplante foi contatado com o composto terapêutico antes de introdução no indivíduo.

[0747] 225. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 213, que compreende contatar o composto terapêutico com o tecido do doador após introdução do tecido do doador no receptor, por exemplo, através de administração local no tecido do doador.

[0748] 226. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-226, caracterizado por compreender administrar um composto terapêutico conforme fornecido aqui, de modo que níveis terapêuticos estejam presentes por pelo menos 1, 5, 10, 14 ou 28 dias, por exemplo, dias consecutivos ou não consecutivos.

[0749] 227. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-226, em que o indivíduo não recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento.

[0750] 228. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-226, em que o indivíduo não recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60 ou 90 dias antes de administração inicial do composto terapêutico.

[0751] 229. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 213, em que o indivíduo não recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60 ou 90 dias antes de introdução do tecido de transplante.

[0752] 230. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-229, em que o indivíduo não recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias após administração inicial do composto terapêutico.

[0753] 231. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-229, em que o indivíduo não recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias após introdução do transplante.

[0754] 232. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-231, que compreende administrar um agente imunossupressor que não é para alvejamento ao indivíduo.

[0755] 233. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-232, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60 ou 90 dias antes de administração inicial do composto terapêutico.

[0756] 234. O método, de acordo com a modalidade 213, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60 ou 90 dias antes de introdução do tecido de transplante.

[0757] 235. O método, de acordo com a modalidade 234, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias após administração inicial do composto terapêutico.

[0758] 236. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-235, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alvejamento por pelo menos 1,

15, 30, 60, 90 ou 180 dias após introdução do tecido de transplante.

[0759] 237. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-235, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alveijamento antes de administração inicial do composto terapêutico, mas por não mais e 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias.

[0760] 238. O método, de acordo com a modalidade 213, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alveijamento antes de introdução do tecido de transplante, mas por não mais de 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias.

[0761] 239. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-238, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alveijamento após administração inicial do composto terapêutico, mas por não mais de 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias.

[0762] 240. O método, de acordo com a modalidade 213, em que o indivíduo recebeu um agente imunossupressor que não é para alveijamento após introdução do tecido de transplante, mas por não mais de 1, 15, 30, 60, 90 ou 180 dias.

[0763] 241. O método, de acordo com a modalidade 213, em que o indivíduo é monitorado quanto à rejeição do tecido de transplante.

[0764] 242. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-242, em que é selecionada uma dosagem de um agente imunossupressor que não é para alveijamento, ou em que, em resposta ao monitoramento, uma dosagem de um agente imunossupressor que não é para alveijamento é selecionada.

[0765] 243. O método, de acordo com a modalidade 242, em que a dosagem é administrada.

[0766] 244. O método, de acordo com a modalidade 243, em que a dosagem selecionada é zero, isto é, um agente imunossupressor que não é para alveijamento não é administrado.

[0767] 245. O método, de acordo com a modalidade 243, em que a dosagem selecionada é diferente de zero, isto é, um agente imunossupressor que não é para alveijamento é administrado.

[0768] 246. O método, de acordo com a modalidade 243, em que a dosagem é menor do que aquela que seria administrada na ausência de administração de um composto terapêutico.

[0769] 247. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-246, em que o indivíduo é um mamífero, por exemplo, um mamífero não humano.

[0770] 248. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-246, em que o indivíduo é um ser humano.

[0771] 249. O método, de acordo com a modalidade 213, em que o doador e o indivíduo são incompatíveis em um *locus* de HLA, por exemplo, um *locus* principal ou secundário.

[0772] 250. O método, de acordo com a modalidade 249, em que o indivíduo é um mamífero, por exemplo, um mamífero não humano.

[0773] 251. O método, de acordo com a modalidade 249, em que o indivíduo é um ser humano.

[0774] 252. Um método de tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, um transtorno autoimune que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13, deste modo, tratando o indivíduo.

[0775] 253. O método, de acordo com a modalidade 252, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes de início, ou antes de identificação do início, dos sintomas do transtorno autoimune.

[0776] 254. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-253, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após o início, ou após a identificação do início, dos sintomas do transtorno autoimune.

[0777] 255. O método, de acordo com as modalidades 252-254, em que o transtorno autoimune compreende diabetes de tipo 1.

[0778] 256. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-255, em que o tecido alvo compreende ilhotas pancreáticas ou células beta pancreáticas, tecido intestinal (por exemplo, células endoteliais intestinais), tecido renal (por exemplo, células epiteliais renais) ou tecido hepático (por exemplo, células epiteliais hepáticas).

[0779] 257. O composto terapêutico, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-256, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado a partir da Tabela 3, por exemplo, MADCAM, OAT1, OCT, DPP6, SEZ6L2, LRP11, DISP2, SLC30A8, FXD2, TSPAN7 ou TMEM27.

[0780] 258. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-257, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes de início, ou antes de identificação do início, dos sintomas de diabetes de tipo 1.

[0781] 259. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-258, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes ou antes de identificação do

indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0782] 260. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-259, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após o início, ou após a identificação do início, dos sintomas de diabetes de tipo 1.

[0783] 261. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-260, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após ou após a identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0784] 262. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-261, em que o composto terapêutico é um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13.

[0785] 263. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-257, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, esclerose múltipla.

[0786] 264. O método, de acordo com a modalidade 263, em que o tecido alvo compreende tecido do SNC, bainha de mielina ou bainha de mielina de oligodendrócitos.

[0787] 265. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 263 ou 264, em que a porção de ligação/modulação

efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado a partir da Tabela 3, por exemplo, um polipeptídeo de MOG, PLP ou MBP.

[0788] 266. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 263-265, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes de início, ou antes de identificação do início, dos sintomas de esclerose múltipla.

[0789] 267. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 263-265, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes ou antes de identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0790] 268. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 263-265, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após o início, ou após a identificação do início, dos sintomas de esclerose múltipla.

[0791] 269. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 263-265, caracterizado pelo fato de que a administração do composto terapêutico é iniciada após ou após a identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0792] 270. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 263-269, em que o composto terapêutico é um

composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13.

[0793] 271. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-257, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, cardiomiosite.

[0794] 272. O método, de acordo com a modalidade 271, em que o tecido alvo compreende cardiomiócitos, monócitos, macrófagos ou células mieloides.

[0795] 273. O método, de acordo com as modalidades 271 ou 272, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado a partir da Tabela 3, por exemplo, um polipeptídeo de SIRPA (CD172a).

[0796] 274. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 271-273, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes de início, ou antes de identificação do início, dos sintomas de cardiomiosite.

[0797] 275. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 271-273, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes ou antes de identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0798] 276. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 271-273, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após o início, ou após a identificação do início, dos sintomas de cardiomiosite.

[0799] 277. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 271-273, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após ou após a identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0800] 278. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 271-277, em que o composto terapêutico é um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13.

[0801] 279. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 252-257, em que o composto terapêutico é adequado para o tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, artrite reumatoide.

[0802] 280. O método, de acordo com a modalidade 279, em que o tecido alvo compreende cardiomiócitos, monócitos, macrófagos ou células mieloides.

[0803] 281. O método, de acordo com as modalidades 279 ou 280, em que a porção de ligação/modulação efetora ou a porção de alvejamento se liga a um polipeptídeo selecionado

a partir da Tabela 3, por exemplo, um polipeptídeo de SIRPA (CD172a).

[0804] 282. O método, de acordo com as modalidades 279-281, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes de início, ou antes de identificação do início, dos sintomas de artrite reumatoide.

[0805] 283. O método, de acordo com as modalidades 279-281, em que a administração do composto terapêutico é iniciada antes ou antes de identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0806] 284. O método, de acordo com as modalidades 279-281, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após o início, ou após a identificação do início, dos sintomas de artrite reumatoide.

[0807] 285. O método, de acordo com as modalidades 279-281, em que a administração do composto terapêutico é iniciada após ou após a identificação do indivíduo que tem uma característica ou sintoma pré-selecionado.

[0808] 286. O método, de acordo com as modalidades 279-285, em que o composto terapêutico é um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13.

[0809] 287. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-286, que compreende monitorar o indivíduo quanto à inativação de células imunes (por exemplo, para

monitorar a ação agonista indesejada de uma molécula do ponto de verificação inibidora imune) em um local distante do local alvo, por exemplo, na circulação periférica ou no sistema linfático.

[0810] 288. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-287, que compreende monitorar o indivíduo quanto à ativação da célula imune (por exemplo, monitorar a ação antagonista indesejada de uma molécula do ponto de verificação inibidora imune) em um local distante do local alvo, por exemplo, na circulação periférica ou no sistema linfático.

[0811] 289. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-288, em que a resposta ao resultado de monitoramento é selecionar um curso de tratamento para o indivíduo, por exemplo, aumentar a dose do composto terapêutico, diminuir a dose do composto terapêutico, continuar o tratamento com o composto terapêutico sem alteração da dose.

[0812] 290. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-289, em que o ataque autoimune do tecido alvo do indivíduo é monitorado.

[0813] 291. O método, de acordo com a modalidade 290 em que, em resposta ao monitoramento, uma dosagem do composto terapêutico é selecionada.

[0814] 292. O método, de acordo com a modalidade 291, em que a dosagem é administrada.

[0815] 293. O método, de acordo com a modalidade 290, em que a dosagem selecionada é zero, isto é, a administração do composto terapêutico é interrompida.

[0816] 294. O método, de acordo com a modalidade 290, em que a dosagem selecionada é diferente de zero.

[0817] 295. O método, de acordo com a modalidade 290, em que a dosagem selecionada é uma dosagem aumentada.

[0818] 296. O método, de acordo com a modalidade 290, em que a dosagem selecionada é uma dosagem reduzida.

[0819] 297. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-296, em que a administração compreende administração sistêmica, por exemplo, no sistema circulatório periférico.

[0820] 298. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-297, em que a administração compreende administração local, por exemplo, no tecido alvo.

[0821] 299. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-298, que compreende administrar um composto terapêutico fornecido aqui, de modo que níveis terapêuticos estejam presentes por pelo menos 1, 5, 10, 14 ou 28 dias, por exemplo, dias consecutivos ou não consecutivos.

[0822] 300. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-299, em que o indivíduo é um mamífero, por exemplo, um mamífero não humano.

[0823] 301. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 196-299, em que o indivíduo é um ser humano.

[0824] 302. Uma molécula de ácido nucleico ou uma pluralidade de moléculas de ácido nucleico que codificam um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13.

[0825] 303. Um vetor ou uma pluralidade de vetores que compreendem as moléculas de ácido nucleico de acordo com a modalidade 302.

[0826] 304. Uma célula que compreende as moléculas de ácido nucleico de acordo com a modalidade 302 ou o vetor de acordo com a modalidade 303.

[0827] 305. Método para fabricar um composto terapêutico que compreende cultivar uma célula de acordo com a modalidade 304 para fabricar o composto terapêutico.

[0828] 306. Um método de produção de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um composto terapêutico de acordo com qualquer uma das modalidades 1-195.13 que compreende:

a) fornecer um vetor que compreende uma sequência que codifica uma porção de alvejamento e inserir, na sequência,

o vetor que codifica uma porção de ligação/modulação efetora para formar uma sequência que codifica um composto terapêutico; ou

b) fornecer um vetor que compreende a sequência que codifica uma porção de ligação/modulação efetora e inserir, na sequência, o vetor que codifica uma porção de alvejamento para formar uma sequência que codifica um composto terapêutico,

produzindo, assim, uma sequência que codifica um composto terapêutico.

[0829] 307. O método, de acordo com a modalidade 306, em que a porção de alvejamento é selecionada em resposta à necessidade de um indivíduo.

[0830] 308. O método, de acordo com a modalidade 306 ou 307, em que a porção de ligação/modulação efetora é selecionada em resposta à necessidade de um indivíduo.

[0831] 309. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 306 ou 307, que compreende ainda expressar a sequência que codifica o composto terapêutico para produzir o composto terapêutico.

[0832] 310. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 306-309, que compreende ainda transferir a sequência, ou um polipeptídeo produzido a partir da sequência, para outra entidade, por exemplo, um profissional

de saúde que administrará o composto terapêutico a um indivíduo.

[0833] 311. Um método de tratamento de um indivíduo que compreende:

adquirir, por exemplo, receber de outra entidade, um composto terapêutico ou um ácido nucleico que codifica um composto terapêutico produzido por meio do método de acordo com qualquer um daqueles fornecidos aqui, mas não limitado às modalidades 306-310;

administrar o composto terapêutico ou um ácido nucleico que codifica um composto terapêutico ao indivíduo,

tratando, assim, o indivíduo.

[0834] 312. O método, de acordo com a modalidade 311, que compreende ainda identificar o composto terapêutico, ou ácido nucleico que codifica um composto terapêutico, para outra entidade, por exemplo, a entidade que produzirá o composto terapêutico ou ácido nucleico que codifica um composto terapêutico.

[0835] 313. O método, de acordo com as modalidades 311 ou 312, que compreende ainda solicitar o composto terapêutico, ou ácido nucleico que codifica um composto terapêutico, de outra entidade, por exemplo, a entidade que produziu o composto terapêutico ou ácido nucleico que codifica um composto terapêutico.

[0836] 314. O método, de acordo com qualquer uma das modalidades 311-333, em que o indivíduo tem um transtorno autoimune e o composto terapêutico não compreende um peptídeo autoantigênico ou polipeptídeo característico do transtorno autoimune, por exemplo, não compreende um peptídeo ou polipeptídeo contra o qual o indivíduo tem autoanticorpos.

[0837] Os exemplos a seguir são ilustrativos, mas não limitativos, dos compostos, composições e métodos descritos aqui. Outras modificações e adaptações adequadas conhecidas por aqueles versados na técnica estão dentro do escopo das modalidades a seguir.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: COMPOSTOS TERAPÊUTICOS AGONISTAS DE PD-1 QUE TÊM COMO ALVO HLA.

Manipulação de um Produto Terapêutico Agonista de PD-1 que tem como alvo HLA

[0838] Os domínios de ligação específicos para HLA-A2 são obtidos ao clonar as regiões variáveis das cadeias pesada e leve de Ig a partir do hibridoma BB7.2 (ATCC) e converter em um Ab com uma única cadeia (scFv). A atividade e a especificidade do scFv podem ser confirmadas ao avaliar a ligação de BB7.2 a células que expressam HLA-A2 comparado com células que expressam outros alelos de HLA-A. Os resíduos de PD-L1 mínimos necessários para a atividade de ligação à

PD-1 são identificados através de avaliação sistemática da exigência dos aminoácidos 3' e 5' do domínio IgV de PDV-L1 que corresponde aos aminoácidos 68-114. Constructos de expressão são concebidos e proteínas são sintetizadas e purificadas com atividade de ligação à PD-1 testada por Biacore. Os aminoácidos essenciais mínimos necessários para a ligação à PD-1 pelo domínio IgV de PD-L1 são denominados como PD-L1-IgV. Para gerar uma molécula biespecífica BB7.2 scFv e PD-L1-IgV, é sintetizado um fragmento de DNA que codifica o anticorpo biespecífico com uma única cadeia BB7.2 x PD-L1-IgV com a configuração de domínio VL_{BB7.2}-VH_{BB7.2}-PD-L1-IgV-Fc de IgG4 e clonado em um vetor de expressão que contém um cassete de seleção de DHFR.

[0839] O DNA plasmidial do vetor de expressão é transitoriamente transfectado em células 293T e anticorpos biespecíficos BB7.2 x PD-L1-IgV são purificados a partir de sobrenadantes usando uma coluna de proteína A/G. A integridade do anticorpo biespecífico BB7.2 x PD-L1-IgV é avaliada através de um gel de poliacrilamida. A ligação do domínio scFv de BB7.2 ao domínio de HLA-A2 e PD-L1-IgV à PD-1 é avaliada por ELISA e pelo ensaio FACS com base em células.

[0840] A função *in vitro* dos anticorpos biespecíficos BB7.2 x PD-L1-IgV é avaliada usando o ensaio de reação linfocitária mista (MLR). Em um formato de placa com 96

cavidades, 100.000 PBMCs humanas irradiadas de um doador HLA-A2⁺ são transformadas em alíquota por cavidade e usadas como ativadores. Células T responsivas ao HLA-A1⁻ são, então, adicionadas juntamente com quantidades crescentes de anticorpo biespecífico BB7.2 x PD-L1-IgV. A capacidade das células T responsivas de proliferar durante um período de 72 horas é avaliada pela incorporação de BrdU e com a produção de citocinas IFN γ e IL2 adicionalmente avaliada no sobrenadante da cocultura avaliada por ELISA. Descobriu-se que o anticorpo biespecífico BB7.2 x PD-L1-IgV suprime a reação MLR, conforme demonstrado pela inibição de proliferação de células T HLA-A2⁻ responsiva e a produção de citocinas.

[0841] A função *in vivo* do anticorpo biespecífico BB7.2 x PD-L1-IgV é avaliada usando um modelo de camundongo com tolerância a aloenxertos de pele. A linhagem de camundongo C57BL/6-Tg (HLA-A2.1) Enge/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor Maine) é cruzada com Balb/cJ, com a progênie F1 expressando o transgene de HLA-A2.1 e servindo como doador de enxerto. Os camundongos C57BL/6J são raspados e enxertados cirurgicamente com a pele removida dos camundongos C57BL/6-Tg (HLA-A2.1) Enge/J x Balb/cJ F1 sacrificados. Ao mesmo tempo, os camundongos hospedeiros começam a receber injeções intraperitoneais do anticorpo

biespecífico BB7.2 x PD-L1-IgV concebido para conter Fc de IgG1 de murino ou BB7.2 apenas ou controles de PD-L1-IgV apenas. A rejeição ou aceitação do aloenxerto de pele é monitorada durante um período de 30 dias, em que os hospedeiros foram sacrificados e as populações de linfócitos e linfócitos residentes no aloenxerto quantificadas.

EXEMPLO 2: CD39 E/OU CD73 COMO DOMÍNIOS EFETORES QUE CRIAM UM HALO PURINÉRGICO QUE ENVOLVE UM TIPO DE CÉLULA OU TECIDO DE INTERESSE.

[0842] Um fragmento cataliticamente ativo de CD39 e/ou CD73 é fundido a um domínio para alveijamento. Após ligação e acúmulo na localização alvo, a CD39 fosfo-hidrolisa o ATP em AMP. Mediante ligação e acúmulo na localização alvo, a CD73 desfosforila o AMP extracelular em adenosina. Descobriu-se que uma forma solúvel cataliticamente ativa de CD39 adequada para uso aqui circula no sangue humano e de murino; vide, por exemplo, Yegutkin et al., *FASEB J.* setembro de 2012; 26 (9): 3875-83. Um fragmento de CD39 recombinante solúvel também é descrito em *Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39*, Gayle, et al., *J Clin Invest.* 01 de maio de 1998; 101(9): 1851-1859. Uma molécula de CD73 adequada compreende uma forma solúvel de CD73 que pode ser eliminada da membrana das células endoteliais por meio de clivagem proteolítica ou hidrólise

da âncora de GPI através da tensão de cisalhamento; vide, por exemplo, Referência: Yegutkin G., Bodin P., Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 921-6.

[0843] A catálise local de ATP em AMP ou AMP para adenosina esgotará os estoques locais de energia necessários para a função das células efetoras T fulminantes. A função de Tregs não deve ser afetada pela depleção de ATP em virtude de sua dependência de fosforilação oxidativa para necessidades de energia (que requer menos ATP), em que células T de memória e outras células efetoras devem ser afetadas em virtude de sua dependência da glicólise (a qual requer um elevado uso de ATP) para a função fulminante.

EXEMPLO 3: MEDIÇÃO DE SINALIZAÇÃO À PD-1 INDUZIDA POR ANTICORPOS.

[0844] Células Jurkat que expressam estavelmente duas construções, 1) um polipeptídeo de PD-1 humana fundido com uma β -galactosidase, o qual pode ser denominado como "doador de enzimas" e 2) um polipeptídeo de SHP-2 fundido com uma β -galactosidase, o qual pode ser denominado como "aceitador de enzimas". Um anticorpo anti-PD-1 é colocado em contato com a célula e, quando a PD-1 é ativada, SHP-2 é recrutada para

a PD-1. O aceitador de enzimas e o doador de enzimas formam uma enzima β -galactosidase totalmente ativa que pode ser testada. Este ensaio pode ser usado para mostrar a ativação de sinalização à PD-1.

EXEMPLO 4: MEDIÇÃO DE AGONISMO DE PD-1.

[0845] Agonistas de PD-1 inibem a ativação de células T. Sem estar preso a nenhuma teoria em particular, o agonismo de PD-1 inibe a ativação de células T induzidas por anti-CD3. Células humanas ou de camundongo são pré-ativadas com PHA (para células T humanas) ou Con A (para células T de camundongo) para que expressem PD-1. As células T são, então, "reativadas" com anti-CD3 na presença de anti-PD-1 (ou PD-L1) para o ensaio de agonismo de PD-1. As células T que recebem um sinal agonista de PD-1 na presença de anti-CD3 mostrarão uma ativação reduzida em relação apenas à estimulação de anti-CD3. A ativação pode ser lida pela proliferação ou produção de citocinas (IL-2, IFN γ , IL-17) e possivelmente por outros marcadores, tal como o marcador de ativação CD69.

EXEMPLO 5. EXPRESSÃO E FUNÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ANTI-MAdCAM/PD-L1 DE CAMUNDONGO NÃO SÃO AFETADAS PELA CONFIGURAÇÃO MOLECULAR.

[0846] Uma molécula de fusão biespecífica que compreende uma molécula de Ab anti-MAdCAM de camundongo/PD-

L1 de camundongo foi expressa em duas orientações. A primeira orientação consistia em uma IgG anti-MAdCAM de camundongo com PD-L1 de camundongo fundido no C-terminal de sua cadeia pesada. A segunda orientação consistia em PD-L1 de camundongo fundido no N-terminal de um domínio Fc de Ig, com um scFv anti-MAdCAM de camundongo fundido no C-terminal. Descobriu-se que ambas as moléculas eram bem expressas em um sistema de expressão de mamífero. Descobriu-se também que as moléculas podem se ligar a seus respectivos parceiros de ligação, MAdCAM ou PD-1, em ambas as orientações simultaneamente. Estes resultados demonstram que uma molécula que consiste em um anticorpo anti-MAdCAM fundido com PD-L1 pode ser expressa em configurações nas quais PD-L1 é fundido N- ou C-terminalmente à Fc e retém a atividade de ligação funcional adequada.

[0847] Resumidamente, um vetor pTT5 que contém o gene exclusivo que codifica um único polipeptídeo com PD-L1 de camundongo fundido N-terminalmente ao domínio Fc de IgG1 humana e com o scFv anti-MAdCAM MECA-89 C-terminalmente fundido foi transfectado em células HEK293 Expi. Alternativamente, dois plasmídeos foram cotransfectados em proporções equimolares. O primeiro plasmídeo codificava a cadeia leve de MECA-89 e o 2º codificava a cadeia pesada de IgG1 de comprimento total de

MECA-89 com PD-L1 de camundongo fundido no C-terminal. Após 5-7 dias, os sobrenadantes da cultura de células que expressam as moléculas foram coletados e clarificados por meio de centrifugação e filtração através de um dispositivo de filtração de 0,22 µm. As moléculas biespecíficas foram capturadas sobre resina proA. A resina foi lavada com PBS, pH de 7,4, e a molécula capturada foi eluída usando glicina a 100 mM, pH de 2,5, com neutralização usando um décimo do volume de Tris a 1 M, pH de 8,5. O tampão da proteína foi trocado para PBS, pH de 7,4, e a proteína analisada por meio de cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Superdex 200 3.2/300. Análise de 1 µg do material purificado foi realizada por meio de SDS-PAGE redutora e não redutora em um gel de Bis-Tris a 4-12%.

[0848] Ambas as proteínas, independentemente da orientação, foram expressas acima de 10 mg/L, e eram mais de 95% monodispersas após purificação, conforme mostrado pela cromatografia de exclusão por tamanho e SDS-PAGE redutora/não redutora. Consequentemente, isto demonstra a produção e atividade de moléculas biespecíficas de dupla função com diferentes imunomoduladores e porções para alvejamento tecidual no N- e C-terminais de um domínio Fc. Isto também mostra especificamente que um agonista de

PD-1 e um parceiro de ligação podem ser expressos no N-terminal ou C-terminal de um domínio Fc de Ig.

EXEMPLO 6. MOLÉCULA BIESPECÍFICA QUE COMPREENDE UM PROTÓTIPO AGONISTA DE PD-1 ÚNICO À MAdCAM PODE SE LIGAR À MAdCAM E PD-1 SIMULTANEAMENTE.

[0849] Resumidamente, uma placa imunossorvente foi revestida com PD-1 de camundongo em uma concentração de 1 µg/mL em PBS, pH de 7,4, 75 µl/cavidade, e incubada de um dia para o outro a 4°C. As cavidades foram lavadas com PBS, pH de 7,4, que contém Tween-20 a 0,05% (tampão de lavagem) três vezes e depois bloqueadas com 200 µl/cavidade de BSA a 1% em PBS, pH de 7,4 (tampão de bloqueio) durante duas horas em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, duas moléculas biespecíficas que compreendem o protótipo agonista de PD-1 no N-terminal ou no C-terminal foram diluídas a 1 nM, 10 nM e 100 nM em PBS que contém BSA a 1% e Tween-20 a 0,05% (tampão de ensaio). O material diluído foi adicionado à placa revestida com PD-1 de camundongo a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, MAdCAM de camundongo foi adicionada à placa a 75 µl/cavidade, em uma concentração de 10 nM em tampão de ensaio durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, um anticorpo policlonal de cabra anti-MAdCAM de

camundongo biotinilado, diluído para 0,5 µg/mL em tampão de ensaio, foi adicionado à placa a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, estreptavidina HRP de alta sensibilidade diluída em tampão de ensaio a 1:5000 foi adicionada à placa a 75 µl/cavidade durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem e 1 lavagem com tampão de lavagem (sem Tween-20), o ensaio foi revelado com TMB e interrompido com HCl a 1 N. A OD 450 nm foi medida. O experimento incluiu controles apropriados para ligação inespecífica à placa/bloco na ausência de PD-1 de camundongo, bem como nenhum controle de MAdCAM e controles monoespecíficos que são incapazes de formar uma ponte entre a PD-1 de camundongo e a MAdCAM de camundongo.

[0850] Os resultados demonstraram que, nas concentrações de 1 nM, 10 nM e 100 nM, ambas as moléculas biespecíficas são capazes de interagir simultaneamente com a MAdCAM e PD-L1 de camundongo, enquanto que os controles monoespecíficos não criaram um sinal de ponte. Além disso, não houve ligação de qualquer composto à MAdCAM em qualquer concentração testada quando a PD-1 de camundongo não estava presente sobre a superfície da placa, indicando que nenhum dos compostos de teste estava interagindo não especificamente com a superfície da placa. Assim, estes

resultados demonstram que uma molécula biespecífica que tem como alvo a ligação à MAdCAM e PD-1 pode se ligar com sucesso a ambas as moléculas.

[0851] Embora os experimentos tenham sido realizados com PD-L1 como um substituto para um anticorpo anti-PD-1, espera-se que o anticorpo anti-PD-1 funcione de maneira similar.

EXEMPLO 7. UMA MOLÉCULA PROTÓTIPO DE PD-L1 BIESPECÍFICA INIBE CÉLULAS T EM UM ENSAIO AGONISTA DE PD-1.

[0852] Uma molécula biespecífica que imita um anticorpo agonista de PD-1 foi testada para demonstrar que o agonismo de PD-1 pode inibir células T. Resumidamente, camundongos C57LB/6 fêmeas com 7 semanas de idade foram sacrificados e seus esplenócitos foram isolados. Os esplenócitos foram expostos a ConA por 3 dias e depois expostos a anti-CD3 na presença ou ausência da molécula de tipo PD-1 a qual, neste exemplo, era uma molécula biespecífica de PD-L1 que foi unida a uma placa usando anti-IgG humana. As células T foram, então, introduzidas na molécula biespecífica de PD-L1. Descobriu-se que o PD-L1, o qual imita um anticorpo anti-PD-1, é um agonista de células T e inibe a ativação de células T. Os mesmos experimentos foram repetidos usando uma molécula de PD-L1 biespecífica que foi fundida com um anticorpo anti-MAdCAM, o qual foi

unido a uma placa através de interação com uma placa revestida com MAdCAM. Descobriu-se que o PD-L1, o qual imita um anticorpo PD-L1/anti-MAdCAM, era um agonista eficaz de atividade das células T. Estes resultados demonstram que uma molécula biespecífica que imita uma proteína de fusão anticorpo anti-PD-1/Ab MAdCAM pode exercer sinalização inibidora funcional sobre blastócitos de células T primárias de camundongo quando a molécula é capturada através do componente de anticorpo MAdCAM no final da molécula.

EXEMPLO 8: UMA MOLÉCULA PROTÓTIPO DE PD-1 BIESPECÍFICA COM UM AGENTE DE UNIÃO TECIDUAL DIFERENTE PODE INIBIR CÉLULAS T EM UM ENSAIO AGONISTA DE PD-1.

[0853] Uma molécula de fusão de um PD-L1 foi usada como um substituto para um anticorpo anti-PD-1 e ligada a um anticorpo H-2Kk de Classe I. A molécula de PD-L1 ligada ao MHC Classe I H-2Kk tinha ligação funcional, similar aos dados descritos nos Exemplos 6 e 7. Resumidamente, esplenócitos de camundongos C57B1/6 foram estimulados com Concanavalina A (ConA) e JL-2 por 3 dias. As placas foram revestidas com anti-CD3 (2C1) de um dia para o outro a 4°C e lavadas. As placas foram revestidas com anti-IgG humana durante 3 horas a 37°C e lavadas. Anti-H-2Kk monoespecífico (16-3-22) ou anti-H-2Kk biespecífico:mPD-L1 foi adicionado e incubado durante 3 horas a 37°C e lavado. Todos os artigos de teste

continham uma porção de IgG1-Fc humana. PBS (sem Tx) foi adicionado para determinar o fundo do ensaio. Blastos com ConA foram lavados 2 vezes, adicionados à placa e incubados a 37°C. Os sobrenadantes foram removidos após 24 horas. Os níveis de IFN γ foram determinados por MSD. Após 48 horas, a viabilidade/metabolismo celular foi analisada pelo Cell Titer-glo. Quando capturado através do domínio Fc de IgG, um PD-L1 biespecífico unido ao MHC Classe I pode atenuar a ativação de células T em um ensaio de agonismo de PD-1 de camundongo. Portanto, este exemplo demonstra que uma molécula protótipo biespecífica diferente pode exercer um sinal inibidor funcional em blastos de células T primárias de camundongo - quando a molécula é capturada através de um agente de união tecidual diferente - neste caso, um anticorpo de camundongo para MHC Classe I H-2Kk. Consequentemente, estes dados demonstram que a união não é específica para MAdCAM e é possível com outras moléculas que possam atuar como porções alvo, conforme fornecido aqui.

EXEMPLO 9. AGONISTAS DE PD-1 PODEM INDUZIR À SINALIZAÇÃO EM CÉLULAS JURKAT

[0854] Células Jurkat que expressam PD-1 humana fundida a um doador da enzima beta-galactosidase e SHP-2 fundida a um aceitador de enzima beta-galactosidase são adicionadas sob as condições de teste a uma placa e incubadas

por 2 horas. Os anticorpos agonistas de PD-1 induzem à sinalização e recrutamento de SHP-2, complementação enzimática e formação de uma enzima beta-galactosidase ativa. Foi adicionado substrato de beta-galactosidase e a quimioluminescência pode ser medida em um leitor de placa de luminescência padrão. O agonismo é medido pela quimioluminescência, onde quanto maior a quimioluminescência medida, maior o agonismo.

[0855] O agonismo de uma molécula biespecífica PD-1/MAdCAM foi medido neste ensaio. C110 (UCB) e CC-90006 (Celgene/Anaptys) foram usados como anticorpos agonistas de PD-1. Ambos são ativos e exibem agonismo de PD-1 em ensaio funcional no formato de ensaio de captura de Ig. Resumidamente, as placas foram revestidas com anti-IgG humana de um dia para o outro a 4°C e lavadas. Anticorpos monoclonais anti-PD-1, toxina antitetânica (TT) ou agonista de referência anti-PD-1, C110 ou CC-90006 foram adicionados e incubados durante 1 hora a 37°C e lavados. Todos os artigos de teste continham uma IgG1-Fc humana. Foi adicionado meio (sem Tx) para determinar o fundo do ensaio. As placas foram lavadas 3 vezes. Células Jurkat que expressam PD-1 humana fundida a um doador da enzima β -galactosidase e SHP-2 fundida a um aceitador da enzima β -galactosidase foi adicionada e incubada por 2 horas. Os anticorpos agonistas de PD-1 induzem

à sinalização e recrutamento de SHP-2, complementação enzimática e formação de uma enzima β -galactosidase ativa. Foi adicionado substrato de β -galactosidase e a quimioluminescência foi medida em um leitor de placa de luminescência padrão. Os dois anticorpos agonistas de PD-1 humana (C110 e CC-90006) se ligam e induzem à sinalização (um substituto para o agonismo) no ensaio repórter com células Jurkat modificado. Assim, este ensaio é um ensaio de agonismo de PD-1 funcional. C110:MECA89 (MECA89 é um anticorpo anti-MAdCAM conhecido) é uma nova molécula biespecífica criada pela fusão do anticorpo MAdCAM, MECA89 [scFv] ao C-terminal da cadeia pesada de C110. Descobriu-se que esta proteína de fusão é ativa e exibe agonismo de PD-1 em ensaio funcional quando capturada através do domínio Fc de IgG, assim como a proteína C110 apenas. No entanto, apenas C110:MECA89 está ativo no formato de ensaio funcional usando a proteína MAdCAM como captura (os componentes monoespecíficos não sinalizam).

[0856] Resumidamente, as placas foram revestidas com anti-IgG humana ou mMAdCAM-1 recombinante de um dia para o outro a 4°C e lavadas. Toxina antitetânica monoespecífica (TT), anti-MAdCAM-1 (MECA89) ou agonista anti-PD-1 (C110) ou C110:MECA89 biespecífico foram adicionados e incubados durante 1 hora a 37°C e lavados. Todos os artigos de teste

continham uma porção de IgG1-Fc humana. Foi adicionado PBS (sem Tx) para determinar o fundo do ensaio. As placas foram lavadas 2 vezes. Células Jurkat que expressam PD-1 humana fundida com um doador de enzima β -galactosidase e SHP-2 fundida com um aceitador de enzima β -galactosidase foram adicionadas e incubadas durante 2 horas. Os anticorpos agonistas de PD-1 induzem à sinalização e recrutamento de SHP-2, complementação enzimática e formação de uma enzima β -galactosidase ativa. Foi adicionado substrato de β -galactosidase e a quimioluminescência foi medida em um leitor de placa de luminescência padrão. Resultados: Tanto as moléculas biespecíficas C110 e como C110 unida à MAdCAM podem induzir à sinalização à PD-1 no ensaio do repórter Jurkat quando a placa é revestida com um Fc anti-Fc de IgG de captura, mas apenas a molécula biespecífica ligada à MAdCAM pode induzir à sinalização a PD-1 no ensaio repórter quando a placa é revestida com proteína MAdCAM recombinante. Estes resultados demonstram que a molécula unida com MAdCAM e que contém um anticorpo agonista de PD-1 é funcional, o que é similar aos resultados mostrados com PD-L1 como substituto do agonista de PD-1.

EXEMPLO 10: GERAÇÃO DE ANTICORPOS AGONISTAS DE PD-1

[0857] Camundongos deficientes em PD-1 foram imunizados com PD-1 de camundongo sob condições para gerar

uma resposta imune contra PD-1. Foram gerados e identificados 54 hibridomas que se ligam à PD-1 de camundongo. Os anticorpos produzidos pelos diferentes hibridomas foram analisados quanto ao agonismo de células T de acordo com os métodos descritos nos Exemplos 4 e 6. Dos 54 hibridomas, pelo menos 6 foram identificados como agonistas de PD-1. Os anticorpos também foram testados quanto à ligação à PD-1 e descobriu-se que se ligavam no mesmo sítio que o sítio de ligação ao PD-L1.

[0858] Resumidamente, a ligação ao sítio de ligação PD-L1 foi determinada usando o seguinte ensaio. Placas imunossorventes foram revestidas de um dia para o outro com 75 µL de PD-L1-Fc recombinante de camundongo (2 µg/mL) em 1x PBS, pH de 7,4. As placas foram, então, lavadas 3x com 1x PBS e bloqueadas durante 2 horas em temperatura ambiente com 1x PBS suplementado com BSA a 1%. PD-1-Fc recombinante de camundongo (1 nM) foi incubado com 100 nM do anticorpo anti-PD-1 de camundongo indicado em 1x PBS suplementado com BSA a 1% e Tween20 a 0,05% (tampão de ensaio) durante 1 hora em temperatura ambiente, com agitação. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3x com 1x PBS suplementado com Tween20 PBST a 0,05% e o anticorpo anti-PD-1 conjugado foi incubado com PD-L1 de camundongo ligado à placa. Após lavagem da PD-1 não ligada com PBST, as placas foram incubadas com 75 µL

de anticorpo policlonal anti-PD-1 biotinilado (0,5 µg/mL) em tampão de ensaio, seguido de amplificação com estreptavidina HRP a 1:5000 também diluída em tampão de ensaio. As placas foram lavadas três vezes com PBST, seguido de três lavagens com 1x PBS antes da adição de 100 µL de TMB, seguido de 100 µL de HCl a 1 M para interromper o desenvolvimento. A absorbância é lida a 450 nm e normalizada para a ligação de PD-1 ao PD-L1 na ausência de anticorpo. Os resultados mostraram que os anticorpos ativos se ligam ao sítio de ligação ao PD-L1. Os anticorpos inativos não se ligaram ao sítio de ligação ao PD-L1. Portanto, este exemplo demonstra a capacidade de produzir anticorpos anti-PD-1 que são agonistas, além dos anticorpos agonistas de PD-1 previamente identificados descritos aqui.

EXEMPLO 11: ANTICORPOS ANTI-PD-1 UNIDOS ATUAM COMO AGONISTAS DE PD-1.

[0859] Uma biblioteca de fagos scFv de anticorpo humano foi analisada contra proteínas PD-1 humanas, de camundongo e cino recombinantes através de ciclos de seleção iterativos para enriquecer clones de anticorpos que reconhecem todos os três ortólogos de PD-1 das espécies supracitadas. Os clones de scFv foram configurados no formato nt-VH-Ligante-VL-ct e fundidos à superfície do fago M13 através da proteína de revestimento pIII. Após as seleções,

os scFvs clonais foram rastreados quanto à ligação à PD-1 humana, de camundongo e cino expressa sobre a superfície celular de células CHO. Os clones que mostraram reação cruzada com os três ortólogos das espécies de PD-1 expressas sobre a superfície celular foram convertidos, usando técnicas padrão de biologia molecular, em um formato de IgG1 humana, em que cada molécula era composta por quatro cadeias polipeptídicas no total (2 cadeias pesadas e 2 leves). As duas cadeias leves eram idênticas uma à outra e as duas cadeias pesadas eram idênticas uma à outra, conforme fornecido.

[0860] As duas cadeias pesadas idênticas homodimerizam e as duas cadeias leves idênticas emparelham com cada cadeia pesada para formar uma IgG1 humana intacta. O domínio Fc contém as mutações L234A, L235A e G237A para eliminar as interações com o FcγR. Os anticorpos IgG1 anti-PD-1 humana convertidos foram transfectados e expressos em células HEK293 Expi e purificados por meio de cromatografia em proteína A. A concentração de proteína foi determinada usando um espectrofotômetro Nanodrop juntamente com coeficientes de extinção específicos para anticorpos. Os anticorpos foram formulados em PBS, pH de 7,4.

[0861] Os anticorpos anti-PD-1 foram, em seguida, testados no ensaio Jurkat descrito aqui quanto à atividade

agonista. Resumidamente, placas de cultura tecidual foram revestidas com anti-IgG ou deixadas sem revestimento. Para o formato capturado, os artigos ou controles de teste foram adicionados às cavidades revestidas com anti-IgG a 100 nM, 25 nM ou 12,5 nM e incubados durante 3 horas a 37°C. As placas foram lavadas e as células Jurkat PD-1 foram adicionadas. Para o formato solúvel, foram adicionados artigos de teste ou controles solúveis às cavidades a 100 nM, 25 nM ou 12,5 nM já contendo células Jurkat PD1. A luminescência foi medida em um leitor de placas. Os resultados demonstraram que nove dos doze anticorpos anti-PD-1 humana/de camundongo que reagiram de forma cruzada exibiram atividade dependente da dose no ensaio Jurkat quando os anticorpos anti-PD-1 foram capturados via anti-IgG, mas não no formato solúvel. Estes dados demonstram que o anticorpo anti-PD-1 pode atuar como um agonista quando unido ao seu alvo através de uma porção de alvejamento.

[0862] Em conclusão, sem estar preso a nenhuma teoria específica, os dados fornecidos aqui demonstram que uma molécula biespecífica agonista de PD-1/MAdCAM pode se ligar à MAdCAM e PD-1 e também é agonista da atividade de células T. Assim, as moléculas podem ser usadas para tratar as várias condições fornecidas aqui e conferir imunomodulação

localizada e/ou específica para tecido e regulação negativa de uma resposta de células T.

EXEMPLO 12: GERAÇÃO DE MUTEÍNAS DE IL-2

[0863] Um vetor pTT5 contendo o gene exclusivo que codifica o polipeptídeo de IL-2M humana fundido no N-terminal (SEQ ID NO: 57) ou C-terminal (SEQ ID NO: 58) no domínio Fc de IgG1 humana foi transfectado em células HEK293 Expi. Após 5-7 dias, os sobrenadantes da cultura de células que expressam IL-2Ms foram coletados e clarificados por meio de centrifugação e filtração através de um dispositivo de filtração de 0,22 µm. IL-2Ms foram capturadas em resina proA. A resina foi lavada com PBS, pH de 7,4, e a proteína capturada foi eluída usando ácido acético a 0,25%, pH de 3,5, com neutralização usando um décimo do volume de Tris a 1M, pH de 8,0. O tampão da proteína foi trocado para HEPES a 30 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7, e a proteína analisada por meio de cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Superdex 200 3.2/300. Análise de 5 µg do material purificado foi realizada por SDS-PAGE redutora e não redutora em um gel de Bis-Tris a 4-12%. As IL-2Ms foram expressas acima de 10 mg/L e eram mais de 95% monodispersas após purificação, conforme mostrado pela cromatografia de exclusão por tamanho e SDS-PAGE redutora/não redutora.

EXEMPLO 13: MOLÉCULAS DE IL-2M PODEM SE LIGAR À CD25

[0864] Uma placa imunossorvente foi revestida com CD25 em uma concentração de 0,5 µg/mL em PBS, pH de 7,4, 75 µl/cavidade, e incubada de um dia para o outro a 4°C. As cavidades foram lavadas com PBS, pH de 7,4, que contém Tween-20 a 0,05% (tampão de lavagem) três vezes e depois bloqueadas com 200 µl/cavidade de BSA a 1% em PBS, pH de 7,4 (tampão de bloqueio) durante duas horas em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, as moléculas de IL-2M do Exemplo 12 foram diluídas 11 vezes em uma diluição em série em PBS que contém BSA a 1% e Tween-20 a 0,05% (tampão de ensaio), sendo 2 nM a maior concentração. O material diluído foi adicionado à placa revestida com CD25 a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, um anticorpo policlonal anti-IL-2 biotinilado de cabra, diluído para 0,05 µg/mL em tampão de ensaio, foi adicionado à placa a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, estreptavidina HRP de alta sensibilidade diluída em tampão de ensaio a 1:5000 foi adicionada à placa a 75 µl/cavidade durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem e 1 lavagem com tampão de lavagem (sem Tween-20), o ensaio foi revelado com TMB e interrompido com HCl a 1 N. A OD 450 nm foi medida. O experimento incluiu controles

apropriados para ligação não específica de moléculas de IL-2M à placa/bloco na ausência de CD25 e uma molécula de controle negativo que é incapaz de se ligar à CD25.

[0865] Os resultados indicam que, em concentrações de 2 nM-1,9 pM, as moléculas de IL-2M são capazes de se ligar à CD25 com EC₅₀s sub-nanomolares. Além disso, não houve detecção de nenhum composto em nenhuma concentração testada quando a CD25 não estava presente sobre a superfície da placa, indicando que nenhum dos compostos de teste estava interagindo não especificamente com a superfície da placa (dados não mostrados).

EXEMPLO 14: ENSAIO DE P-STAT5 *IN VITRO* PARA DETERMINAR A POTÊNCIA E A SELETIVIDADE DE MOLÉCULAS DE IL-2M.

[0866] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram preparadas usando tubos FICOLL-PAQUE Premium e Sepmate a partir de sangue total humano heparinizado recentemente isolado. As PBMCs foram cultivadas em meio RPMI com soro bovino fetal a 10% na presença de IL-2 ou IL-2M de tipo selvagem do Exemplo 12 durante 20 minutos e depois fixadas por 10 minutos com BD Cytotfix.

[0867] As células fixadas foram permeabilizadas sequencialmente com BD Perm III e depois com o tampão de permeabilização BioLegend FOXP3. Após bloqueio com soro humano durante 10 minutos, as células foram coradas por 30

minutos com anticorpos para FITC fosfo-STAT5, CD25 PE, FOXP3 AF647 e CD4 PerCP Cy5.5 e depois adquiridas em um Attune NXT com leitor de placas. A IL-2M do Exemplo 12 induz potente e seletivamente à fosforilação de STAT5 em Tregs, mas não em Teffs.

EXEMPLO 15: MÉTODOS PARA GERAÇÃO DE MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS DE IL-2M UNIDAS À MAdCAM

[0868] Um vetor pTT5 contendo o gene exclusivo que codifica o único polipeptídeo B0001 que compreende uma muteína de IL-2 com as mutações N88D, V69A e Q74P fundida a uma proteína Fc com as mutações LALA, conforme fornecido aqui, com um ligante GGGGS (x3) e anticorpo scFv que se liga à MAdCAM ou uma molécula similar, mas com um ligante B0002 GGGGS (x4) com o domínio N-terminal da Fc de IgG1 fundido com IL-2M humana e com o scFv anti-mMAdCAM MECA-89 fundido no C-terminal foi transfectado em células HEK293 Expi. Para B0003, dois plasmídeos foram cotransfectados em proporções equimolares. O primeiro plasmídeo codificava a cadeia leve de MECA-89 e o 2º codificava a cadeia pesada de IgG1 de comprimento total de MECA-89 com IL-2M humana fundida no C-terminal. Após 5-7 dias, os sobrenadantes da cultura de células que expressam B0001, B0002 e B0003 foram coletados e clarificados por meio de centrifugação e filtração através de um dispositivo de filtração de 0,22 µm. B0001, B0002 e

B0003 foram capturados em resina proA. A resina foi lavada com PBS, pH de 7,4, e a proteína capturada foi eluída usando ácido acético a 0,25%, pH de 3,5, com neutralização usando um décimo do volume de Tris a 1M, pH de 8,0. O tampão da proteína foi trocado para HEPES a 30 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7, e analisada por meio de cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Superdex 200 3.2/300. Análise de 1 µg do material purificado foi conduzida através de SDS-PAGE redutora e não redutora em um gel de Bis-Tris a 4-12%.

[0869] B0001, B0002 e B0003 foram expressos acima de 8 mg/L e acima de 95% monodispersos após purificação, conforme mostrado pela cromatografia de exclusão por tamanho e SDS-PAGE redutora/não redutora. Este experimento mostra que moléculas biespecíficas de dupla função com imunomoduladores no N- ou C-terminal podem ser produzidas e a posição da proteína IL-2M (no N- ou C-terminal) não alterou significativamente a expressão e, portanto, qualquer formato pode ser usado.

EXEMPLO 16: MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS DE IL-2M UNIDAS À
MAdCAM PODEM SE LIGAR À MAdCAM E CD25 SIMULTANEAMENTE

[0870] Uma placa imunossorvente foi revestida com MAdCAM-1 de camundongo recombinante em uma concentração de 1 µg/mL em PBS, pH de 7,4, 75 µl/cavidade, e incubada de um dia para o outro a 4°C. As cavidades foram lavadas com PBS,

pH de 7,4, que contém Tween-20 a 0,05% (tampão de lavagem) três vezes e depois bloqueadas com 200 µl/cavidade de BSA a 1% em PBS, pH de 7,4 (tampão de bloqueio) durante duas horas em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, B0001, B0002, B0003 foram diluídos para 1 nM, 10 nM e 100 nM em PBS que contém BSA a 1% e Tween-20 a 0,05% (tampão de ensaio). O material diluído foi adicionado à placa revestida com MAdCAM-1 de camundongo a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, CD25 humana foi adicionada à placa a 75 µl/cavidade em uma concentração de 10 nM no tampão de ensaio durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, um anticorpo policlonal anti-CD25 humana biotinilado de cabra, diluído para 0,4 µg/mL em tampão de ensaio, foi adicionado à placa a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, adicionou-se estreptavidina HRP de alta sensibilidade diluída em tampão de ensaio a 1:5000 à placa a 75 µl/cavidade durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem e 1 lavagem com tampão de lavagem (sem Tween-20), o ensaio foi revelado com TMB e interrompido com HCl a 1 M. A OD 450 nm foi medida. O experimento incluía controles apropriados para ligação não específica das proteínas do Exemplo 15 à

placa/bloco na ausência de MAdCAM-1 de camundongo, bem como nenhum controle de CD25 e controles monoespecíficos que são incapazes de formar uma ponte entre a CD25 humana e MAdCAM de camundongo.

[0871] Descobriu-se que, nas concentrações de 1 nM, 10 nM e 100 nM, as moléculas biespecíficas do Exemplo 15 foram capazes de interagir simultaneamente com MAdCAM de camundongo e CD25 humana, enquanto que os controles monoespecíficos não criaram um sinal de ponte. Além disso, não houve ligação de nenhum composto à CD25 em nenhuma concentração testada quando a MAdCAM-1 de camundongo não estava presente sobre a superfície da placa, indicando que nenhum dos compostos de teste estava interagindo não especificamente com a superfície da placa. Estes resultados demonstram que as moléculas biespecíficas podem se ligar à MAdCAM e CD25 simultaneamente em um ensaio de ligação funcional, tal como um ELISA.

EXEMPLO 17: ENSAIO IN VITRO DE P-STAT5 QUE DEMONSTRA ATIVIDADE E SELETIVIDADE DE IL-2M BIESPECÍFICA UNIDA À MAdCAM QUANDO EM SOLUÇÃO

[0872] MAdCAM recombinante de camundongo foi revestida em cavidades de uma placa de alta ligação com 96 cavidades (Corning) de um dia para o outro. Após lavagem 2 vezes com PBS, a placa foi bloqueada durante 1 hora com meio RPMI/FBS

a 10%. Uma IL-2M unida à MAdCAM biespecífica do Exemplo 15 ou controle de IL-2M não unida (tal como aquele preparado no Exemplo 12) foi capturado durante 1 hora. Após lavagem 2 vezes com PBS, PBMCs humanas recentemente isoladas foram estimuladas durante 60 minutos com IL-2M capturada ou, para comparação, com IL-2M em solução. As células foram, então, fixadas durante 10 minutos com BD Cytofix, permeabilizadas sequencialmente com tampão de permeabilização BD Perm III e BioLegend FOXP3, bloqueadas com soro humano e coradas por 30 minutos com anticorpos contra fosfo-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FOXP3 AF647 e CD4 PerCP Cy5.5 (BD) e adquiridas em um Attune NXT com um leitor de placas. Em solução, ambas as moléculas têm atividade e seletividade comparáveis entre Treg e Teff. As placas revestidas com MAdCAM de camundongo foram capazes de capturar a molécula biespecífica do Exemplo 15 e a molécula biespecífica capturada/imobilizada ainda era capaz de ativar seletivamente Tregs em relação a Teffs. Este exemplo demonstra que as moléculas de IL-2M unidas à MAdCAM podem reter a atividade biológica e a seletividade quando em solução ou quando capturadas/imobilizadas.

EXEMPLO 18: IMUNOGENICIDADE DE MUTEÍNAS DE IL-2

[0873] As sequências de muteína de IL-2 foram analisadas usando o software NetMHCIIpan 3.2, o qual pode ser encontrado em [www "dot" cbs "dot" dtu "dot"](http://www.imm.cbs.dtu.dk)

dk/services/NetMHCIIpan /. Redes neurais artificiais foram usadas para determinar a afinidade peptídica aos alelos de MHC classe II. Nesta análise, peptídeos de 9 resíduos com interação potencialmente direta com as moléculas do MHC de classe II foram reconhecidos como núcleos de ligação. Os resíduos adjacentes aos núcleos de ligação, com potencial para influenciar indiretamente a ligação, também foram examinados como resíduos de mascaramento. Peptídeos que compreendem tanto núcleos de ligação como resíduos de mascaramento foram marcados como ligantes fortes quando sua K_D prevista para a molécula do MHC de classe II era menor do que 50 nM. Ligantes fortes têm maior chance de introduzir imunogenicidade de células T.

[0874] Um total de 9 alelos de MHCII que são altamente representados na América do Norte e na Europa foram incluídos na análise *in silico*. O painel das moléculas de IL-2M (muteína de IL-2) testadas incluía as muteínas de IL-2 com mutações L53I, L56I, L80I ou LI18I. Somente os alelos do MHCII DRB1_1101, DRB1_1501, DRB1_0701 e DRB1_0101 produziram acertos com qualquer uma das moléculas avaliadas. Os acertos peptídicos para DRB1_1501 foram idênticos entre todas as construções testadas, incluindo IL-2 de tipo selvagem com a mutação C125S. A adição de L80I remove o epítipo de 1 célula T para DRB1-0101 [ALNLAISKNFHLRPR] e reduz modestamente a

afinidade de dois outros epítomos de célula T [EEALNLAPSKNFHLR e EALNLAPSKNFHLRP]. Para o alelo do MHCII DRB1_0701, L80I remove o epítomo de 1 célula T [EEALNLAPSKNFHLR]. Portanto, os dados demonstram que uma muteína de IL-2 que compreende a mutação L80I deve ser menos imunogênica, o que é um resultado surpreendente e inesperado da análise *in silico*.

EXEMPLO 19: GERAÇÃO DE MUTEÍNAS DE IL-2 ADICIONAIS

[0875] Um vetor pTT5 contendo o gene exclusivo que codifica o polipeptídeo de IL-2M (muteína de IL-2) de SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (e controle de IL-2M; SEQ ID NO: 50) com IL-2M humana fundido no N-terminal do domínio Fc de IgG1 humana foi transfectado para células HEK293 Expi. Após 5-7 dias, os sobrenadantes da cultura de células que expressam SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (e controle de IL-2M; SEQ ID NO: 50) foram coletados e clarificados por meio de centrifugação e filtração através de um dispositivo de filtração de 0,22 µm. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (e controle de IL-2M; SEQ ID NO: 50) foram capturadas em resina proA. A resina foi lavada com PBS, pH de 7,4, e a proteína capturada foi eluída usando ácido acético a 0,25%, pH de 3,5, com neutralização usando um décimo do volume de Tris a 1M, pH de 8,0. O tampão da

proteína foi trocado para HEPES a 30 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7, e a proteína analisada por meio cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Superdex 200 3.2/300. Análise de 5 µg do material purificado foi realizada por SDS-PAGE redutora e não redutora em um gel de Bis-Tris a 4-12%.

[0876] IL-2M de SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (e controle de IL-2M; SEQ ID NO: 50) é expressa em mais de 45 mg/L e acima de 95% de monodispersão após purificação, conforme mostrado pela cromatografia de exclusão por tamanho e SDS-PAGE redutora/não redutora.

EXEMPLO 20: IL-2MS DO EXEMPLO 19 PODEM SE LIGAR À CD25

[0877] Uma placa imunossorvente foi revestida com CD25 em uma concentração de 0,5 µg/mL em PBS, pH de 7,4, 75 µl/cavidade e incubada de um dia para o outro a 4°C. As cavidades foram lavadas com PBS, pH de 7,4, que contém Tween-20 a 0,05% (tampão de lavagem) três vezes e depois bloqueadas com 200 µl/cavidade de BSA a 1% em PBS, pH de 7,4 (tampão de bloqueio) durante duas horas em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, IL-2Ms SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 foram diluídas para diluição em onze e duas vezes em série em PBS que contém BSA a 1% e Tween-20 a 0,05% (tampão de ensaio), com 2 nM sendo a concentração mais alta. O material diluído foi

adicionado à placa revestida com CD25 a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, um anticorpo policlonal anti-IL-2 biotinilado de cabra, diluído para 0,05 µg/mL em tampão de ensaio, foi adicionado à placa a 75 µl/cavidade durante 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, estreptavidina HRP de alta sensibilidade diluída em tampão de ensaio a 1:5000 foi adicionada à placa a 75 µl/cavidade durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem e 1 lavagem com tampão de lavagem (sem Tween-20), o ensaio foi revelado com TMB e interrompido com HCl a 1 N. A OD 450 nm foi medida. O experimento incluía controles apropriados para ligação não específica das moléculas à placa/bloco na ausência de CD25. Os resultados indicam que, em concentrações de 2 nM-1,9 pM, as muteínas do Exemplo 19 foram capazes de se ligar à CD25 com EC₅₀s sub-nanomolares. Além disso, não houve detecção de nenhum composto em nenhuma concentração testada quando a CD25 não estava presente sobre a superfície da placa, indicando que nenhum dos compostos de teste estava interagindo não especificamente com a superfície da placa. Assim, as muteínas do Exemplo 19 podem se ligar à CD25.

EXEMPLO 21: MUTEÍNAS DE IL-2 DO EXEMPLO 19 SÃO POTENTESE SELETIVAS

[0878] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram preparadas usando tubos FICOLL-PAQUE Premium e Sepmate a partir de sangue total humano heparinizado recentemente isolado. As PBMCs foram cultivadas em meio RPMI com soro bovino fetal a 10% na presença de IL-2 de tipo selvagem ou das muteínas do Exemplo 19 durante 20 minutos e depois fixadas por 10 minutos com BD Cytotfix. As células fixadas foram permeabilizadas sequencialmente com BD Perm III e depois com o tampão de permeabilização BioLegend FOXP3. Após bloqueio com soro humano durante 10 minutos, as células foram coradas por 30 minutos com anticorpos para fosfo-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FO25P3 AF647 e CD4 PerCP Cy5.5 (todos BD) e depois adquiridas em um Attune NXT com um leitor de placas. Descobriu-se que as muteínas de IL-2 do Exemplo 19 eram potentes e tinham seletividade contra Treg versus Teff. Descobriu-se que a muteína que compreende a mutação L118I tinha atividade e seletividade aumentadas comparado com as outras muteínas.

EXEMPLO 22: MUTEÍNAS DE IL-2 EXPANDEM TREGS EMCAMUNDONGOS HUMANIZADOS

[0879] Camundongos NSG humanizados com células-tronco hematopoiéticas CD34+ humanas foram adquiridos da Jackson

Labs. Nos dias 0 e 7, os camundongos foram dosados por via subcutânea com 1 µg de muteína de IL-2 (SEQ ID NO: 50) ou outras muteínas de IL-2 SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 ou SEQ ID NO: 56. No dia 7, os camundongos foram sacrificados e o sangue total e o baço foram coletados. O sangue total foi dividido em alíquotas em uma placa com 96 cavidades de profundidade e fixado por 10 minutos usando BD Fix Lyse. Os esplenócitos foram isolados usando filtros de 70 µm (BD) e os glóbulos vermelhos foram submetidos à lise usando tampão de lise RBC da BioLegend. Após lavagem com soro fetal bovino a 2% em PBS, os esplenócitos foram marcados com corante Near Infrared Live Dead (Invitrogen) durante 20 minutos e depois fixados por 20 minutos usando o tampão de fixação BioLegend. Tanto células de sangue integral como esplenócitos foram, então, permeabilizados usando tampão de permeabilização BioLegend FOXP3, bloqueados com soro humano e corados durante 30 minutos com anticorpos contra CD8a FITC (BL), CD25 PE humano (BD), FOXP3 AF647 (BD) CD4 PerCP Cy5.5 (BD), Siglec humano-8 PE Cy7 (BL), CD3 BV421 humano (BL), CD45 BV605 humano (BL), CD56 BV785 humano (BL) e CD45 de camundongo e CD45 (BV711) e adquiridos em um Attune NXT com leitor de placas.

[0880] Comparado com o controle de veículo, as IL-2Ms SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 56 induziram seletivamente a Tregs

no baço de camundongo e no sangue total ($p < 0,0005$ por ANOVA com o teste de comparação múltipla de Dunnet). As outras IL-2Ms também aumentaram a frequência de Tregs, embora estas alterações, comparado com o grupo com veículo, não tenham sido estatisticamente significativas. Não houve alterações significativas nas frequências de células NK CD56pos, células T CD3pos, linfócitos T citotóxicos CD8pos, células T auxiliares CD4pos ou células T efectoras CD25lo/FOXP3neg em camundongos tratados com SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 56. Estes resultados demonstram que as muteínas de IL-2 aumentam a frequência de células T reguladoras.

EXEMPLO 23: GERAÇÃO DE MOLÉCULA BIESPECÍFICA DE IL-2M

UNIDA À mMAdCAM

[0881] Foi produzida uma muteína biespecífica de MAdCAM-IL-2, com o anticorpo sendo as cadeias pesada e leve de MECA89. Isto foi produzido usando dois plasmídeos que codificam cadeias pesadas e leves que foram cotransfectados em proporções equimolares. O primeiro plasmídeo codificava a cadeia leve de MECA-89 e o segundo codificava a cadeia pesada de IgG1 de comprimento completo de MECA-89 com o C-terminal fundido com uma IL-2M humana que compreende a mutação L118I. Após 3-5 dias, os sobrenadantes da cultura de células que expressam a molécula biespecífica foram coletados e clarificados por meio de centrifugação e

filtração através de um dispositivo de filtração de 0,22 µm. A molécula biespecífica foi capturada em resina proA. A resina foi lavada com PBS, pH de 7,4, e a proteína capturada foi eluída usando ácido acético a 0,25%, pH de 3,5, com neutralização usando um décimo do volume de Tris a 1M, pH de 8,0. O tampão da proteína foi trocado para HEPES a 30 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7, e a proteína analisada por meio de cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna AdvanceBio SEC. Análise de 1 µg do material purificado foi realizada por SDS-PAGE redutora e não redutora em um gel de Bis-Tris a 4-12%.

[0882] A molécula biespecífica foi expressa a 17 mg/L e era mais de 95% monodispersa após purificação, conforme mostrado pela cromatografia de exclusão por tamanho e SDS-PAGE redutora/não redutora. Estes resultados demonstram que era possível produzir moléculas biespecíficas de dupla função com imunomoduladores no C-terminal.

EXEMPLO 24: GERAÇÃO DE ANTICORPOS MAdCAM

[0883] Uma biblioteca de fagos scFv de anticorpo humano foi analisada contra proteínas MAdCAM humanas, de camundongo e cyno recombinantes em ciclos de seleção iterativos para enriquecer clones de anticorpos que reconhecem todos os três ortólogos de espécies de MAdCAM mencionados anteriormente. Os clones de scFv foram

configurados no formato nt-VH-Ligante-VL-ct e fundidos à superfície do fago M13 através da proteína de revestimento pIII. Após as seleções, os scFvs clonais foram rastreados por ELISA quanto à ligação à MAdCAM humana, de camundongo e cyno expressa sobre a superfície celular de células CHO. Os clones que mostraram reação cruzada com os três ortólogos das espécies de MAdCAM expressos sobre a superfície celular foram convertidos, usando técnicas padrão de biologia molecular ou síntese gênica, em um formato de IgG1 humana em que cada molécula era composta por quatro cadeias polipeptídicas no total (2 cadeias pesadas e 2 leves). As duas cadeias leves eram idênticas uma à outra e as duas cadeias pesadas eram idênticas uma à outra. As duas cadeias pesadas idênticas (1 e 2) homodimerizam e as duas cadeias leves idênticas (3 e 4) emparelham com cada cadeia pesada para formar uma IgG1 humana intacta. O domínio Fc contém as mutações L234A, L235A e G237A para eliminar as interações com o FcγR. O formato pode ser ilustrado da seguinte maneira:

Cadeia 1: nt-VH1-CH1-CH2-CH3-ct

Cadeia 2: nt-VH1-CH1-CH2-CH3-ct

Cadeia 3: nt-VK1-CK-ct

Cadeia 4: nt-VK1-CK-ct

[0884] Além disso, os scFvs MAdCAM também foram convertidos usando técnicas padrão de biologia molecular

(tal como o procedimento de Clonagem de Gibson) ou síntese gênica em um formato biespecífico, pelo qual uma IL-2M estava localizada no C-terminal da cadeia pesada de IgG do anticorpo MAdCAM, conforme destacado abaixo:

Cadeia 1: nt-VH1-CH1-CH2-CH3-ct-Ligante-IL-2M

Cadeia 2: nt-VH1-CH1-CH2-CH3-ct-Ligante-IL-2M

Cadeia 3: nt-VK1-CK-ct

Cadeia 4: nt-VK1-CK-ct

[0885] Um ELISA foi usado para analisar a ligação de scFvs anti-MAdCAM à MAdCAM humana, de cyno e camundongo capturada ou ligada à placa. A MAdCAM humana biotinilada e de cyno foi capturada em uma placa revestida com estreptavidina e a MAdCAM-Fc de camundongo revestida diretamente em uma placa imunossorvente. Após uma etapa de bloqueio, as placas foram lavadas e o scFv no lisato periplásmico bruto foi aplicado à superfície da placa. A ligação ao scFv foi detectada usando um conjugado anti-V5 HRP. O ensaio foi revelado com substrato TMB e interrompido com ácido. A absorbância a 450 nm foi medida. Foram aplicadas etapas de lavagem apropriadas entre cada etapa do ELISA. Humano versus cyno e humano versus camundongo foram avaliados. Os scFv's também foram analisados usando a tecnologia de ressonância plasmônica em superfície. Após ser capturada em uma superfície de um biossensor por meio do

marcador V5, a MAdCAM humana monomérica solúvel foi titulada e a ligação e a dissociação foram medidas e ajustadas a um modelo de ligação a 1:1, permitindo a derivação das taxas de ativação e desativação.

[0886] Os resultados medidos indicam que a maioria dos clones testados tem reatividade cruzada de ligação à MAdCAM humana e de cyno e um pequeno painel tem reatividade cruzada adicional à MAdCAM de camundongo. Experimentos com biossensores demonstraram que os clones exibiram uma faixa de taxas de ativação e desativação de ligação contra MAdCAM humana com valores de k_a que vão desde 10^3 l/Ms a 10^7 l/Ms e valores de k_d que variam a partir de 10^{-1} a 10^{-4} l/s. Determinados clones têm uma taxa de desativação menor do que 2×10^2 l/s, portanto, anticorpos MadCAM foram gerados e podem ser usados em um formato biespecífico.

EXEMPLO 25: GERAÇÃO DE IL-2Ms UNIDAS À MAdCAM DO EXEMPLO 19 HUMANAS BIESPECÍFICAS

[0887] Dois plasmídeos foram, cada um, cotransfectados em proporções equimolares. O primeiro plasmídeo, em cada caso, codificava a cadeia leve de Hu.MAdCAM e o segundo codificava a cadeia pesada de IgG1 de Hu.MAdCAM com uma IL-2M humana fundida no C-terminal que compreende a mutação L118I, conforme ilustrado na Tabela de Compostos Biespecíficos de MAdCAM-Muteína de IL-2 fornecida aqui. Após

3-5 dias, os sobrenadantes da cultura de células que expressam as construções biespecíficas Hu.MAdCAM-IL-2M foram coletados e clarificados por meio de centrifugação e filtração através de um dispositivo de filtração de 0,22 µm. As construções biespecíficas Hu.MAdCAM-IL-2M foram capturadas em uma resina proA. A resina foi lavada com PBS, pH de 7,4, e as proteínas capturadas foram eluídas usando ácido acético a 0,25%, pH de 3,5, com neutralização usando um décimo do volume de Tris a 1M, pH de 8,0. O tampão das proteínas foi trocado para HEPES a 30 mM, NaCl a 150 mM, pH de 7, e as proteínas analisadas por meio de cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna AdvanceBio SEC. Análise de 1 µg do material purificado foi realizada por SDS-PAGE redutora e não redutora em um gel de Bis-Tris a 4-12%. As construções biespecíficas Hu.MAdCAM-IL-2M foram expressas acima de 10 mg/L e eram mais de 95% monodispersas após purificação, conforme mostrado pela cromatografia de exclusão por tamanho e SDS-PAGE redutora/não redutora. Assim, estes resultados demonstram que moléculas biespecíficas de dupla função totalmente humanas com imunomoduladores no C-terminal podem ser produzidas.

EXEMPLO 26: DURABILIDADE DA SINALIZAÇÃO INDUZIDA POR MUTEÍNAS DE IL-2

[0888] Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram preparadas usando tubos FICOLL-PAQUE Premium e Sepmate a partir de sangue total humano heparinizado recentemente isolado. As PBMCs foram cultivadas em meio RPMI de soro bovino fetal a 10% na presença de IL-2Ms durante 60 minutos. As células foram, então, lavadas 3 vezes e incubadas por mais 3 horas. As células foram, então, fixadas durante 10 minutos com BD Cytofix. As células fixas foram permeabilizadas sequencialmente com BD Perm III e depois tampão de permeabilização BioLegend FOXP3. Após bloqueio com soro humano durante 10 minutos, as células foram coradas por 30 minutos com anticorpos para FITC fosfo-STAT5, CD25 PE, FOXP3 AF647 e CD4 PerCP Cy5.5 e depois adquiridas em um Attune NXT com um leitor de placas. Todas as quatro muteínas de IL-2 do Exemplo 19 induziram à sinalização durável em Tregs, mas não em Teffs, comparado com o controle. Uma muteína de IL-2 de SEQ ID NO: 56 é superior a uma muteína de IL-2 de SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 54 ou SEQ ID NO: 53. Estes resultados demonstram que a IL-2 pode induzir à resistência e sinalização seletiva em Tregs, o que deve levar a uma maior expansão de Tregs *in vivo* e permitir doses menos frequentes para alcançar a expansão de Tregs.

EXEMPLO 27: ENSAIO P-STAT5 IN VITRO DEMONSTRA ATIVIDADE
E SELETIVIDADE DE MUTEÍNAS DE IL-2 BIESPECÍFICAS UNIDAS A
HU.MADCAM QUANDO EM SOLUÇÃO OU QUANDO UNIDAS

[0889] A MAdCAM humana recombinante foi revestida em cavidades de uma placa de elevada ligação com 96 cavidades (Corning) de um dia para o outro. Após lavagem 2 vezes com PBS, a placa foi bloqueada durante 1 hora com meio RPMI/FBS a 10%. As especificidades biespecíficas da muteína de IL-2M unida à MAdCAM ou o controle de IL-2M não unido foram capturadas durante 1 hora. Após lavagem 2 vezes com PBS, PBMCs humanas recentemente isoladas foram estimuladas durante 60 minutos com IL-2MM capturada ou, para comparação, IL-2MM em solução. As células foram, então, fixadas durante 10 minutos com BD Cytotfix, permeabilizadas sequencialmente com tampão de permeabilização BD Perm III e BioLegend FOXP3, bloqueadas com soro humano e coradas por 30 minutos com anticorpos contra fosfo-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FOXP3 AF647 e CD4 PerCP Cy5.5 (BD) e adquiridas em um Attune NXT com um leitor de placas.

[0890] Resultados: Em solução, as biespecificidades de IL-2M unida à MAdCAM humana e o controle têm atividade e seletividade comparáveis entre Treg e Teff. Placas revestidas com MAdCAM foram capazes de capturar moléculas biespecíficas, e as moléculas biespecíficos capturadas/

imobilizadas ainda eram capazes de ativar seletivamente Tregs em relação a Teffs. Este exemplo demonstra que as moléculas biespecíficas de IL-2MM unidas à MAdCAM humana podem reter a atividade biológica e a seletividade quando em solução ou quando capturadas/imobilizadas.

[0891] Os exemplos fornecidos aqui demonstram o resultado surpreendente e inesperado de que uma molécula biespecífica que compreende um anticorpo MAdCAM e uma muteína de IL-2 pode funcionar para ativar seletiva e potentemente Tregs em relação a Teffs, o que demonstra que as moléculas podem ser usadas para tratar ou melhorar as condições descritas aqui. Os exemplos também demonstram que a muteína de IL-2 pode funcionar para ativar Tregs de maneira seletiva e potente em relação a Teffs quando usada individualmente (ou ligada a uma proteína Fc), conforme fornecido aqui. As descrições de toda e qualquer patente, pedido de patente e publicação citados aqui são incorporadas por referência na íntegra. Embora várias modalidades tenham sido descritas com referência a aspectos específicos, é evidente que outros aspectos e variações destas modalidades podem ser concebidos por aqueles versados na técnica sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo das modalidades. As reivindicações anexas devem ser interpretadas para incluir todos estes aspectos e variações equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo que compreende uma porção de alvejamento que se liga a uma célula-alvo e uma porção de ligação/modulação efetora **caracterizado por** a porção de ligação/modulação efetora ser um polipeptídeo de muteína de IL-2 (muteína de IL-2).

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a porção de alvejamento compreender um anticorpo que se liga a uma proteína alvo sobre a superfície de uma célula alvo.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o anticorpo ser um anticorpo que se liga à MAdCAM, OAT1, OCT2, FXD2, TSPAN7, DPP6, HEPACAM2, TMEM27 ou GPR119.

4. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a muteína de IL-2 se ligar a um receptor expresso por uma célula imune.

5. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a célula imune contribuir para uma resposta imune indesejada.

6. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a célula imune causar uma patologia de doença.

7. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a porção de alvejamento compreender um anticorpo anti-MAdCAM.

8. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o composto ter a fórmula, a partir do N-terminal para o C-terminal:

R1 --- Região Ligante A --- R2 ou R3 --- Região Ligante B --- R4,

em que:

R1, R2, R3 e R4, compreendem, cada um independentemente, a porção de ligação/modulação efetora, a porção de alvejamento ou está(ão) ausente(s).

9. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** cada uma da região Ligante A e região Ligante B compreender uma região Fc.

10. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** um de R1 e R2 ser um anticorpo de muteína de IL-2 e um de R1 e R2 ser um anticorpo anti-MAdCAM.

11. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** R1 ser muteína de IL-2 e R2 ser um anticorpo anti-MAdCAM.

12. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** R1 ser anticorpo anti-MAdCAM e R2 ser um anticorpo anti-PD-1.

13. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** um de R3 e R4 ser a muteína de IL-2 e um de R3 e R4 ser um anticorpo anti-MAdCAM.

14. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** R3 ser a muteína de IL-2 e R4 ser um anticorpo anti-MAdCAM.

15. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** R3 ser um anticorpo anti-MAdCAM e um R4 ser a muteína de IL-2.

16. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 15, **caracterizado por** o ligante estar ausente.

17. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 15, **caracterizado por** o ligante ser uma região Fc.

18. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 15, **caracterizado por** o ligante ser um ligante de glicina/serina.

19. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** o ligante ser GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS ou GGGGS.

20. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma sequência de IL-2 da SEQ ID NO: 6, em que o peptídeo compreende uma

mutação em uma posição que corresponde à posição 53, 56, 80 ou 118 da SEQ ID NO: 6.

21. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma sequência de IL-2 da SEQ ID NO: 6, em que o peptídeo compreende uma mutação em uma posição que corresponde à posição 53, 56, 80 ou 118 de SEQ ID NO: 6.

22. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado por** a mutação ser uma mutação de L para I na posição 53, 56, 80 ou 118.

23. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado por** a mutação ser uma mutação de L para I na posição 53, 56, 80 ou 118.

24. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, 20 ou 23, **caracterizado por** compreender ainda uma mutação em uma ou mais das posições 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 e 125 na SEQ ID NO: 6.

25. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, **caracterizado por** a muteína compreender ainda uma mutação em uma ou mais das posições E15, H16, Q22, D84, E95 ou Q126 ou 1, 2, 3, 4, 5 ou cada uma das posições E15, H16, Q22, D84, E95 ou Q126 ser de tipo selvagem.

26. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **caracterizado por** a mutação na muteína ser uma ou mais de E15Q, H16N, Q22E, D84N, E95Q ou Q126E.

27. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação N29S na SEQ ID NO: 6.

28. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação Y31S ou Y51H.

29. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação K35R.

30. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação T37A.

31. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação K48E.

32. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 31, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação V69A.

33. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação N71R.

34. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação Q74P.

35. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação N88D ou N88R.

36. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, **caracterizado por** a muteína compreender uma mutação C125A ou C125S.

37. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, **caracterizado por** a muteína de IL-2 estar fundida ou ligada a um peptídeo de Fc.

38. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado por** o peptídeo de Fc compreender uma mutação em uma ou mais das posições L234, L247, L235, L248, G237 e G250.

39. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado por** a mutação ser L para A ou G para A.

40. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado por** o peptídeo de Fc compreender as mutações L247A, L248A e G250A.

41. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado por** o peptídeo de Fc compreender uma mutação L234A, uma mutação L235A e/ou uma mutação G237A.

42. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma primeira cadeia e uma segunda cadeia que formam o polipeptídeo, em que:

a primeira cadeia compreende:

V_H - H_C -Ligante- C_1 , em que V_H é um domínio pesado variável que se liga à célula alvo com um domínio V_L da segunda cadeia; H_C é uma cadeia pesada de anticorpo que compreende domínios $CH1$ - $CH2$ - $CH3$, o ligante é um ligante de glicina/serina e C_1 é uma muteína de IL-2 fundida com uma proteína Fc tanto na orientação N-terminal ou C-terminal; e

a segunda cadeia compreende:

V_L - L_C , em que V_L é um domínio variável de cadeia leve que se liga à célula alvo com o domínio V_H da primeira cadeia e o domínio L_C é um domínio C_K de cadeia leve.

43. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado por** os domínios V_H e V_L serem domínios variáveis anti-MAdCAM que se ligam à MAdCAM expressa em uma célula.

44. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma mutação em uma posição que corresponde às posições 53, 56, 80 ou 118 da SEQ ID NO: 6.

45. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado por** a mutação ser uma mutação de L para I na posição 53, 56, 80 ou 118.

46. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado por** a muteína compreender ainda uma mutação em uma posição que corresponde à posição 69, 75, 88 ou 125 ou qualquer combinação das mesmas.

47. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado por** compreender uma mutação selecionada a partir do grupo que consiste em uma de L53I, L56I, L80I e L118I e as mutações de V69A, Q74P, N88D ou N88R e, opcionalmente, C125A ou C125S.

48. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma mutação L53I.

49. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma mutação L56I.

50. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma mutação L80I.

51. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** a muteína de IL-2 compreender uma mutação L118I.

52. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** a muteína de IL-2 ser isenta de quaisquer outras mutações.

53. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** a proteína Fc compreender as mutações L247A, L248A e G250A ou uma mutação L234A, uma mutação L235A e/ou uma mutação G237A de acordo com a numeração de KABAT.

54. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado por** o ligante compreender uma sequência GGGGSGGGGSGGGGS ou GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

55. Polipeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, **caracterizado por** compreender um peptídeo de Fc que compreende uma sequência descrita aqui.

56. Método de tratamento de um indivíduo com doença inflamatória intestinal **caracterizado por** compreender administrar um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 ao indivíduo para tratar a doença inflamatória intestinal.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado por** o indivíduo com doença inflamatória intestinal ter doença de Crohn.

58. Método, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado por** o indivíduo com doença inflamatória intestinal ter colite ulcerativa.

59. Método de tratamento de um indivíduo com hepatite autoimune **caracterizado por** compreender administrar um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 ao indivíduo para tratar a hepatite autoimune.

60. Método de tratamento de colangite esclerosante primária **caracterizado por** compreender administrar um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 ao indivíduo para tratar a colangite esclerosante primária.

61. Método de tratamento de diabetes tipo 1 **caracterizado por** compreender administrar um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 ao indivíduo para tratar a diabetes tipo 1.

62. Método de tratamento de um indivíduo transplantado **caracterizado por** compreender administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 ao indivíduo, tratando, assim, o indivíduo transplantado (receptor).

63. Método de tratamento de GVHD em um indivíduo que transplantou um tecido de doador **caracterizado por** compreender administrar uma quantidade terapeuticamente

eficaz de um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 ao indivíduo.

64. Método de tratamento de um indivíduo que tem, ou está em risco ou risco elevado de ter, um transtorno autoimune **caracterizado por** compreender administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55, tratando, assim, o indivíduo.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 56 a 64, **caracterizado por** o indivíduo ter um transtorno autoimune e o composto terapêutico carecer de um peptídeo ou polipeptídeo autoantigênico característico do transtorno autoimune, por exemplo, carecer de um peptídeo ou polipeptídeo contra o qual o indivíduo tem autoanticorpos.

66. Ácido nucleico **caracterizado por** codificar um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55.

67. Vetor **caracterizado por** compreender o ácido nucleico como definido na reivindicação 65.

68. Célula **caracterizada por** compreender o ácido nucleico como definido na reivindicação 66 ou o vetor como definido na reivindicação 67.

68. Método para preparação de um composto terapêutico **caracterizado por** compreender cultivar uma célula como

definida na reivindicação 67 para preparar o composto terapêutico.

69. Método para preparar uma sequência de ácido nucleico que codifica um composto terapêutico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 55 **caracterizado por** compreender:

a) fornecer um vetor que compreende a sequência que codifica uma porção de alvejamento e inserir, no vetor, sequência que codifica uma porção de ligação/modulação efetora para formar uma sequência que codifica um composto terapêutico; ou

b) fornecer um vetor que compreende a sequência que codifica uma porção de ligação/modulação efetora e inserir, no vetor, sequência que codifica uma porção de alvejamento para formar uma sequência que codifica um composto terapêutico,

formando, assim, uma sequência que codifica um composto terapêutico.

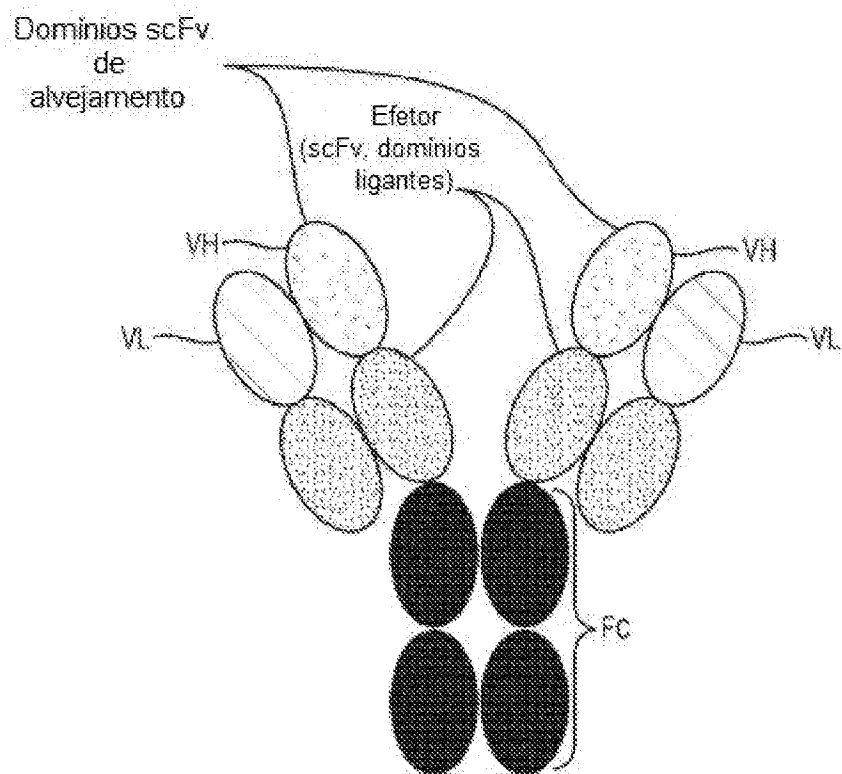


FIGURA 1

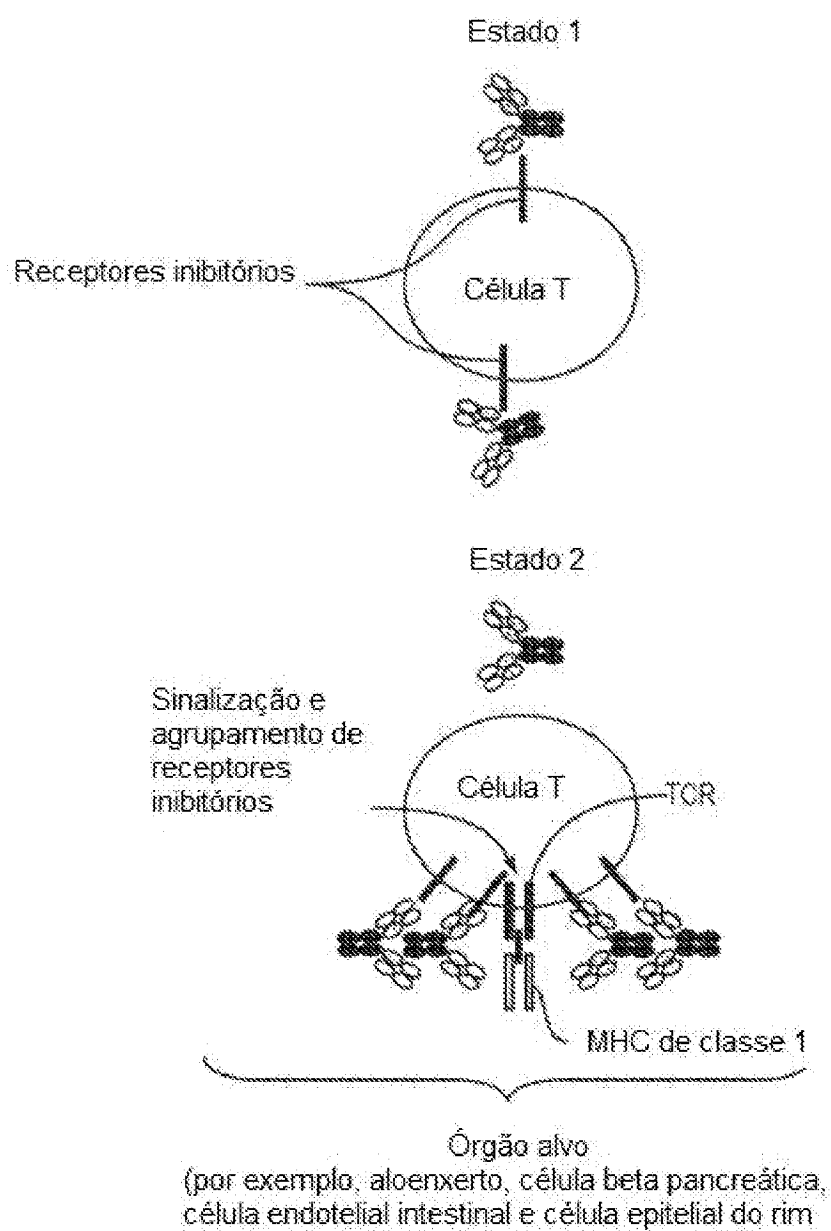


FIGURA 2

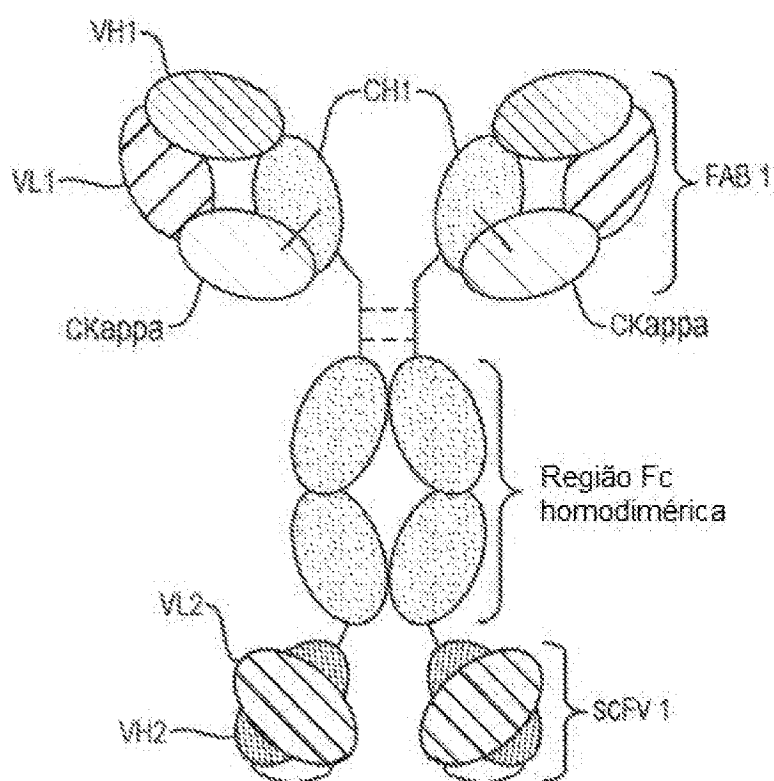


FIGURA 3

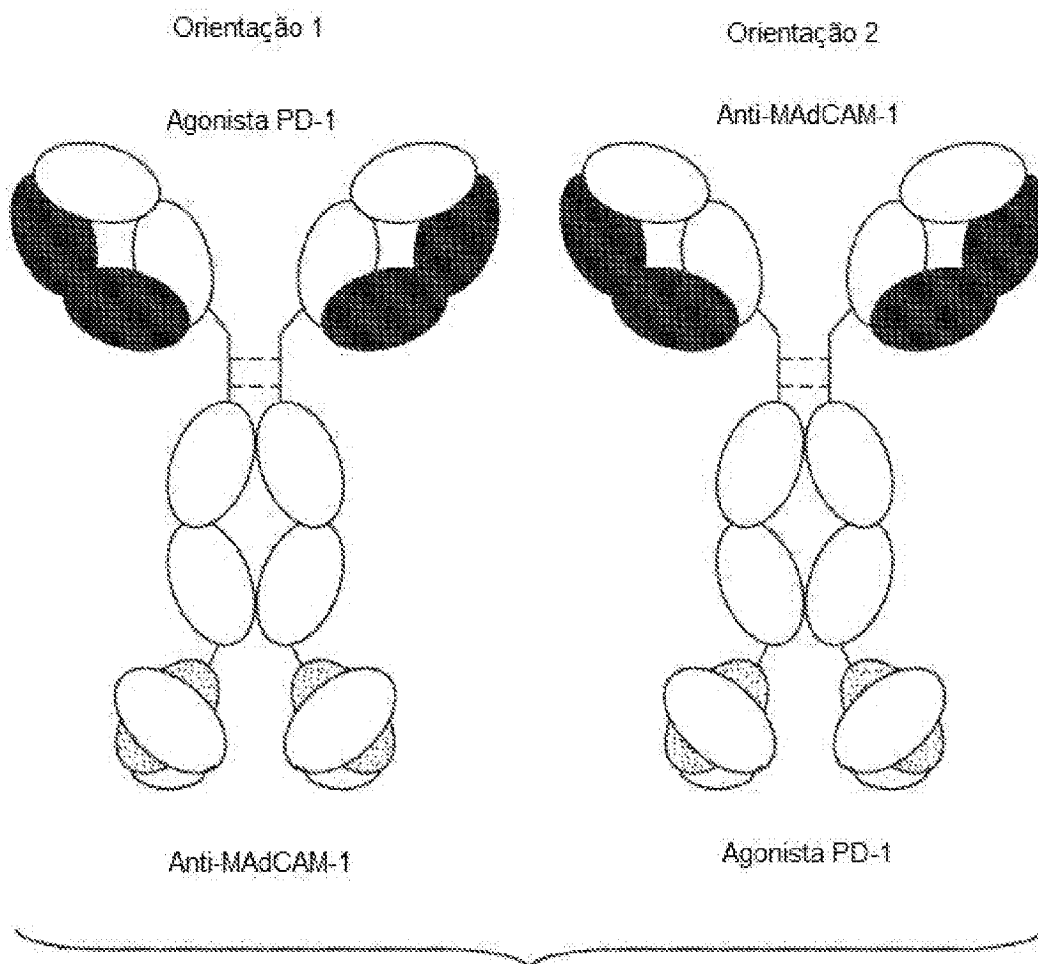


FIGURA 3A

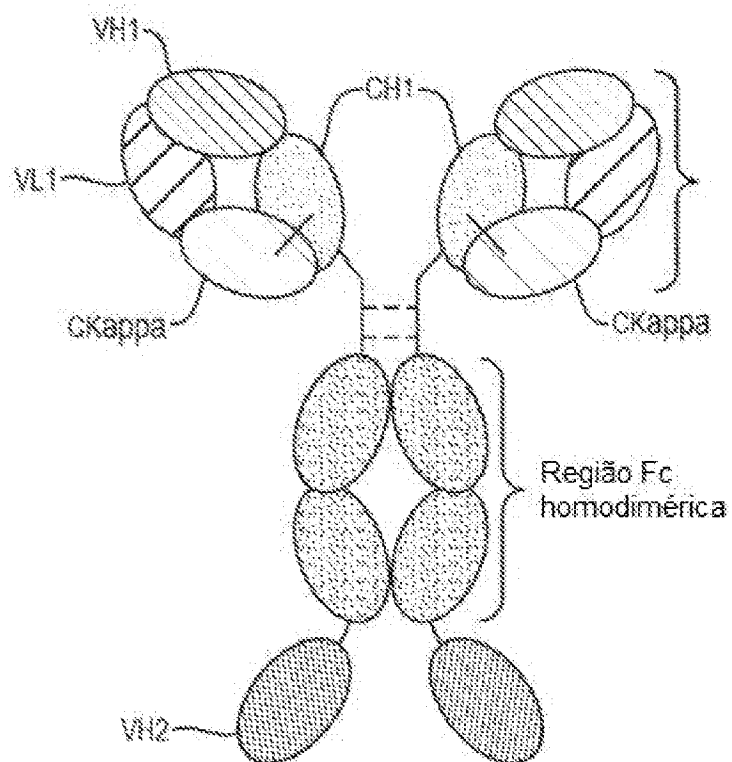


FIGURA 4

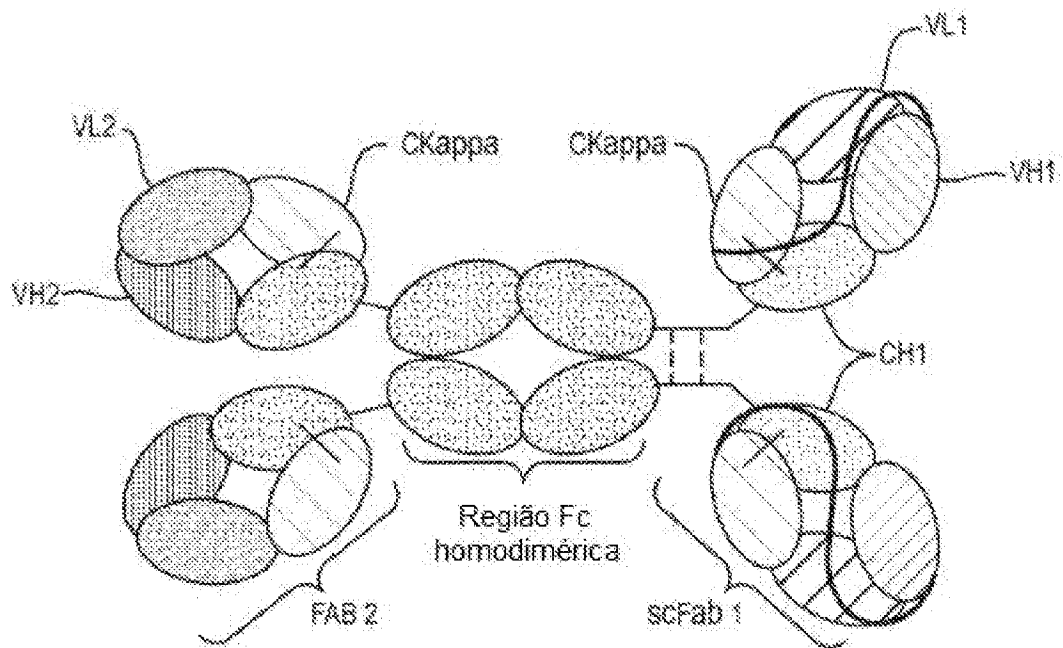


FIGURA 5

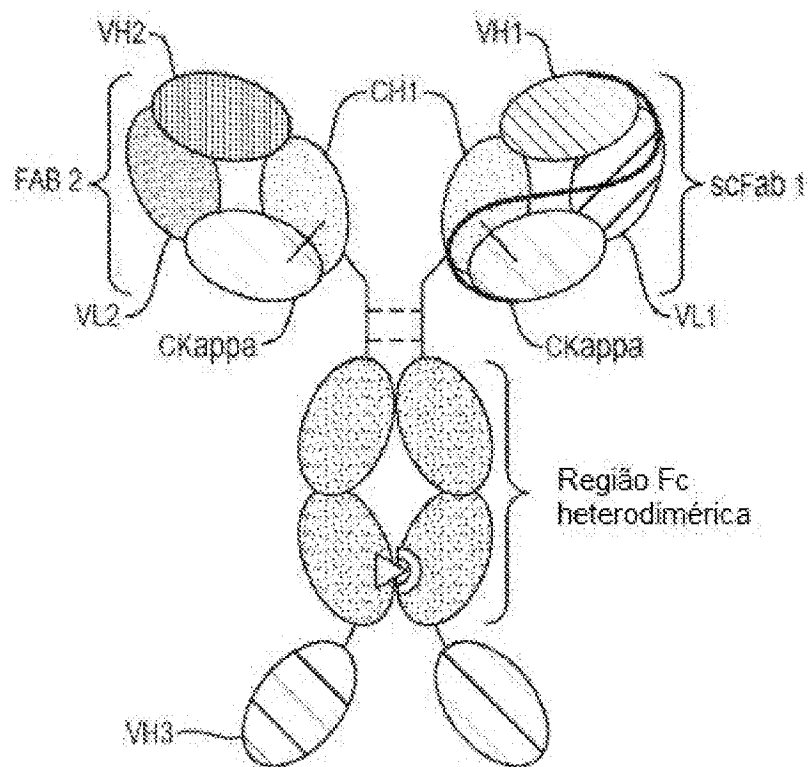


FIGURA 6

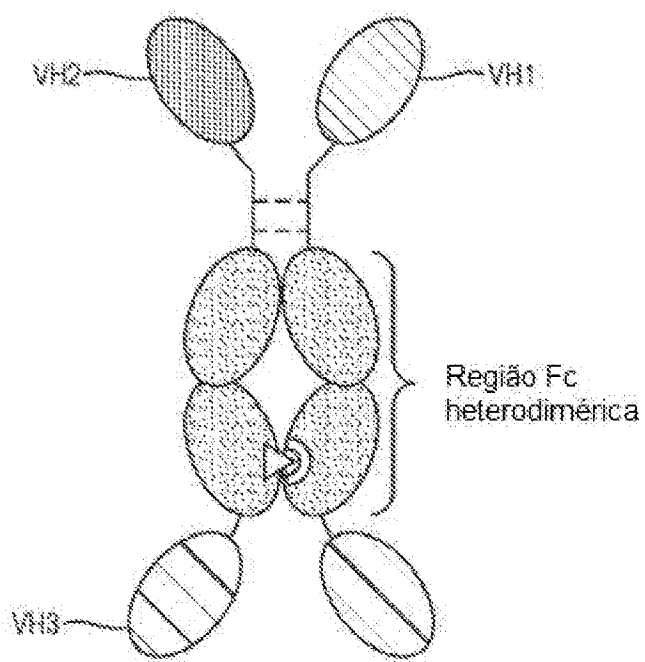


FIGURA 7

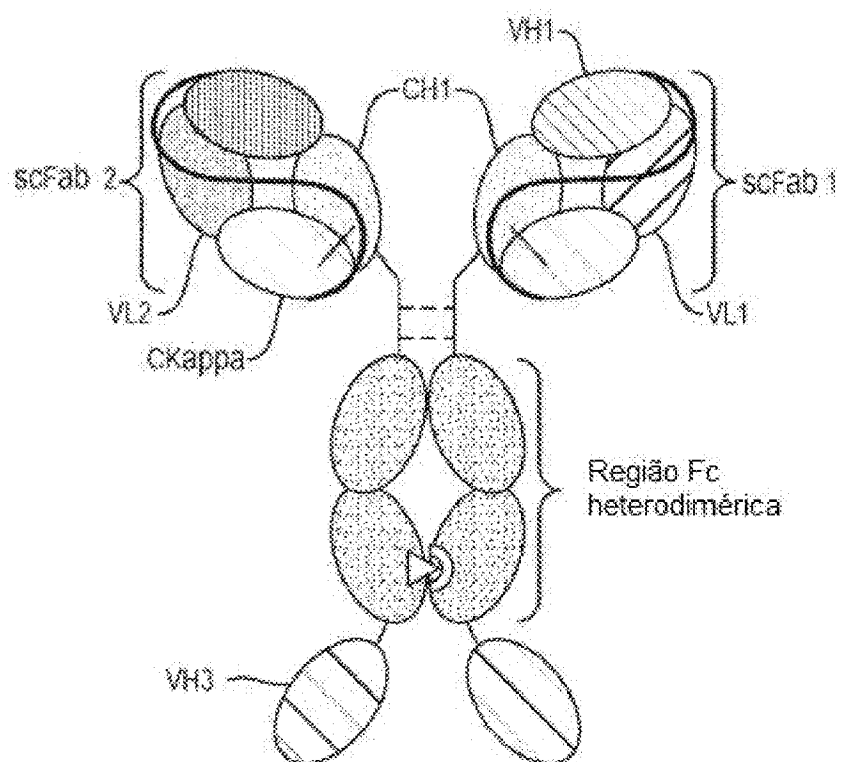


FIGURA 8

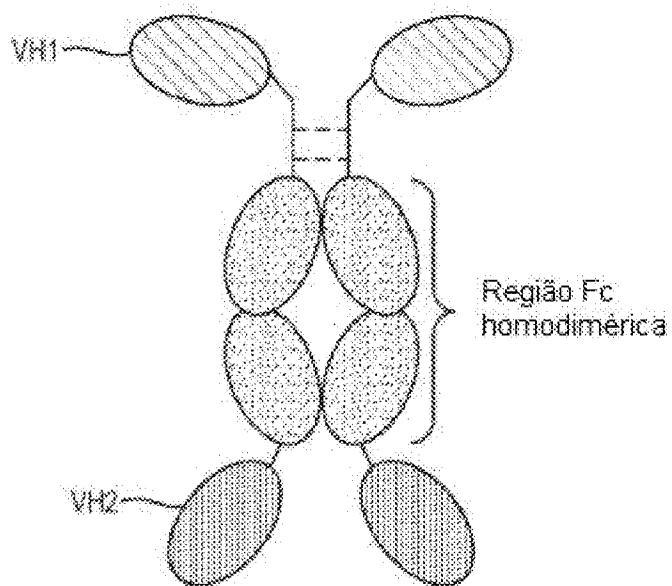


FIGURA 9

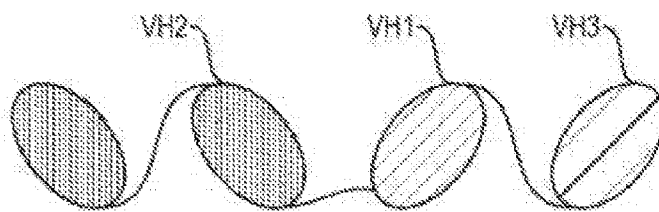


FIGURA 10

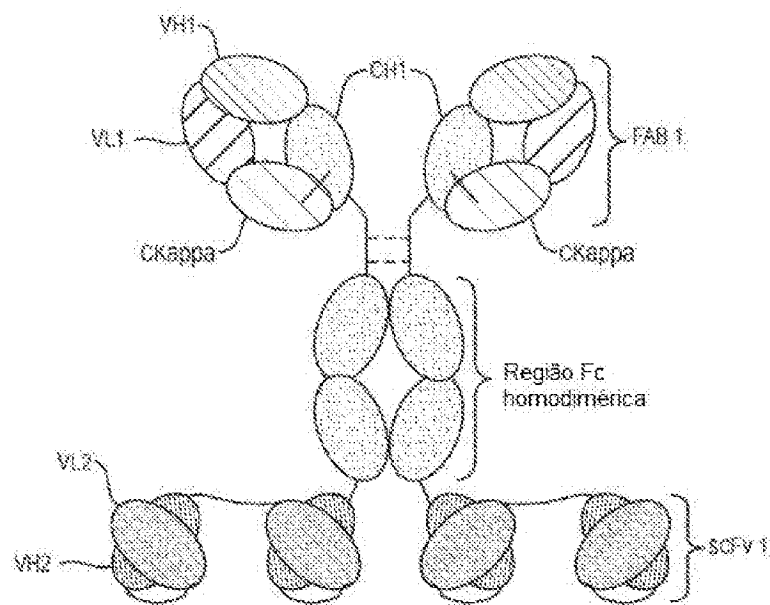


FIGURA 11

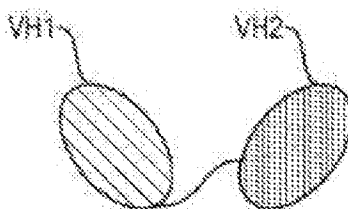


FIGURA 12

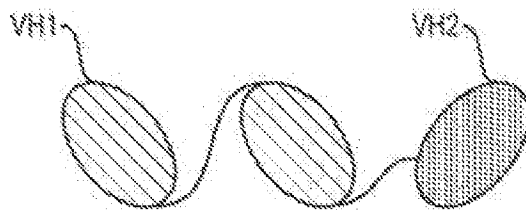
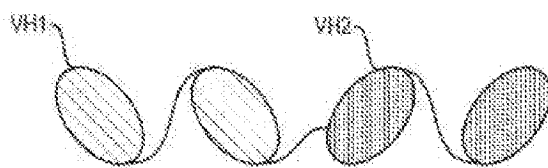
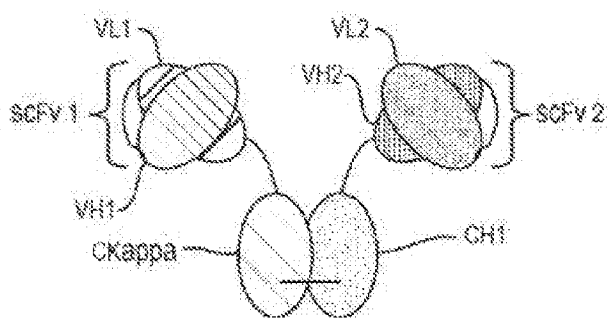
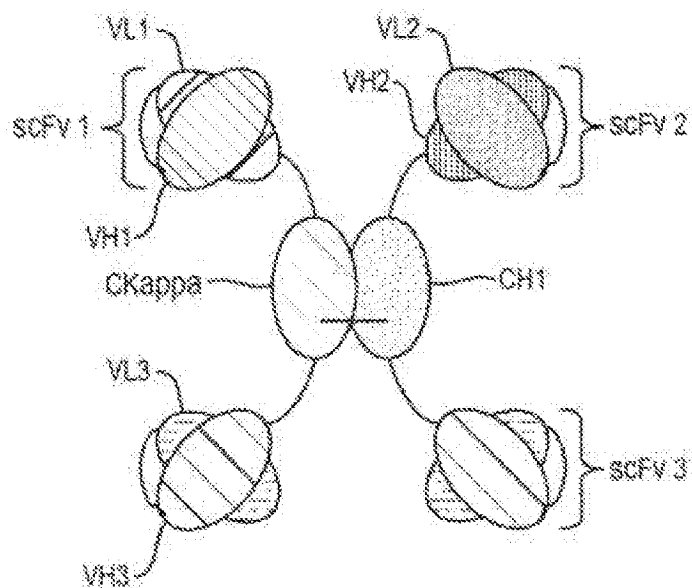


FIGURA 13

**FIGURA 14****FIGURA 15****FIGURA 16**

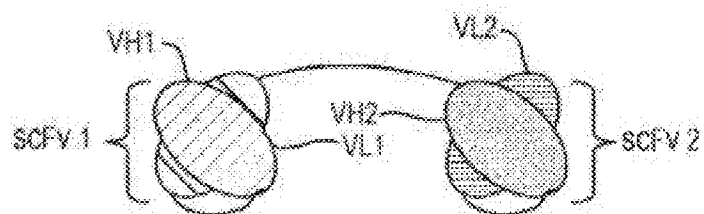


FIGURA 17

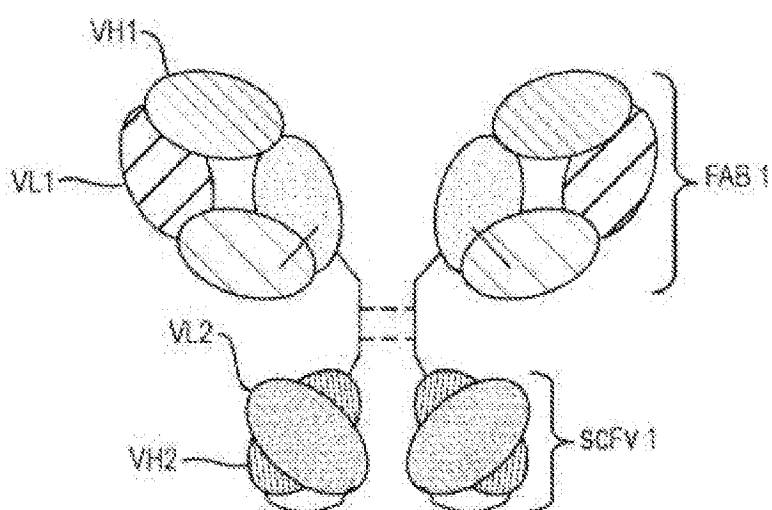


FIGURA 18

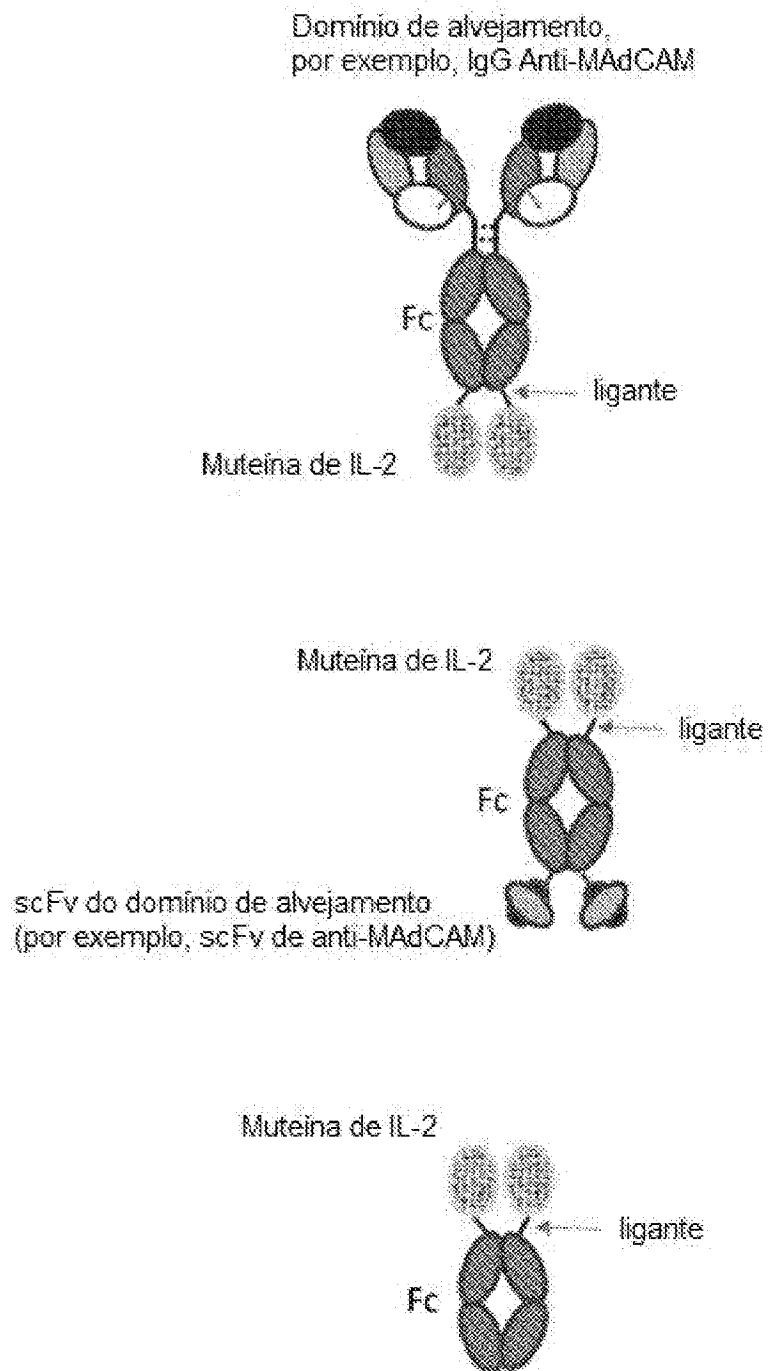


FIGURA 19

"IMUNOTOLERÂNCIA ALVEJADA".

RESUMO

Métodos e compostos para conferir privilégio imunológico local ou específico para localização.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: DEPÓSITO - LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS.txt
- Data de Geração do Código: 14/11/2019
- Hora de Geração do Código: 17:36:25
- Código de Controle:
 - Campo 1: 5774CD7A05271581
 - Campo 2: 74A08B3C1FAB4C53