



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

(21) BR 112021004383-7 A2



(22) Data do Depósito: 26/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

(54) **Título:** PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, MÉTODO PARA ATIVAR, AUMENTAR OU PROMOVER UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA INIBIR, REDUZIR OU SUPRIMIR UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER EM UM SUJEITO, KIT, USO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA E MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR OU TRATAR O CÂNCER EM UM SUJEITO

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/52; C07K 14/78; A61K 38/19; C12N 15/85.

(30) **Prioridade Unionista:** 28/09/2018 US 62/738,981.

(71) **Depositante(es):** MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY.

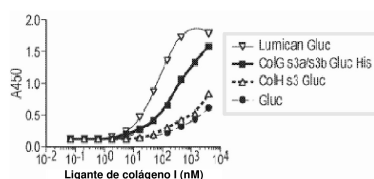
(72) **Inventor(es):** KARL DANE WITTRUP; NOOR MOMIN; JOSEPH PALMERI; MAGNOLIA CHINN.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019043805 de 26/07/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/068261 de 02/04/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 09/03/2021

(57) **Resumo:** PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, MÉTODO PARA ATIVAR, AUMENTAR OU PROMOVER UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA INIBIR, REDUZIR OU SUPRIMIR UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER EM UM SUJEITO, KIT, USO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA E MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR OU TRATAR O CÂNCER EM UM SUJEITO. A presente divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno operacionalmente ligado a um domínio imunomodulador. A divulgação também apresenta composições e métodos de uso das mesmas, por exemplo, para tratar o câncer.



"PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, MÉTODO PARA ATIVAR, AUMENTAR OU PROMOVER UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA INIBIR, REDUZIR OU SUPRIMIR UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER EM UM SUJEITO, KIT, USO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA E MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR OU TRATAR O CÂNCER EM UM SUJEITO"

Informação Relacionada

[0001] Este pedido reivindica o benefício da data de prioridade do Pedido Provisório U.S. Nº 62/738.981, depositado em 28 de setembro de 2018, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Fundos do Governo

[0002] Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob os subsídios nº R01 CA096504 e R01 CA174795 concedidos pelo National Institutes of Health (NIH). O Governo tem certos direitos sobre esta invenção.

Antecedentes

[0003] Embora a imunoterapia tenha transformado a oncologia com respostas curativas duráveis em uma minoria de pacientes, os eventos adversos relacionados ao sistema imunológico (irAEs) limitam sua aplicação mais ampla (Michot et al. 2016, Eur J Cancer, 54: 139-148). É desejado restringir os eventos de ativação imunológica mais potente ao tecido tumoral, enquanto preserva o tecido saudável não tumoral. Um objetivo aceito das novas imunoterapias é "aquecer" tumores

imunologicamente “frios”, levando à inflamação e à infiltração de células imunológicas (Chen e Mellman 2017, *Nature*, 541: 321-330). Têm sido propostas várias abordagens de localização de tumor: ligação de agentes imunomoduladores a módulos de direcionamento a tumor em imunocitoquinas (Hutmacher e Neri 2018, *Adv Drug Deliv Rev*); mascarando a atividade do agente sistemicamente, com ativação proteolítica localizada no tumor (Thomas e Daugherty 2009, *Protein Sci* 18: 2053-2059); injeção intratumoral dos agentes (Singh e Overwijk 2015, *Nat Commun* 8: 1447; Ager. et al. 2017, *Cancer Immunol Res* 5: 676-684; Bommareddy et al. 2017, *Cancer J* 23: 40-47; Milling et al. 2017, *Adv Drug Deliv Rev* 114: 79-101; Singh et al. 2017, *Nat Commun* 8: 1447; Sagiv-Barfi et al. 2018, *Sci Transl Med* 10: eaan4488); injeção peritumoral de um biomaterial sólido para aprisionar o agente (Park et al. 2018, *Sci Transl Med*, 10: eaar1916); conjugação com uma partícula sólida (Kwong et al. 2013, *Cancer Res* 73: 1547-1558) ou conjugação de peptídeos carregados básicos para conduzir alguma aderência não específica do agente à matriz extracelular tumoral (Ishihara et al. 2017, *Sci Transl Med* 9: eaan0401; Ishihara et al. 2018, *Mol Cancer Ther* 17: 2399-2411). Uma abordagem relacionada, mas distinta, é localizar fatores de crescimento no tecido para conduzir a regeneração do tecido (Nishi et al. 1998, *Proc Natl Acad Sci* 95: 7018-7023; Martino et al. 2014, *Science* 343: 885-888; Mitchell et al. 2016, *Acta Biomater* 30: 1-12).

[0004] Existem problemas significativos com cada uma das abordagens atuais acima. As imunocitoquinas expõem sistematicamente as células imunes ao agente imunomodulador (Tzeng et al. 2015, *Proc Natl Acad Sci* 112: 3320-3325). Os

agentes de mascaramento podem ser desmascarados fora dos tecidos-alvo, e o agente de mascaramento pode complicar a fabricação e a imunogenicidade. A injeção intratumoral frequentemente leva à rápida difusão para fora do compartimento do tumor. A conjugação de peptídeos em locais aleatórios é difícil de reproduzir, pode impactar negativamente a atividade específica, não impede totalmente a saída do tumor e cria problemas significativos de CMC devido aos produtos heterogêneos dos métodos de conjugação aleatória.

[0005] Consequentemente, permanece a necessidade de novas abordagens de imunoterapia para promover a localização do tumor e aumentar a eficácia, enquanto evita a toxicidade sistêmica.

Sumário da descrição

[0006] A presente divulgação é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de que um domínio imunomodulador (por exemplo, citocina, anticorpo anti-receptor imune, anticorpo antígeno associado a tumor, etc.) pode ser conjugado a um domínio de ligação ao colágeno, resultando em eficácia antitumoral aumentada em relação ao domínio imunomodulador não conjugado. Sem desejar ser limitado pela teoria, a localização do colágeno de um domínio imunomodulador resulta em eficácia antitumoral aumentada porque as células T ficam presas em zonas ricas em colágeno em torno dos tumores, tornando assim tais locais desejáveis para o direcionamento de agentes imunomoduladores. Quase metade dos tumores humanos exibe um fenótipo excluído pelo sistema imunológico, em que as células T CD8+ estão aparentemente presas no estroma desmoplásico rico em colágeno (Mariathasan, et al., Nature,

2018, 554: 544-548). Dada a importância primária das células T CD8 + na eficácia imunoterapêutica, há um desejo de localizar agentes imunomoduladores neste compartimento de tumores rico em colágeno e células T CD8+. A especificidade é significativa porque os agentes anteriores que utilizam interações eletrostáticas não específicas em pequenos peptídeos não estruturados para retenção (Martino, et. al., Science, 2014, 343: 885-888), ligam-se promiscuamente à grande maioria dos componentes da matriz extracelular carregados negativamente, em vez do que dentro do compartimento específico rico em colágeno de interesse. Esses peptídeos carregados positivamente não estruturados também levam a uma cinética de retenção relativamente fraca, em que, em alguns casos, metade da carga útil do conjugado injetado vazando para a circulação sistêmica (Ishihara, et al. Mol Cancer Ther. 2018, 17: 2399-2411).

[0007] Por conseguinte, são fornecidas aqui fusões imunomoduladoras para proteínas estruturadas com afinidade específica para o colágeno, levando a uma maior retenção dentro dos compartimentos ricos em colágeno específicos de interesse. Em alguns aspectos aqui descritos, as proteínas de fusão imunomoduladoras compreendem uma citocina, em que o domínio de ligação ao colágeno aumenta a retenção do tumor e evita a exposição sistêmica à citocina após a administração intratumoral em modelos animais pré-clínicos, reduzindo assim a toxicidade relacionada ao tratamento. Além disso, as proteínas de fusão imunomoduladoras aumentaram a eficácia antitumoral e reduziram a toxicidade em comparação com proteínas de fusão equivalentes sem domínios de ligação de colágeno quando combinadas com uma ou mais imunoterapias

adicionais (por exemplo, anticorpos direcionados a tumor, bloqueio de checkpoint, vacinas contra câncer e células T terapia).

[0008] Conforme fornecido neste documento, essas proteínas de fusão imunomoduladoras demonstram respostas antitumorais duráveis e sistêmicas, permitindo imunidade localizada contra tumor injetado e imunidade sistêmica para o tratamento eficaz de um tumor não injetado contralateral. A administração neoadjuvante das proteínas de fusão imunomoduladoras também melhorou a sobrevivência ao prevenir metástases após a excisão cirúrgica do tumor primário residual, demonstrando ainda que as proteínas de fusão imunomoduladoras promovem imunidade antitumoral sistêmica. Assim, as proteínas de fusão imunomoduladoras da divulgação são úteis para o tratamento de tumores metastáticos e/ou mediação do efeito abscopal em concretizações terapêuticas (por exemplo, anticâncer).

[0009] Também são fornecidos aqui os domínios de ligação ao colágeno variantes que alteraram (por exemplo, aumentaram ou diminuíram) as afinidades de ligação para o colágeno. Ao divulgar uma seleção de domínios de ligação ao colágeno variantes com diferentes afinidades de ligação ao colágeno, as divulgações neste documento fornecem opções para selecionar proteínas de fusão imunomoduladoras com diferentes afinidades de ligação para compartimentos ricos em colágeno (por exemplo, tumores que expressam colágeno).

[0010] As composições e métodos de ligação ao colágeno aqui fornecidos permitem o direcionamento local agnóstico de tumor e carga útil de terapêuticas ativas. As composições de ligação ao colágeno também demonstram aumento da eficácia com diminuição concomitante na toxicidade associada a

imunoterapias sistêmicas.

[0011] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) um domínio imunomodulador;

(ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um KD $\sim$ <500 nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico pI <10 e um peso molecular (MW) de > 5 kDa; e

(iii) opcionalmente, um ligante,

em que o domínio imunomodulador está operacionalmente ligado com ou sem o ligante ao domínio de ligação ao colágeno.

[0012] Em alguns aspectos, o KD do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o KD do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno tem um MW de cerca de 5-100 kDa, cerca de 10-80 kDa, cerca de 20-60 kDa, cerca de 30-50 kDa, ou cerca de 10 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 30 kDa, cerca de 40 kDa, cerca de 50 kDa, cerca de 60 kDa, cerca de 70 kDa, cerca de 80 kDa, cerca de 90 kDa ou cerca de 100 kDa.

[0013] Em alguns aspectos, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio de ligação ao colágeno que compreende uma ou mais repetições ricas em leucina que se ligam ao colágeno. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez repetições ricas em leucina que ligam o colágeno. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao

colágeno compreende uma ou mais repetições ricas em leucina de um membro de classe II de proteoglicanos humanos da família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP). Em alguns aspectos, o SLRP é selecionado de lumican, decorin, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticin, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e nidogênio. Em alguns aspectos, o SLRP é lumican.

[0014] Em alguns aspectos, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio de ligação ao colágeno que compreende uma SLRP humana. Em alguns aspectos, o SLRP é selecionado de lumican, decorin, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticin, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e nidogênio. Em alguns aspectos, o SLRP é lumican. Em alguns aspectos, lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 107.

[0015] Em alguns aspectos, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio de ligação ao colágeno que compreende uma glicoproteína humana tipo I com um domínio semelhante a Ig ou uma porção extracelular da mesma que se liga ao colágeno. Em alguns aspectos, a glicoproteína tipo I compete com lumican pela ligação para ligação ao colágeno tipo I. Em alguns aspectos, a glicoproteína tipo I humana é selecionada de LAIR1, LAIR2 e glicoproteína IV. Em alguns aspectos, a glicoproteína humana tipo I é LAIR1. Em alguns aspectos, a glicoproteína humana tipo I é LAIR1 e o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, o LAIR1 é uma

variante que compreende um ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 aumentou a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em outras concretizações adicionais, a variante LAIR1 diminuiu a ligação afinidade para o colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

[0016] Em qualquer dos aspectos anteriores, o domínio imunomodulador compreende um polipeptídeo que ativa, aumenta ou promove uma resposta por uma célula imune. Em outros aspectos, o domínio imunomodulador compreende um polipeptídeo que inibe, reduz ou suprime uma resposta de uma célula imune.

[0017] Em alguns aspectos, a célula imune é uma célula linfóide selecionada de uma célula linfóide inata, uma célula T, uma célula B, uma célula NK e uma combinação das mesmas. Em outros aspectos, a célula imune é uma célula mieloide selecionada de um monócito, um neutrófilo, um granulócito, um mastócito, um macrófago, uma célula dendrítica e uma combinação dos mesmos.

[0018] Em alguns aspectos, a resposta da célula imune compreende a produção de citocinas, produção de anticorpos, produção de células imunes específicas do antígeno, função efetora aumentada e/ou citotoxicidade e uma combinação dos mesmos.

[0019] Em qualquer um dos aspectos anteriores, o domínio imunomodulador compreende um ou mais selecionados de uma citocina, uma quimiocina, um ligante/receptor de ativação, um ligante/receptor inibitório ou uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, o domínio imunomodulador compreende uma ou mais citocinas.

[0020] Em alguns aspectos, a citocina é uma interleucina de receptor de cadeia comum gama humana selecionada de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-15/IL-15RA, IL-21, e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a citocina é IL-2.

[0021] Em alguns aspectos, a citocina é um membro da família IL-12 humana selecionado de IL-12 (p35), IL-12 (p40), IL-12 (p35)/IL-12 (p40), IL-23, IL-27 IL-35, e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a citocina é uma fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40).

[0022] Em outros aspectos, a citocina é um membro da família IL-1 humana selecionado de IL-1, IL-18, IL-33 e uma combinação das mesmas. Em alguns aspectos, a citocina é IL-18.

[0023] Em ainda outros aspectos, a citocina é selecionada a partir de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF, FLT3L, G-CSF, M-CSF e uma combinação dos mesmos.

[0024] Em alguns aspectos, o domínio imunomodulador compreende uma ou mais quimiocinas. Em alguns aspectos, a quimiocina é selecionada de LIF, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL1, CXCL9, CXCL10, MCP-1, Eotaxina, RANTES, LIX e uma combinação dos mesmos. Em outros aspectos, a quimiocina é selecionada de CCL3, CCL4, CCL5, Eotaxina e uma combinação dos mesmos.

[0025] Em qualquer dos aspectos anteriores, o domínio

imunomodulador compreende um ou mais ligantes/receptores de ativação. Em alguns aspectos, o ligante/receptor de ativação é selecionado a partir de uma superfamília de TNF, uma superfamília de receptores CD28, uma família de ligantes B7 e um receptor de células T. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um ligante da superfamília TNF selecionado dentre TNF-alfa, CD40L, 4-1BBL, OX40 e uma combinação dos mesmos. Em ainda outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um receptor da superfamília TNF e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo selecionado a partir de um anticorpo anti-TNFR1, um anticorpo anti-TNFR2, um anticorpo anti-CD40, um anti-Anticorpo 4-1BB e um anticorpo anti-OX40. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um membro da superfamília CD28 ou um membro da família B7 selecionado a partir do ligante ICOS, CD80 e CD86 e uma combinação dos mesmos. Em ainda outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um membro da superfamília CD28 e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo selecionado a partir de um anticorpo anti-ICOS e um anticorpo anti-CD28. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um receptor de células T e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-CD3 γ , um anticorpo anti-CD3 δ , um anticorpo anti-CD3 ζ e um anti- Anticorpo CD3 ϵ .

[0026] Em alguns aspectos, o ligante/receptor de ativação é selecionado de uma superfamília TNF, uma superfamília de receptores CD28, uma família de ligantes B7, um receptor de células T, um receptor semelhante a Ig de célula assassina,

um receptor semelhante a Ig de leucócito, um receptor CD94/NKG2 família de receptores e um receptor Fc. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um Ligante de receptor semelhante a Ig de célula assassina e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-KIR 2DS1, um anticorpo anti-KIR 2DS2, um anti-KIR 2DS3 anticorpo, um anticorpo anti-KIR 2DS4, um anticorpo anti-KIR 2DS5 e um anticorpo anti-KIR 3DS1. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um receptor do tipo Ig de leucócito e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo anti-LIRA2 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um membro da família de receptores CD94/NKG2 selecionado de MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 (isoforma 1) ULBP5 (isoforma 2) e ULBP6. Em ainda outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um membro da família de receptores CD94/NKG2 e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo selecionado a partir de um anticorpo anti-CD94/NKG2D, um anticorpo anti-CD94/NKG2C, um anti Anticorpo -CD94/NKG2E e um anticorpo anti-CD94/NKG2H. Em outros aspectos, o ligante/receptor de ativação é um membro da família de receptores Fc e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo selecionado a partir de anticorpo anti-Fc γ RI, um anticorpo anti-Fc γ RIIC, um anticorpo anti-Fc γ RIIIA, um anti-Fc γ RIIIB anticorpo, um anticorpo anti-Fc ϵ RI, um anticorpo anti-Fc ϵ RII, um anticorpo anti-Fc α R e um anticorpo anti-Fc μ R.

[0027] Em qualquer um dos aspectos anteriores, o domínio

imunomodulador compreende um ou mais ligantes/receptores inibitórios. Em alguns aspectos, o ligante/receptor inibitório é selecionado a partir de uma superfamília de receptores CD28, uma superfamília TNF e um inibidor de checkpoint. Em outros aspectos, o ligante/receptor inibitório é um membro da superfamília CD28 e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste selecionado a partir de um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-PD-L1, um anti-PD-L2 anticorpo, um anticorpo anti-CTLA4. Em ainda outros aspectos, o ligante/receptor inibitório é um membro da superfamília TNF e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-TIGIT e um anticorpo anti-BTLA. Em alguns aspectos, o ligante/receptor inibitório é um inibidor de checkpoint e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-VISTA, um anticorpo anti-TIM-3, um anticorpo anti-LAG-3, um anti-CD47 anticorpo e um anticorpo anti-SIRP α .

[0028] Em alguns aspectos, o ligante/receptor inibitório é selecionado a partir de uma superfamília de receptores CD28, uma superfamília TNF, uma família Siglec, uma família CD94/NKG2A, uma família de receptores semelhantes a leucócitos Ig, Ligando de receptores semelhantes a Ig de células assassinas, um receptor Fc , uma molécula da via da adenosina e um inibidor de checkpoint. Em outros aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende um membro da família Siglec e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-Siglec 1, um anticorpo anti-Siglec 2, um

anticorpo anti-Siglec 3, um anti -Anticorpo Siglec 4a, um anticorpo anti-Siglec 5, um anticorpo anti-Siglec 6, um anticorpo anti-Siglec 7, um anticorpo anti-Siglec 8, um anticorpo anti-Siglec 9, um anticorpo anti-Siglec 10, um anti- Anticorpo Siglec 11 e um anticorpo anti-Siglec 12. Em ainda outros aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende um receptor inibitório da família de receptores CD94/NKG2 ou ligante inibitório e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-CD94/NKG2A e um anticorpo anti-CD94/NKG2B. Em alguns aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende um receptor semelhante a Ig de leucócito e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-LIRB1, um anticorpo anti-LIRB2, um anticorpo anti-LIRB3, um anti- Anticorpo LIRB4. Em outros aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende um ligante receptor de células assassinas semelhante a Ig e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo selecionado a partir de um anticorpo anti-KIR 2DL1, um anticorpo anti-KIR 2DL2, um anti-KIR 2DL3 anticorpo, um anticorpo anti-KIR 2DL4, um anticorpo anti-KIR 2DL5A, um anticorpo anti-KIR 2DL5B, um anticorpo anti-KIR 3DL1, um anticorpo anti-KIR 3DL2 e um anticorpo anti-KIR 3DL3. Em ainda outros aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende um receptor Fc e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo anti-FcγRIIB ou fragmento de ligação ao antígeno. Em alguns aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende uma molécula da via da adenosina e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo

ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-CD39 e anticorpo anti-CD73. Em outros aspectos, o ligante/receptor inibitório compreende um inibidor de checkpoint e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-VISTA, um anticorpo anti-TIM-3, um anticorpo anti-LAG-3, um anti -CD47 anticorpo e um anticorpo anti-SIRP α .

[0029] Em qualquer um dos aspectos anteriores, o domínio imunomodulador está operacionalmente ligado ao domínio de ligação ao colágeno por meio de um ligante. Em alguns aspectos, o ligante é de comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno. Em alguns aspectos, o ligante fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido. Em alguns aspectos, o ligante permite a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o engajamento receptor/ligante. Em alguns aspectos, o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que 1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400. Em alguns aspectos, o ligante é albumina de soro humano ou fragmento da mesma. Em outros aspectos, o ligante compreende um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

[0030] Em qualquer dos aspectos anteriores, a proteína de fusão imunomoduladora é de massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração in vivo. Em alguns aspectos, a proteína de fusão é > 60 kDa. Em alguns aspectos, a proteína de fusão imunomoduladora liga-se ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após

administração in vivo, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0031] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

- (i) pelo menos uma citocina;
- (ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um KD ≤ 500 nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico pI < 10 e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N=1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400, em que a citocina está operacionalmente ligada por meio do ligante ao domínio de ligação ao colágeno e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa. Em alguns aspectos, o KD do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o KD do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglican, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e nidogênio. Em alguns aspectos, o SLRP é lumican. Em alguns aspectos, o lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em SEQ ID NO: 107. Em outros aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é selecionado de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao

colágeno é LAIR1. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, o LAIR1 é uma variante que compreende uma ou mais substituições de aminoácidos, adições ou deleções, opcionalmente duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 aumentou a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98. Em outras concretizações adicionais, a variante LAIR1 diminuiu a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma ligação a afinidade de colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

[0032] Em alguns aspectos, a citocina é uma interleucina de receptor de cadeia comum gama humana selecionada de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-15/IL-15RA, IL- 21, e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a citocina é IL-2. Em alguns aspectos, a citocina é um membro da família das IL-12 humana selecionadas de IL-12 (p35), IL-12 (p40), IL-12 (p35)/IL-12 (p40), IL-23, IL-27, IL-35 e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a citocina é uma fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40). Em alguns aspectos, a proteína de fusão imunomoduladora compreende uma segunda citocina. Em alguns aspectos, a segunda citocina é IL-2.

[0033] Em outros aspectos, a citocina é um membro da família IL-1 humana selecionado de IL-1, IL-18, IL-33 e uma

combinação das mesmas. Em ainda outros aspectos, a citocina é selecionada a partir de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF, FLT3L, G-CSF, M-CSF e uma combinação dos mesmos.

[0034] Em alguns aspectos, o ligante é de comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno e/ou fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido e/ou permitir a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o engajamento receptor/ligante. Em alguns aspectos, o ligante é albumina de soro humano ou fragmento da mesma. Em outros aspectos, o ligante compreende um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

[0035] Em alguns aspectos, a proteína de fusão tem massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração in vivo. Em alguns aspectos, a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração in vivo, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0036] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

- (i) pelo menos uma quimiocina;
- (ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um $\text{KD} \leq 500 \text{ nM}$, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $\text{pI} < 10$ e um peso molecular (MW) de $\geq 5 \text{ kDa}$; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-$

400, em que a quimiocina está operacionalmente ligada através do ligante ao domínio de ligação ao colágeno e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa. Em alguns aspectos, o KD do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o KD do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoadherina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e nidogênio. Em alguns aspectos, o SLRP é lumican. Em alguns aspectos, o lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em SEQ ID NO: 107. Em outros aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é selecionado de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é LAIR1. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, o LAIR1 é uma variante que compreende uma ou mais substituições de aminoácidos, adições ou deleções, opcionalmente duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 aumentou a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98. Em outras concretizações

adicionais, a variante LAIR1 diminuiu a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma ligação por afinidade do colágeno a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

[0037] Em alguns aspectos, a quimiocina é selecionada de LIF, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL1, CXCL9, CXCL10, MCP-1, Eotaxina, RANTES, LIX e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a quimiocina é selecionada a partir de CCL3, CCL4, CCL5, eotaxina e uma combinação dos mesmos.

[0038] Em alguns aspectos, o ligante é de comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno e/ou fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido e/ou permitir a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o engajamento receptor/ligante. Em alguns aspectos, o ligante é albumina de soro humano ou fragmento da mesma. Em outros aspectos, o ligante compreende um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

[0039] Em alguns aspectos, a proteína de fusão tem massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração in vivo. Em alguns aspectos, a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração in vivo, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0040] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) um anticorpo agonista que se liga a um ligante/receptor de ativação compreendendo um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida; e

(ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um $KD \leq 500$ nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $pI < 10$ e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa, em que o domínio de ligação ao colágeno está operacionalmente ligado ao C-terminal do domínio Fc ou domínio Fc mutante. Em alguns aspectos, o KD do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o KD do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/ mimecano, podocano, perlecano e nidogênio. Em alguns aspectos, o SLRP é lumican. Em alguns aspectos, o lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em SEQ ID NO: 107. Em outros aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é selecionado de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é LAIR1. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO:98. Em algumas concretizações, o LAIR1 é uma variante que compreende uma ou mais substituições de aminoácidos, adições ou deleções, opcionalmente duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a

sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 aumentou a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98. Em outras concretizações adicionais, a variante LAIR1 diminuiu a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma ligação por afinidade ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

[0041] Em alguns aspectos, o anticorpo agonista é selecionado a partir de um anticorpo anti-TNFR1, um anticorpo anti-TNFR2, um anticorpo anti-CD40, um anticorpo anti-4-1BB e um anticorpo anti-OX40. Em outros aspectos, o anticorpo agonista é selecionado a partir de um anticorpo anti-ICOS e um anticorpo anti-CD28. Em alguns aspectos, o anticorpo agonista é selecionado a partir de um anticorpo anti-CD3 γ , um anticorpo anti-CD3 δ , um anticorpo anti-CD3 ζ e um anticorpo anti-CD3 ϵ .

[0042] Em alguns aspectos, a proteína de fusão tem massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração in vivo. Em alguns aspectos, a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração in vivo, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0043] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

- (i) um anticorpo antagonista que se liga a um ligante/receptor inibitório compreendendo um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida; e
- (ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de

ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um KD $\leq$ 500 nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico pI <10 e um peso molecular (MW) de $\geq$ 5 kDa, em que o domínio de ligação ao colágeno está operacionalmente ligado ao C-terminal do domínio Fc ou domínio Fc mutante. Em alguns aspectos, o KD do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o KD do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e nidogênio. Em alguns aspectos, o SLRP é lumican. Em alguns aspectos, o lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em SEQ ID NO: 107. Em outros aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é selecionado de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno é LAIR1. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO:98. Em algumas concretizações, o LAIR1 é uma variante que compreende uma ou mais substituições de aminoácidos, adições ou deleções, opcionalmente duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas

concretizações, a variante LAIR1 aumentou a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98. Em outras concretizações adicionais, a variante LAIR1 diminuiu a afinidade de ligação ao colágeno em relação a uma ligação por afinidade ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

[0044] Em alguns aspectos, o anticorpo antagonista é selecionado a partir de um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-PD-L1, um anticorpo anti-PD-L2, um anticorpo anti-CTLA4, um anticorpo anti-TIGIT, um anti-BTLA anticorpo, um anticorpo anti-VISTA, um anticorpo anti-TIM-3, um anticorpo anti-LAG-3, um anticorpo anti-CD47 e um anticorpo anti-SIRP α .

[0045] Em alguns aspectos, a proteína de fusão tem massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração *in vivo*. Em alguns aspectos, a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0046] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) IL-2 humana;

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N = 1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400,

em que IL-2 está operacionalmente ligada por meio do ligante a Lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é > 60 kDa.

[0047] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) uma fusão de cadeia única de IL-12 humana (p35)/IL-12 (p40);

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N=1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400,

em que a fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40) está operacionalmente ligada por meio do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é > 60 kDa.

[0048] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) CCL-3 humano;

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N=1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400,

em que CCL-3 está operacionalmente ligado através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é $\geq$ 60 kDa.

[0049] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) CCL-4 humano;

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N=1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400,

sendo que CCL-4 está operacionalmente ligado através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é $\geq$ 60 kDa.

[0050] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

- (i) CCL-5 humano;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N=1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400,

em que CCL-5 está operacionalmente ligado através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é $\geq$ 60 kDa.

[0051] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

- (i) Eotaxina humana;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N=1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50-600, 100-500 ou 200-400,

em que a eotaxina está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é $\geq$ 60 kDa.

[0052] Em qualquer um dos aspectos anteriores, lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido em SEQ ID NO: 107.

Em qualquer um dos aspectos anteriores, LAIR1 compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, o LAIR1 é uma variante que

compreende uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 tem afinidade de ligação aumentada para colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em outras concretizações adicionais, a variante LAIR1 tem afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo o amino sequência de ácido de SEQ ID NO: 98.

[0053] Em qualquer um dos aspectos anteriores, o ligante é de comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno e/ou fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido e/ou permitir a separação estérica de o domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o engajamento receptor/ligante. Em alguns aspectos, o ligante é albumina de soro humano ou fragmento da mesma. Em outros aspectos, o ligante compreende um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

[0054] Em alguns aspectos, a proteína de fusão tem massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração in vivo. Em alguns aspectos, a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração in vivo, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0055] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece uma

proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) um anticorpo agonista compreendendo um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida, em que o anticorpo agonista é selecionado a partir de um anticorpo anti-CD3, um anticorpo anti-4-1-BB, um anticorpo anti-CD40 e um anticorpo anti-OX40; e

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; em que lumican ou LAIR1 está operacionalmente ligado ao C-terminal do domínio Fc ou domínio Fc mutante.

[0056] Em alguns aspectos, a proteína de fusão tem massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração *in vivo*. Em alguns aspectos, a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

[0057] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma composição farmacêutica que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora aqui divulgada e um carreador farmacêuticamente aceitável.

[0058] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão imunomoduladora aqui divulgada. Em alguns aspectos, a divulgação fornece um vetor de expressão que compreende um ácido nucleico aqui divulgado. Em outros aspectos, a divulgação fornece uma célula transformada com um vetor de expressão aqui divulgado.

[0059] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para a produção de uma proteína de fusão imunomoduladora, o método compreendendo a manutenção de uma célula aqui descrita sob condições que permitem a expressão da proteína de fusão

imunomoduladora. Em outros aspectos, o método compreende a obtenção da proteína de fusão imunomoduladora.

[0060] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para ativar, aumentar ou promover uma resposta por uma célula imune em um sujeito, compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica divulgada neste documento.

[0061] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece um método para inibir, reduzir ou suprimir uma resposta por uma célula imune em um sujeito, compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica divulgada neste documento.

[0062] Em qualquer dos aspectos anteriores, a célula imune é uma célula linfóide selecionada a partir de uma célula linfóide inata, uma célula T, uma célula B, uma célula NK e uma combinação das mesmas. Em outros aspectos, a célula imune é uma célula mieloide selecionada de um monócito, um neutrófilo, um granulócito, um mastócito, um macrófago, uma célula dendrítica e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a resposta da célula imune compreende a produção de citocinas, produção de anticorpos, produção de células imunes específicas do antígeno, função efetora aumentada e/ou citotoxicidade e uma combinação dos mesmos. Em alguns aspectos, a célula imune ocorre em um microambiente tumoral.

[0063] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor, compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição

farmacêutica divulgada neste documento.

[0064] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para o tratamento de câncer em um sujeito, compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica divulgada neste documento.

[0065] Em qualquer um dos aspectos anteriores, uma resposta imune antitumoral é induzida no sujeito após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica. Em alguns aspectos, a resposta imune antitumoral é uma resposta de células T que compreende a produção de IFN γ e/ou IL-2 por uma ou ambas as células T CD4+ e células T CD8+.

[0066] Em qualquer um dos aspectos anteriores, a infiltração de células imunes em um microambiente tumoral é aumentada após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica.

[0067] Em qualquer um dos aspectos anteriores, a quantidade de células T reguladoras (Treg) é reduzida em um microambiente tumoral após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica. Em qualquer um dos aspectos anteriores, a exaustão das células T é reduzida em um microambiente tumoral após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica.

[0068] Em qualquer um dos aspectos anteriores, a proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica é administrada por via intratumoral.

[0069] Em qualquer dos aspectos anteriores, a proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica é

administrada por vetores virais, eletroporação, transplante de células que expressam a proteína de fusão imunomoduladora ou replicons.

[0070] Em outros aspectos, a divulgação fornece um kit que compreende um recipiente que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita e um transportador farmacêuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica aqui descrita, e uma bula que compreende instruções para a administração da proteína de fusão ou composição farmacêutica, para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito em necessidade.

[0071] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece um kit que compreende um recipiente que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita e um transportador farmacêuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica aqui descrita, e uma bula que compreende instruções para a administração do anticorpo ou composição farmacêutica sozinha ou em combinação com outro agente, para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito em necessidade.

[0072] Em alguns aspectos, a divulgação fornece o uso de uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita e um carreador farmacêuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica aqui descrita, para a fabricação de um medicamento para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito com necessidade disso.

[0073] Em outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita e um

carreador farmacologicamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica aqui descrita, na fabricação de um medicamento para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito em necessidade disso.

[0074] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita e um transportador farmacologicamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica aqui descrita, para uso como um medicamento.

[0075] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade, uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica aqui descrita e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo um anticorpo direcionado ao antígeno tumoral, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito. Em alguns aspectos, o antígeno tumoral é um antígeno associado ao tumor (TAA), um antígeno específico do tumor (TSA) ou um neoantígeno tumoral. Em outros aspectos, o anticorpo direcionado ao antígeno tumoral se liga especificamente a HER-2/neu, EGFR, VEGFR, CD20, CD33 ou CD38 humano.

[0076] Em ainda outros aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade, uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição

farmacêutica aqui descrita, e uma eficaz quantidade de uma segunda composição compreendendo uma vacina contra o câncer, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito. Em alguns aspectos, a vacina contra o câncer é uma população de células imunizadas in vitro com um antígeno tumoral e administrada ao sujeito. Em outros aspectos, a vacina contra o câncer é um peptídeo que compreende um ou mais antígenos associados a tumor. Em alguns aspectos, a vacina contra o câncer é um conjugado de peptídeo anfifílico que compreende um antígeno associado a tumor, um lipídio e, opcionalmente, um ligante, em que o conjugado de peptídeo anfifílico se liga a albumina em condições fisiológicas. Em alguns aspectos, a vacina contra o câncer compreende ainda um adjuvante.

[0077] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade, uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica aqui descrita e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo um inibidor do ponto de controle imunológico, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito. Em alguns aspectos, o inibidor do ponto de verificação imunológico compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 ou TIM3.

[0078] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade, uma quantidade eficaz de uma

proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica aqui descrita e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo uma terapia celular adotiva, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito. Em alguns aspectos, a terapia celular adotiva compreende uma célula imune efetora compreendendo uma molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a um antígeno tumoral. Em alguns aspectos, a molécula CAR compreende um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembranar e um domínio intracelular que compreende um domínio coestimulador e/ou um domínio de sinalização primário. Em alguns aspectos, o domínio de ligação ao antígeno se liga ao antígeno tumoral associado à doença. Em alguns aspectos, o antígeno tumoral é selecionado a partir de CD19, EGFR, Her2/neu, CD30 e BCMA. Em alguns aspectos, a célula imune efetora é uma célula T, como uma célula T CD8+. Em alguns aspectos, a célula imune efetora é uma célula assassina natural (NK).

[0079] Em qualquer um dos métodos anteriores, a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica são administradas por via intratumoral. Em alguns aspectos, a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica e a segunda composição são administradas simultaneamente ou sequencialmente.

[0080] Em outros aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de proteína de fusão imunomoduladora compreendendo:

(i) IL-2 humana;

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

em que IL-2 está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa, reduzindo ou inibindo assim o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

[0081] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo:

(i) uma fusão de cadeia única de IL-12 humana (p35)/IL-12 (p40);

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

em que a fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40) está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa, reduzindo ou inibindo assim o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

[0082] Em alguns aspectos, a divulgação fornece um método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma

primeira composição compreendendo uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo:

- (i) IL-2 humana;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

em que IL-2 está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa e uma segunda composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo:

- (i) uma fusão de cadeia única de IL-12 humana (p35)/IL-12 (p40);
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

em que a fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40) está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa, reduzindo ou inibindo assim o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

[0083] Em alguns aspectos, o método compreende ainda a administração de uma segunda (ou terceira, ou quarta) composição compreendendo uma quantidade eficaz de um anticorpo direcionado ao antígeno tumoral ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em outros aspectos, o método compreende ainda a administração de uma segunda composição

compreendendo uma quantidade eficaz de composição compreendendo uma vacina contra o câncer. Em ainda outros aspectos, o método compreende ainda a administração de uma segunda composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo um inibidor do ponto de controle imunológico. Em alguns aspectos, o inibidor do ponto de verificação imunológico compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 ou TIM3.

[0084] Em outros aspectos, o método compreende ainda a administração de uma segunda composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo uma terapia celular adotiva, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito. Em alguns aspectos, a terapia com células adotivas compreende uma célula imune efetora compreendendo uma molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a um antígeno tumoral. Em alguns aspectos, a célula imune efetora é uma célula T, como uma célula T CD8+ ou uma célula NK.

[0085] Em qualquer um dos aspectos anteriores, a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica são administradas por via intratumoral.

[0086] Em qualquer um dos aspectos anteriores, a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica e a segunda composição são administradas simultaneamente ou sequencialmente.

Breve descrição dos desenhos

[0087] O arquivo de patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta publicação de patente ou pedido de patente com desenho (s) colorido (s)

serão fornecidas pelo Instituto mediante solicitação e pagamento da taxa necessária.

[0088] FIG. 1A fornece um gráfico que mostra a ligação da luciferase de Gaussia sozinha (Gluc) ou fundida com polipeptídeos de ligação ao colágeno (Lumican-Gluc, ColG s3a/s3b-Gluc, ColH s3-Gluc) ao colágeno tipo I em função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA.

[0089] FIG. 1B fornece um gráfico que mostra a ligação da luciferase de Gaussia sozinha (Gluc) ou fundida com polipeptídeos de ligação ao colágeno (Lumican-Gluc, ColG s3a/s3b-Gluc, ColH s3-Gluc) ao colágeno tipo IV em função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA.

[0090] FIG. 1C fornece um gráfico que mostra a ligação de LAIR-1 murino marcado com His(mLAIR1-His) e lumican biotinilado marcado com His (Lwt-HIS-b) ao colágeno tipo I em função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA usando um anticorpo anti-HIS conjugado com peroxidase de rábano (HRP).

[0091] FIG. 1D fornece um gráfico que mostra a ligação competitiva entre LAIR-1 murino marcado com His (mLAIR1) e lumican biotinilado marcado com His ao colágeno tipo I em função da concentração de mLAIR1. A ligação lumican ao colágeno tipo I foi determinada por ELISA de competição na presença de concentrações variáveis de mLAIR1 usando estreptavidina conjugada com peroxidato de rábano (HRP).

[0092] FIG. 2A fornece um gráfico que quantifica a fluorescência relativa do tumor ao longo do tempo de lumican ou lumican-MSA marcado com fluorescência em comparação com MSA marcado com fluorescência após injeção intratumoral em tumores B16F10-Trp2KO conforme determinado por imagem de

fluorescência in vivo.

[0093] FIG. 2B fornece um gráfico que quantifica a fluorescência do soro de camundongos com tumor B16F10-Trp2KO injetados com lumican-MSA marcado com fluorescência ou MSA marcado com fluorescência como uma porcentagem da dose injetada. A fluorescência do soro foi determinada por imagem fluorescente de tubos revestidos com heparina de micro-hematócrito contendo amostras de sangue de camundongo.

[0094] FIG. 3A fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox de camundongos com tumor de melanoma B16F10, tratados com PBS (controle) (i.tu.), MSA-IL2 (i.tu.), Lumican-MSA-IL2 (i.tu.), ou Lumican (i.tu.). Os ratinhos (n = 5 ou 7 por grupo de tratamento) foram tratados como indicado (setas) nos dias 6 e 12. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com ** (P <0,002).

[0095] FIG. 3B fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox de camundongos com tumor de melanoma B16F10, tratados intratumoralmente com PBS (n = 7, i.tu.), anticorpo anti-TYRP1 (TA99) (ip) em combinação com MSA-IL2 (n = 17, i.tu.), Lumican-MSA-IL2 (n = 17, i.tu.), ou com Lumican (n = 17, i.tu.). Os ratinhos foram tratados conforme indicado (setas) nos dias 6, 12 e 18. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * (P <0,03), ** (P <0,002), *** (P <0,0002), **** (P <0,0001), n.s., não significativo.

[0096] FIG. 3C fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox em camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados com PBS (controle) (i.tu.) ou com uma combinação de anticorpo anti-TYRP1 (TA99) (ip) e Lumican-MSA-IL2

administrado por via intratumoral (i.tu.), peritumoralmente (peri.tu) (ou seja, adjacente ao tumor), ou subcutaneamente perto da base da cauda (base da cauda sc) Os camundongos foram tratados como indicado (setas) no dia 6, 12 e 18. Sobrevivência estatística determinada pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * ($P < 0,03$), ** ($P < 0,002$), *** ($P < 0,0002$), **** ($P < 0,0001$), n.s., não significativo.

[0097] FIG. 3D fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox de camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados com PBS (controle) tanto (i.tu.) como no linfonodo de drenagem do tumor inguinal (i.tdLN), com anticorpo anti-TYRP1 (TA99) (ip) em combinação com Lumican-MSA-IL2 (i.tu.) e PBS (i.tdLN), ou com anticorpo anti-TYRP1 (TA99) (ip) em combinação com Lumican-MSA-IL2 (i.tdLN) e PBS (i.tu). Os ratos ($n = 7$ por grupo de tratamento) foram tratados como indicado (setas) no dia 6 e no dia 12. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com ** ($P < 0,002$).

[0098] FIG. 4 fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox de B16F10 melanoma com tumor BatF3 -/- ou camundongos de tipo selvagem (WT) tratados com PBS (controle) (i.tu.) ou anticorpo anti-TYRP1 (TA99) (ip) em combinação com Lumican-MSA-IL2 (i.tu) e depleção de células imunes ou anticorpos neutralizantes de citocinas como indicado. Os ratinhos ($n = 5$ por grupo de tratamento) foram tratados como indicado nos dias 6, 12 e 18. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * ($P < 0,03$), ** ($P < 0,002$), *** ($P < 0,0002$), **** ($P < 0,0001$), n.s., não significativo.

[0099] FIG. 5A fornece um gráfico que quantifica células IFN γ + entre células T CD45 + CD3 + CD8 + vivas derivadas de esplenócitos, excisadas no dia 10 de camundongos (tratados como descrito na FIG. 3B), estimuladas com células B16F10 ou 4T1 irradiadas por 12 horas na presença de brefeldina A e, subsequentemente, corado para marcadores de superfície e IFN γ intracelular (n=5 camundongos por grupo de tratamento). Dados analisados por ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de Tukey.

[0100] FIG. 5B fornece um gráfico que quantifica as áreas tumorais médias das lesões contralaterais (não tratadas) (painel esquerdo) e ipsilaterais (tratadas) (painel do meio) de camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados, e a porcentagem de sobrevivência (painel direito) monitorada ao longo do tempo (n = 7/grupo). Os camundongos foram inoculados com células B16F10 no flanco direito (ipsilateral) e com células B16F10 no flanco esquerdo (contralateral) no dia 0. Os tratamentos intratumorais foram administrados ao tumor ipsilateral ao lado de TA99 (ip) no dia 6 e no dia 12. Área do tumor (média + DP) das lesões contralaterais (não tratadas) e ipsilaterais (tratadas) (esquerda) e sobrevida (direita) monitorada ao longo do tempo (n = 7/grupo). Para cada grupo, a área do tumor é mostrada até que um camundongo alcance o critério de eutanásia. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância assumida com *, P <0,03; **, P <0,002; ***, P <0,0002; ****, P <0,0001; n.s., não significativo.

[0101] FIG. 6A fornece um gráfico que quantifica a mudança de peso de camundongos com tumor de melanoma B16F10 após o tratamento com PBS (i.tu.) (n = 6), lumican (i.tu.) (n = 7),

IL12-MSA (i.tu.) (n = 7), IL12-MSA-Lumican (i.tu.) (n = 7) ou IL12-MSA (ip) (n = 7). Os camundongos foram tratados conforme indicado (setas) no dia 6 e no dia 12.

[0102] FIG. 6B fornece uma curva de sobrevivência para camundongos inoculados com tumores de melanoma B16F10 no dia 0 e tratados com PBS (controle), lumican (i.tu.), IL12-MSA (i.tu.), IL12-MSA (ip) ou IL12-MSA-Lumican (i.tu) nos dias 6 e 12.

[0103] FIG. 7 fornece gráficos que representam a mudança de peso da linha de base (painel esquerdo) e sobrevivência correspondente ao longo do tempo (painel direito) de camundongos com tumor B16F10 tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS (n = 5), MSA-IL2 e IL12-MSA (n = 5), ou Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican (n = 5) no dia 5 e no dia 11. As setas indicam o tempo de tratamento. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * (P <0,03), ** (P <0,002), *** (P <0,0002), **** (P <0,0001), n.s., não significativo.

[0104] FIG. 8A fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox do tumor de melanoma B16F10 com BatF3 -/- ou camundongos de tipo selvagem (WT) tratados com PBS (controle) (i.tu.) ou Lumican-MSA-IL2 (i.tu.) em combinação com IL12-MSA-Lumican (i.tu.) e depleção de células imunes ou anticorpos neutralizantes de citocinas, conforme indicado. Os ratinhos (n = 5 por grupo de tratamento) foram tratados como indicado nos dias 6, 12 e 18. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * (P <0,03), ** (P <0,002), *** (P <0,0002), **** (P <0,0001), n.s., não significativo.

[0105] FIG. 8B fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox do tumor de melanoma B16F10 com BatF3 -/- ou camundongos de tipo selvagem (WT) tratados com PBS (controle) (i.tu.) ou Lumican-MSA-IL2 (i.tu.) em combinação com IL12-MSA-Lumican (i.tu.) e anticorpos de depleção de células imunes, conforme indicado. Os camundongos (n = 5 por grupo de tratamento) foram tratados como indicado nos dias 6, 12 e 18. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * (P <0,03), ** (P <0,002), *** (P <0,0002), **** (P <0,0001), n.s., não significativo.

[0106] FIG. 8C fornece um mapa de calor que mostra a alteração das células imunes em infiltrados tumorais de camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados, intratumoralmente com uma combinação de IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 (versões Lumican) ou uma combinação de IL12-MSA + MSA-IL2 (versões MSA) de em relação ao tratamento com PBS.

[0107] FIGs. 8D-8E fornecem gráficos que quantificam células T CD8 + infiltrantes de tumor isoladas de camundongos com tumor de melanoma B16F10 no dia 11 após a injeção de células tumorais (FIG. 8D) e sua intensidade de fluorescência média (MFI) de superfície PD-1 (FIG. 8E), após o tratamento como na FIG. 8C no dia 5 pós-injeção de células tumorais.

[0108] FIG. 9 fornece gráficos que representam a mudança de peso da linha de base (painel esquerdo) e a sobrevivência correspondente ao longo do tempo (painel direito) de camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados, com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS (n = 5), anti-PD-1 anticorpo em combinação com MSA-IL2 e IL12-MSA (n = 5), ou

anticorpo anti-PD-1 em combinação com Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican (n = 5) no dia 5 e dia 11. As setas indicam o tempo de tratamento. Mudança de peso e estatísticas de comparação determinadas por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Tukey. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com * (P <0,03), ** (P <0,002), *** (P <0,0002), **** (P <0,0001), n.s., não significativo.

[0109] FIGs. 10A-10B fornece um gráfico que descreve a área do tumor (painel esquerdo) e a porcentagem de sobrevivência (painel direito) de camundongos com tumor EMT6 (FIG. 10A) ou camundongos com tumor MC38 (FIG. 10B) e tratados como indicado (setas) em dia 5, 11 e 17 conforme indicado (setas). Mudança de peso e estatísticas de comparação determinadas por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Tukey. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância indicada com *, P <0,03; **, P <0,002; ***, P <0,0002; ****, P <0,0001; n.s., não significativo.

[0110] FIG. 11 fornece gráficos que representam a mudança de peso da linha de base (esquerda, média + SD), área de tumor correspondente (meio, média + SD) e sobrevivência (direita) de camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS (n = 12) ou IL-12 (n = 10 para IL12-MSA; n = 10 para IL12-MSA-Lumican), ou vacina contra o câncer (n = 7) sozinha, ou vacina contra o câncer e IL12 (n = 7 para IL12 -MSA; n = 7 para IL12-MSA-Lumican) nos dias 5, 11 e 17 conforme indicado (setas). A área do tumor é mostrada até que um rato atinja o critério de eutanásia (> 100 mm²). Estatísticas de mudança de

peso, mostradas no gráfico, determinadas por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Tukey. Estatísticas de sobrevivência, adjacentes à legenda, determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância assumida com *, $P < 0,03$; **, $P < 0,002$; ***, $P < 0,0002$; ****, $P < 0,0001$; n.s., não significativo.

[0111] FIG. 12 fornece gráficos que representam a mudança de peso da linha de base (esquerda, média + SD), área de tumor correspondente (meio, média + SD) e porcentagem de sobrevivência (direita) de camundongos com tumor de melanoma B16F10, tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS ($n = 11$) ou IL-12 ($n = 9$ para IL12-MSA; $n = 5$ para IL12-MSA-Lumican), ou CAR-T ($n = 11$) sozinho, ou CAR-T e IL12 ($n = 9$ para IL12-MSA; $n = 5$ para IL12-MSA-Lumican) nos dias 5 e 11 conforme indicado (setas). Os camundongos foram inoculados com células B16F10 no dia 0 e linfodespletados por irradiação corporal total no dia 4. Os tratamentos CAR-T foram administrados em uma única injeção de bolus na veia da cauda (iv) no dia 5. Área do tumor mostrada até que um camundongo alcance o critério de eutanásia ($> 100 \text{ mm}^2$). Estatísticas de mudança de peso, mostradas no gráfico, determinadas por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Tukey. Estatísticas de sobrevivência, adjacentes à legenda, determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância assumida com *, $P < 0,03$; **, $P < 0,002$; ***, $P < 0,0002$; ****, $P < 0,0001$; n.s., não significativo.

[0112] FIG. 13 fornece gráficos que representam a mudança de peso corporal total durante o tratamento neoadjuvante (esquerda), crescimento do tumor primário e peso (meio) e sobrevivência (direita) de camundongos com tumor de carcinoma

mamário 4T1 tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de IL-12 (n = 5 para IL12; n = 5 para IL12-MSA-Lumican) e injeção intraperitoneal (ip) de anti-PD-1 no dia 7 e 13. As setas indicam o tempo de tratamento e a cruz indica o tempo de cirurgia. Os camundongos foram inoculados com células 4T1-Luc na almofada de gordura mamária no dia 0. A terapia neoadjuvante foi administrada nos dias 7 e 13 e os tumores primários foram excisados cirurgicamente no dia 16. Os camundongos pós-operação foram monitorados por imagem in vivo (IVIS) para metástases. Para cada grupo, a área do tumor mostrada até que o tumor primário seja excisado. Estatísticas de mudança de peso, mostradas no gráfico, determinadas por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Tukey. Estatísticas de sobrevivência, adjacentes à legenda, determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank. Significância assumida com *, $P < 0,03$; **, $P < 0,002$; ***, $P < 0,0002$; ****, $P < 0,0001$; n.s., não significativo.

[0113] FIG. 14A fornece um gráfico que representa a área média do tumor de camundongos com tumor de carcinoma mamário 4T1 tratados intratumoralmente com Lumican-GLuc ou uma combinação de Lumican-CCL3, Lumican-CCL4 e Lumican-CCL no dia 7 e dia 13. A administração de IFN α intraperitonealmente ocorreu em dia 9 e dia 15. O crescimento do tumor (média + SEM) monitorado ao longo do tempo em dias alternados.

[0114] FIG. 14B fornece um gráfico que representa a área média do tumor de camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados intratumoralmente com Lumican-GLuc ou uma combinação de Lumican-CCL3, Lumican-CCL4 e Lumican-CCL5 no dia 7 e dia 13. Administração de IFN α intraperitonealmente no dia 9 e dia 15. O crescimento do tumor (média + SEM) monitorado ao longo

do tempo em dias alternados.

[0115] FIG. 14C fornece um gráfico que descreve o efeito de várias concentrações de proteínas de fusão Lumican-GLuc (Lum GLuc), Lumican-CCL3 (Lum CCL3), Lumican-CCL5 (Lum CCL5) na proliferação de células tumorais de mama 4T1 in vitro. A proliferação foi determinada por medição do reagente de proliferação WST-1 por absorvância a 450 nm.

[0116] FIG. 14D fornece um gráfico que descreve o efeito de várias concentrações de proteínas de fusão Lumican-GLuc (Lum GLuc), Lumican-CCL3 (Lum CCL3), Lumican-CCL5 (Lum CCL5) na proliferação de células tumorais de melanoma B16F10 in vitro. A proliferação foi determinada por medição do reagente de proliferação WST-1 por absorvância a 450 nm.

[0117] FIG. 15 fornece um gráfico que representa áreas tumorais médias de lesões tumorais em camundongos com tumor de melanoma B16F10 tratados com uma vacina contra o câncer administrada por via subcutânea (sc) na base da cauda com um prime no dia 5 e reforços no dia 11 e 17 pós-injeção de células tumorais. A vacina contra o câncer foi administrada sozinha ou em combinação com CCL11-lumican, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ ou Lumican, conforme indicado, administrada por via intratumoral nos dias 11, 17, 23 e 29. A área do tumor (média + DP) foi medida ao longo do tempo em dias alternados.

[0118] FIGs. 16A-16B fornece um gráfico que representa áreas tumorais individuais de lesões tumorais em camundongos portadores de tumor de melanoma B16F10 tratados com um anticorpo direcionado a tumor 2.5F-Fc (ip) e MSA-IL2 (ip) nos dias 5, 11 e 17 após - injeção de células tumorais em combinação com lumican (Lwt) (i.tu.) (FIG. 16B) ou CCL11-lumican (11L) (i.tu.) (FIG. 16A) administrado nos dias 5 e

11. Área do tumor monitorado ao longo do tempo em dias alternados.

[0119] FIG. 17A fornece um gráfico que mostra a ligação de proteínas de fusão anticorpo-lumican agonistas ao colágeno tipo I em função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA.

[0120] FIG. 17B fornece um gráfico que quantifica a fluorescência in vivo de um anticorpo anti-FITC de camundongo (4420) sozinho ou fundido com Lumican marcado por fluorescência com Alexa Fluor® 647 após injeção intratumoral em tumores 4T1 de mic ao longo do tempo, conforme determinado por imagem de fluorescência in vivo. A medição da fluorescência in vivo é fornecida em unidades de eficiência radiante total (p/s)/($\mu\text{W}/\text{cm}^2$).

[0121] FIG. 18A fornece um gráfico que mostra a ligação de um subconjunto de proteínas de fusão de ligação lumican-IgG marcadas com His, conforme indicado, ao colágeno tipo I (painel esquerdo) ou colágeno IV (painel direito) em função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA.

[0122] FIG. 18B fornece um gráfico que representa a ligação de proteínas de fusão de ligação lumican-IgG marcadas com His ao controle de isotipo IgG2a de camundongo (Clone C1.18.4) como uma função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA. Anti-His (clone ab1187) foi usado para detectar cada construção.

[0123] FIG. 19 fornece imagens de microscopia 3D de tecido omental de camundongo de camundongos portadores de tumor de ovário humano OVCA433 mostrando acúmulo específico de lumican marcado com Alexa Fluor 647 (amarelo) em torno de microcolônias de células tumorais de ovário humano OVCA433

expressando RFP (vermelho) no tecido de omental de camundongo colágeno fotografado por microscopia SHG em cinza. Lumican marcado foi injetado intraperitonealmente em camundongos com tumor.

[0124] FIG. 20A fornece gráficos que representam a expressão de proteínas de fusão de IL-12 sozinhas ou fundidas a uma proteína fluorescente (mCherry), como indicado, a partir de um RNA de autorreplicação em células B16F10, conforme determinado por citometria de fluxo.

[0125] FIG. 20B fornece um gráfico que representa a expressão de proteínas de fusão de IL-12 sozinhas ou fundidas a uma proteína fluorescente (mCherry), conforme indicado, a partir de um RNA de autorreplicação em células B16F10 conforme determinado por um ELISA de IL-12.

[0126] FIG. 21A fornece um gráfico que mostra o volume do tumor (média + SD) de camundongos com tumor tratados com uma injeção intratumoral de PBS (n = 4) ou com citocinas de ancoragem de colágeno intratumoral Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican e intraperitoneal TA99 e anti-PD-1 (n = 5) nos dias 25, 31, 37, 43, 49, 55 e 61. Para cada grupo, o volume do tumor é mostrado até que um camundongo alcance o critério de eutanásia ($> 1200 \text{ mm}^3$).

[0127] FIG. 21B fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox de camundongos com tumor tratados com PBS intratumoral (n = 10), com Lumican-MSA-IL2 intratumoral e IL12-MSA-Lumican e TA99 intraperitoneal e anti-PD-1 (n = 14), com intratumoral Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican e intraperitoneal anti-PD-1 (n = 10), com intratumoral MSA-IL2 e IL12-MSA e intraperitoneal TA99 e anti-PD-1 (n = 9), ou com MSA-IL2 e IL12-MSA intratumoral e anti-PD-1 intraperitoneal

(n = 8) nos dias 25, 31, 37, 43, 49, 55 e 61. As setas indicam os tempos de tratamento. O gráfico de sobrevida geral enumera camundongos que sucumbiram à carga tumoral (> 1200 mm³) ou à perda de peso relacionada ao tratamento (> 20%); o último é indicado por um "x" azul para cada mouse. A sobrevivência foi comparada pelo teste de Mantel-Cox log-rank. * P < 0,03, *** P < 0,0002, **** P < 0,0001.

[0128] FIG. 22A fornece um esquema para medir a capacidade de ligação de LAIR em tumores B16F10.

[0129] FIG. 22B fornece um gráfico que mostra o peso de um tumor excisado e sua matriz extracelular.

[0130] FIG. 22C fornece um gráfico que mostra o teor de hidroxiprolina da fração de células B16F10 em comparação com a fração de matriz.

[0131] FIG. 22D fornece um gráfico que mostra o esgotamento da fluorescência de LAIR quando uma fração de matriz derivada de B16F10 foi colocada em um 1 mL de LAIR marcado com AF647.

[0132] FIG. 22E fornece um gráfico que mostra a correlação entre o teor de hidroxiprolina da fração da matriz e a capacidade de ligação de LAIR da fração da matriz derivada de B16F10.

[0133] FIG. 23A fornece um gráfico que mostra a área do tumor de tumores de melanoma B16F10 (1x10⁶ células inoculadas no dia 0) tratadas com controle PBS (i.tu) (n = 5) ou LAIR-MSA-IL2 (i.tu) TA99 (ip) (n = 7) nos dias 6 e 13.

[0134] FIG. 23B fornece uma curva de sobrevivência de Mantel-Cox de camundongos com tumor de melanoma B16F10 (1x10⁶ células inoculadas no dia 0) tratados com controle de PBS (i.tu) (n = 5) ou LAIR-MSA-IL2 (i.tu) + TA99 (ip) (n = 7) nos dias 6 e 13.

[0135] FIG. 24A fornece um alinhamento de sequência de ligantes de colágeno de baixa afinidade, LAIR.30.w.A, LAIR.30.w.B, LAIR.30.w.C e LAIR.30.w. D, em comparação com LAIR de tipo selvagem (LAIR).

[0136] FIGS. 24B-E fornecem representações das estruturas cristalinas de LAIR de tipo selvagem (PDB 4ETY) mostradas como uma fita cinza, com resíduos de aminoácidos mutados selecionados de ligantes de colágeno de baixa afinidade, LAIR.30.wA (FIG. 24B), LAIR.30 .wB (FIG. 24C), LAIR.30.wC (FIG. 24D) e LAIR.30.d. D (FIG. 24E), destacado como esferas ligadas.

[0137] FIG. 24F fornece um gráfico que mostra a ligação de WT LAIR, WT LAIR-MSA, MSA-IL-2 (controle de ligação não específico) e fusões mutantes de LAIR-MSA ao colágeno tipo 1 em um ensaio ELISA (n = 2). A afinidade de ligação (Kd) de cada construção LAIR, calculada em um ajuste de ligação de um local não linear, também é mostrada.

[0138] FIG. 25A fornece um alinhamento de sequência de ligantes de colágeno de baixa afinidade, LAIR.30.w.E e LAIR.30.w.F em comparação com o LAIR de tipo selvagem.

[0139] FIGS. 25B-C fornecem representações das estruturas cristalinas de LAIR de tipo selvagem (PDB 4ETY) mostradas como uma fita cinza, com resíduos de aminoácidos mutados selecionados de ligantes de colágeno de baixa afinidade, LAIR.30.wE (FIG. 25B) e LAIR.30 .W. F (FIG. 25C), destacado como esferas ligadas.

[0140] FIG. 25D fornece um gráfico que mostra a ligação de WT LAIR, WT LAIR-MSA, MSA-IL-2 (controle de ligação não específico) e fusões mutantes de LAIR-MSA ao colágeno tipo 1 em um ensaio ELISA (n = 2). A afinidade de ligação (Kd) de

cada construção LAIR, modelada em um ajuste de ligação de um local não linear, também é mostrada.

[0141] FIG. 26A fornece um alinhamento de sequência de ligante de colágeno de alta afinidade, LAIR.30.2.K1.B, em comparação com LAIR de tipo selvagem.

[0142] FIG. 26B fornece uma representação da estrutura cristalina de LAIR de tipo selvagem (PDB 4ETY) mostrada como uma fita cinza, com resíduos de aminoácidos mutados selecionados de aglutinante de colágeno de alta afinidade, LAIR.30.2.K1.B, destacados como esferas ligadas.

[0143] FIGS. 26C-D fornecem gráficos de citometria de fluxo mostrando ligação de CRP-XL-biotina (Streptavidin-AF647) versus exibição de proteína (cabra anti-galinha AF488) de levedura com LAIR de tipo selvagem (preto) ou LAIR30.2.K1.B (ciano) incubado em 100 nM (FIG. 26C) ou 0,01 nM (FIG. 26D) de CRP-XL-biotina.

[0144] FIGS. 26E-F fornecem gráficos de citometria de fluxo mostrando o sinal de superfície restante de CRP-XL-biotina (Streptavidin-AF647) versus exibição de proteína (cabra anti-galinha AF488) de levedura com LAIR30.2.K1.B (FIG. 26E) ou tipo selvagem LAIR (FIG. 26F) em diferentes pontos de tempo (0 horas, 16 horas e 40 horas de competição) após competição com um excesso de CRP-XL não biotinilado.

[0145] FIGS. 26G fornece um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência mediana de CRP-XL-biotina ligada ao longo do tempo no experimento de dissociação cinética representado nas FIGS. 26E-F. As taxas de desativação estimadas, modeladas em um ajuste de decaimento exponencial de uma fase, também são mostradas.

Descrição detalhada da descrição

[0146] São fornecidas aqui proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio imunomodulador operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno. Essas proteínas de fusão localizam o domínio imunomodulador (por exemplo, citocina, anticorpo), de modo que não seja disseminado sistemicamente. A disseminação sistêmica de um domínio imunomodulador pode resultar em eficácia reduzida devido à eliminação rápida do local de interesse (por exemplo, tumor) e/ou toxicidade devido a efeitos em células não-alvo fora do tumor. Por conseguinte, a ligação de um domínio imunomodulador a uma proteína de ligação ao colágeno localiza o domínio imunomodulador para prevenir a disseminação sistêmica, mantendo assim o domínio imunomodulador no local de interesse e reduzindo os efeitos potenciais fora do alvo que poderiam levar à toxicidade.

Definições

[0147] Os termos usados nas reivindicações e especificações são definidos conforme estabelecido abaixo, a menos que especificado de outra forma. No caso de conflito direto com um termo usado em um pedido de patente provisório pai, o termo usado no presente pedido prevalecerá.

[0148] Deve-se notar que, conforme usado na especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o" incluem referentes plurais, a menos que o contexto claramente dite o contrário.

[0149] Conforme usado neste documento, "cerca de" será entendido por pessoas de habilidade comum e irá variar até certo ponto, dependendo do contexto em que é usado. Se houver usos do termo que não são claros para pessoas de habilidade comum, dado o contexto em que é usado, "cerca de" significará

mais ou menos 10% do valor particular.

[0150] Tal como aqui utilizado, o termo "agonista" refere-se a qualquer molécula (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) que parcialmente ou totalmente promove, aumenta ou ativa uma atividade biológica de um polipeptídeo nativo aqui divulgado. Moléculas agonistas adequadas incluem especificamente anticorpos agonistas ou fragmentos de anticorpos, fragmentos ou variantes de sequência de aminoácidos de polipeptídeos nativos, peptídeos, oligonucleotídeos antisense, pequenas moléculas orgânicas, etc. Em algumas concretizações, a ativação na presença do agonista é observada em um dependente da dose maneira. Em algumas concretizações, o sinal medido (por exemplo, atividade biológica) é pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 100% mais alto do que o sinal medido com um controle negativo sob condições comparáveis. Também são divulgados neste documento métodos de identificação de agonistas adequados para uso nos métodos da divulgação. Por exemplo, esses métodos incluem, mas não estão limitados a, ensaios de ligação, como ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), Forte Bio © systems e radioimunoensaio (RIA). Estes ensaios determinam a capacidade de um agonista de se ligar ao polipeptídeo de

interesse (por exemplo, um receptor ou ligante) e, portanto, indicam a capacidade do agonista de promover, aumentar ou ativar a atividade do polipeptídeo. A eficácia de um agonista também pode ser determinada usando ensaios funcionais, como a capacidade de um agonista para ativar ou promover a função do polipeptídeo. Por exemplo, um ensaio funcional pode compreender o contato de um polipeptídeo com uma molécula agonista candidata e a medição de uma mudança detectável em uma ou mais atividades biológicas normalmente associadas ao polipeptídeo. A potência de um agonista é geralmente definida por seu valor EC50 (concentração necessária para ativar 50% da resposta do agonista). Quanto mais baixo for o valor de EC50, maior será a potência do agonista e mais baixa será a concentração necessária para ativar a resposta biológica máxima.

[0151] O termo "albumina" refere-se a uma proteína com a mesma estrutura tridimensional ou muito semelhante à albumina humana (SEQ ID NO: 42) e com uma meia-vida sérica longa. Proteínas de albumina exemplares incluem albumina de soro humano (HSA; SEQ ID NOs: 42 e 43), albumina de soro de primata (como albumina de soro de chimpanzé), albumina de soro de gorila ou albumina de soro de macaco, albumina de soro de roedor (como albumina de soro de hamster), Guiné albumina de soro de porco, albumina de soro de camundongo e albumina de soro de rato, albumina de soro bovino (como albumina de soro de vaca), albumina de soro equino (como albumina de soro de cavalo ou albumina de soro de burro), albumina de soro de coelho, albumina de soro de cabra, albumina de soro de ovelha, albumina de soro de cão, albumina de soro de frango e albumina de soro de porco.

[0152] O termo "melhoria" refere-se a qualquer resultado terapeuticamente benéfico no tratamento de um estado de doença, por exemplo, câncer, incluindo profilaxia, diminuição da gravidade ou progressão, remissão ou cura dos mesmos.

[0153] "Aminoácido" refere-se a aminoácidos de ocorrência natural e sintéticos, bem como análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que funcionam de maneira semelhante aos aminoácidos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles aminoácidos que são posteriormente modificados, por exemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato e O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se referem a compostos que têm a mesma estrutura química básica de um aminoácido de ocorrência natural, ou seja, um carbono que está ligado a um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino e um grupo R, por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio. Esses análogos têm grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou esqueletos peptídicos modificados, mas mantêm a mesma estrutura química básica de um aminoácido de ocorrência natural. Miméticos de aminoácidos referem-se a compostos químicos que possuem uma estrutura diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funcionam de maneira semelhante a um aminoácido de ocorrência natural.

[0154] Os aminoácidos podem ser referidos aqui por seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB. Os nucleotídeos, da mesma forma, podem ser referidos por seus códigos de uma letra comumente aceitos.

[0155] Uma "substituição de aminoácido" refere-se à substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido existente em uma sequência de aminoácidos predeterminada (uma sequência de aminoácido de um polipeptídeo de partida) por um segundo resíduo de aminoácido de "substituição" diferente. Uma "inserção de aminoácido" refere-se à incorporação de pelo menos um aminoácido adicional em uma sequência de aminoácidos predeterminada. Embora a inserção geralmente consista na inserção de um ou dois resíduos de aminoácidos, também podem ser feitas "inserções de peptídeo" maiores e, por exemplo, inserção de cerca de três a cerca de cinco ou mesmo até cerca de dez, quinze ou vinte resíduos de aminoácidos. O (s) resíduo (s) inserido (s) podem ser de ocorrência natural ou de ocorrência não natural, conforme divulgado acima. Uma "deleção de aminoácido" refere-se à remoção de pelo menos um resíduo de aminoácido de uma sequência de aminoácidos predeterminada.

[0156] Tal como aqui utilizado, o termo "antagonista" refere-se a qualquer molécula (por exemplo, anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) que parcialmente ou totalmente bloqueia, inibe ou neutraliza uma atividade biológica de um polipeptídeo nativo aqui divulgado. As moléculas antagonistas adequadas incluem especificamente anticorpos antagonistas ou fragmentos de anticorpos, fragmentos ou variantes de sequência de aminoácidos de polipeptídeos nativos, peptídeos, oligonucleotídeos antisense, pequenas moléculas orgânicas, etc. Em algumas concretizações, a inibição na presença do antagonista é observada em um dependente da dose maneira. Em algumas concretizações, o sinal medido (por exemplo, atividade

biológica) é pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 100% mais baixo do que o sinal medido com um controle negativo sob condições comparáveis. Também são divulgados aqui métodos de identificação de antagonistas adequados para uso nos métodos da divulgação. Por exemplo, esses métodos incluem, mas não estão limitados a, ensaios de ligação, como ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), Forte Bio © systems e radioimunoensaio (RIA). Estes ensaios determinam a capacidade de um antagonista se ligar ao polipeptídeo de interesse (por exemplo, um receptor ou ligante) e, portanto, indicam a capacidade do antagonista de inibir, neutralizar ou bloquear a atividade do polipeptídeo. A eficácia de um antagonista também pode ser determinada usando ensaios funcionais, como a capacidade de um antagonista para inibir a função do polipeptídeo ou de um agonista. Por exemplo, um ensaio funcional pode compreender o contato de um polipeptídeo com uma molécula de antagonista candidata e a medição de uma alteração detectável em uma ou mais atividades biológicas normalmente associadas ao polipeptídeo. A potência de um antagonista é geralmente definida por seu valor IC50 (concentração necessária para inibir 50% da resposta do agonista). Quanto mais baixo for o valor de IC50, maior será a potência do antagonista e menor

será a concentração necessária para inibir a resposta biológica máxima.

[0157] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a um anticorpo completo compreendendo dois polipeptídeos de cadeia leve e dois polipeptídeos de cadeia pesada. Anticorpos inteiros incluem diferentes isotipos de anticorpos, incluindo anticorpos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. O termo "anticorpo" inclui um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico ou quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo primatizado, um anticorpo desimunizado e um anticorpo totalmente humano. O anticorpo pode ser feito ou derivado de qualquer uma de uma variedade de espécies, por exemplo, mamíferos como humanos, primatas não humanos (por exemplo, orangotango, babuínos ou chimpanzés), cavalos, gado, porcos, ovelhas, cabras, cães, gatos, coelhos, porquinhos-da-índia, gerbils, hamsters, ratos e camundongos. O anticorpo pode ser um anticorpo purificado ou recombinante.

[0158] Tal como aqui utilizado, o termo "fragmento de anticorpo", "fragmento de ligação ao antígeno" ou termos semelhantes referem-se a um fragmento de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar a um (s) antígeno (s) alvo e promover, induzir e/ou aumentar a atividade do antígeno alvo. Tais fragmentos incluem, por exemplo, um anticorpo de cadeia única, um fragmento Fv de cadeia única (scFv), um fragmento Fd, um fragmento Fab, um fragmento Fab' ou um fragmento F(ab')₂. Um fragmento scFv é uma única cadeia polipeptídica que inclui as regiões variáveis da cadeia pesada e leve do anticorpo a partir do qual o scFv é derivado. Além disso, intracorpos, minicorpos, triacorpos e diacorpos também estão

incluídos na definição de anticorpo e são compatíveis para uso nos métodos descritos neste documento. Ver, por exemplo, Todorovska et al. (2001) J Immunol Methods 248 (1): 47-66; Hudson e Kortt (1999) J Immunol Methods 231 (1): 177-189; Poljak (1994) Structure 2 (12): 1121-1123; Rondon e Marasco (1997) Annual Review of Microbiology 51: 257-283, as divulgações de cada uma das quais são incorporadas neste documento por referência em sua totalidade.

[0159] Tal como aqui utilizado, o termo "fragmento de anticorpo" também inclui, por exemplo, anticorpos de domínio único, como anticorpos de domínio único camelizados. Ver, por exemplo, Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem Sci 26: 230-235; Nuttall et al. (2000) Curr Pharm Biotech 1: 253-263; Reichmann et al. (1999) J Immunol Meth 231: 25-38; Publicação do aplicativo PCT nos. WO 94/04678 e WO 94/25591; e patente U.S. no. 6.005.079, todos os quais são incorporados neste documento por referência em sua totalidade. Em algumas concretizações, a divulgação fornece anticorpos de domínio único compreendendo dois domínios VH com modificações de modo que anticorpos de domínio único sejam formados.

[0160] A "família B7" refere-se aos ligantes de ativação e inibição. A família B7 abrange pelo menos os ligantes ativadores B7-1 e B7-2 e os ligantes inibitórios B7-H1, B7-H2, B7-H3 e B7-H4. B7-1 e B7-2 se ligam a CD28, B7-H1 (isto é, PD-L1) liga-se a PD-1 e B7-H2 liga-se a ICOS. B7-H3 e B7-H4 ligam receptores desconhecidos. Além disso, B7-H3 e B7-H4 mostraram ser regulados positivamente em células tumorais e células infiltrantes de tumor. A sequência completa de hB7-H3 e hB7-H4 pode ser encontrada nos números de acesso do GenBank Q5ZPR3 e AAZ17406 (SEQ ID NOs: 49 e 50), respectivamente.

[0161] Tal como aqui utilizado, o termo "receptor de antígeno quimérico (CAR)" refere-se a um receptor de proteína transmembrana artificial que compreende (i) um domínio extracelular capaz de se ligar a pelo menos um ligante ou antígeno CAR predeterminado, ou um ligante CAR predeterminado e um antígeno, (ii) um segmento intracelular compreendendo um ou mais domínios citoplasmáticos derivados de proteínas de transdução de sinal diferentes do polipeptídeo do qual o domínio extracelular é derivado, e (iii) um domínio transmembranar. O "receptor de antígeno quimérico (CAR)" às vezes é chamado de "receptor quimérico", um "corpo T" ou um "receptor imune quimérico (CIR)".

[0162] A frase "ligante CAR" usada de forma intercambiável com "antígeno CAR" significa qualquer molécula natural ou sintética (por exemplo, molécula pequena, proteína, peptídeo, lipídio, carboidrato, ácido nucleico) ou parte ou fragmento deste que pode se ligar especificamente a um CAR (por exemplo, o domínio extracelular de um CAR). Em algumas concretizações, o ligante CAR é um antígeno associado a tumor ou fragmento do mesmo. Em algumas concretizações, o ligante CAR é uma etiqueta.

[0163] O "domínio de sinalização intracelular" significa qualquer oligopeptídeo ou domínio polipeptídico conhecido por funcionar para transmitir um sinal causando ativação ou inibição de um processo biológico em uma célula, por exemplo, ativação de uma célula imune, como uma célula T ou uma célula NK. Os exemplos incluem cadeia ILR, CD28 e/ou CD3ζ.

[0164] Tal como aqui utilizado, "antígeno de câncer" refere-se a (i) antígenos específicos de tumor, (ii) antígenos associados a tumor, (iii) células que expressam

antígenos específicos de tumor, (iv) células que expressam antígenos associados a tumor, (v) antígenos embrionários em tumores, (vi) células tumorais autólogas, (vii) antígenos de membrana específicos de tumor, (viii) antígenos de membrana associados a tumores, (ix) receptores de fator de crescimento, (x) ligantes de fator de crescimento e (xi) qualquer outro tipo de antígeno ou célula ou material apresentador de antígeno que está associado a um câncer.

[0165] Tal como aqui utilizado, "vacina contra o câncer" refere-se a um tratamento que induz o sistema imunológico a atacar as células com um ou mais antígenos associados a tumor. A vacina pode tratar o câncer existente (por exemplo, vacina terapêutica contra o câncer) ou prevenir o desenvolvimento de câncer em certos indivíduos (por exemplo, vacina profilática contra o câncer). A vacina cria células de memória que irão reconhecer as células tumorais com o antígeno e, portanto, impedir o crescimento do tumor.

[0166] Conforme usado neste documento, o termo "quimiocina" se refere a um membro da família de pequenas citocinas, ou proteínas de sinalização, que induzem quimiotaxia dirigida. As quimiocinas são agrupadas em quatro subfamílias: CXC, CC, (X) C e CX3C.

[0167] Conforme usado neste documento, o termo "colágeno" se refere à proteína estrutural predominante localizada dentro do espaço extracelular e mantém a integridade mecânica de muitos tecidos diferentes. A organização molecular do colágeno determina sua função. Existem mais de 20 tipos de colágeno identificados atualmente, sendo o tipo I o mais comum.

[0168] Tal como aqui utilizado, o termo "domínio de ligação

ao colágeno" refere-se a um polipeptídeo, ou uma porção do mesmo, que se liga ao colágeno. Um domínio de ligação ao colágeno pode ser parte de uma proteína de fusão maior, agente bioativo ou agente farmacêutico. A ligação de uma composição, polipeptídeo ou porção do mesmo, proteína de fusão ou agente farmacêutico ou bioativo ao colágeno pode ser determinada por métodos conhecidos na técnica (por exemplo, ensaio de ligação de colágeno; ver, por exemplo, Turecek et al., (2002) *Semin Thromb Hemost* 28 (2): 149-160). Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao colágeno é determinado por sua capacidade de competir com uma proteína de ligação ao colágeno conhecida ou de referência pela ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao colágeno é derivado de uma proteína de ligação ao colágeno de ocorrência natural ou receptor de colágeno. Proteínas de ligação ao colágeno e receptores de colágeno compreendendo domínios de ligação ao colágeno são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Svensson et al., (2001) *Osteoartrite Cartilagem* 9 Supl A: S23-28; Leitinger e Hohenester E (2007) *Matrix Biol* 26 (3): 146-155). Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é derivado de uma proteína procariótica de ligação ao colágeno. As proteínas de ligação ao colágeno procarióticas são conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Symersky et al., (1997) *Nat Struct Biol* 4: 833-838). Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao colágeno compreende uma ou mais mutações que aumentam sua afinidade pelo colágeno.

[0169] Tal como aqui utilizado, "terapia de combinação" abrange a administração de cada agente ou terapia de maneira sequencial ou simultânea em um regime que proporcionará

efeitos benéficos da combinação e coadministração desses agentes ou terapias de uma maneira substancialmente simultânea, tal como em uma única cápsula tendo uma proporção fixa desses agentes ativos ou em múltiplas cápsulas separadas para cada agente. A terapia de combinação também inclui combinações onde os elementos individuais podem ser administrados em momentos diferentes e/ou por vias diferentes, mas que agem em combinação para fornecer um efeito benéfico por co-ação ou efeito farmacocinético e farmacodinâmico de cada agente ou abordagens de tratamento de tumor da terapia de combinação .

[0170] Um "sinal co-estimulador", tal como aqui utilizado, refere-se a um sinal, que em combinação com um sinal primário, tal como ligação TCR/CD3, leva à proliferação de células T e/ou regulação positiva ou regulação negativa de moléculas-chave

[0171] "Antígeno 4 Associado a Linfócitos T Citotóxicos (CTLA-4)" é uma molécula de superfície de células T e é um membro da superfamília das imunoglobulinas. Esta proteína desregula o sistema imunológico ligando-se a CD80 e CD86. O termo "CTLA-4", conforme aqui utilizado, inclui CTLA-4 humana (hCTLA-4), variantes, isoformas e espécies homólogas de hCTLA-4 e análogos com pelo menos um epítipo comum com hCTLA-4. A sequência completa de hCTLA-4 pode ser encontrada sob o N° de Acesso GenBank P16410 (SEQ ID NO: 46):

[0172] Um polipeptídeo ou sequência de aminoácidos "derivados de" um polipeptídeo ou proteína designada refere-se à origem do polipeptídeo. De preferência, o polipeptídeo ou sequência de aminoácidos que é derivada de uma sequência particular tem uma sequência de aminoácidos que é

essencialmente idêntica àquela sequência ou uma porção dela, em que a porção consiste em pelo menos 10-20 aminoácidos, de preferência pelo menos 20-30 aminoácidos, mais preferencialmente pelo menos 30-50 aminoácidos, ou que seja de outra forma identificável por um versado na técnica como tendo sua origem na sequência. Os polipeptídeos derivados de outro peptídeo podem ter uma ou mais mutações em relação ao polipeptídeo de partida, por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos que foram substituídos por outro resíduo de aminoácido ou que têm uma ou mais inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos.

Um polipeptídeo pode compreender uma sequência de aminoácidos que não ocorre naturalmente. Essas variantes têm necessariamente menos de 100% de identidade de sequência ou semelhança com a molécula de partida. Em certas concretizações, a variante terá uma sequência de aminoácidos de cerca de 75% a menos de 100% de identidade de sequência de aminoácidos ou similaridade com a sequência de aminoácidos do polipeptídeo de partida, mais preferencialmente de cerca de 80% a menos de 100%, mais preferencialmente de cerca de 85% a menos de 100%, mais preferencialmente de cerca de 90% a menos de 100% (por exemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 %) e mais preferencialmente de cerca de 95% a menos de 100%, por exemplo, ao longo do comprimento da molécula variante.

[0173] Em certas concretizações, há uma diferença de aminoácidos entre uma sequência polipeptídica de partida e a sequência derivada dela. Identidade ou semelhança com relação a esta sequência é definida neste documento como a porcentagem de resíduos de aminoácidos na sequência candidata

que são idênticos (ou seja, o mesmo resíduo) com os resíduos de aminoácidos de partida, após o alinhamento das sequências e a introdução de lacunas, se necessário, para atingir a porcentagem máxima de identidade de sequência. Em certas concretizações, um polipeptídeo consiste em, consiste essencialmente em, ou compreende uma sequência de aminoácidos selecionada da Tabela de Resumo de Sequência. Em certas concretizações, um polipeptídeo inclui uma sequência de aminoácidos de pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada da Tabela de Resumo de Sequência. Em certas concretizações, um polipeptídeo inclui uma sequência de aminoácidos contígua de pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos contígua selecionada da Tabela de Resumo de Sequência. Em certas concretizações, um polipeptídeo inclui uma sequência de aminoácidos com pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 ou 500 (ou qualquer número inteiro dentro desses números) aminoácidos contíguo de uma sequência de aminoácidos selecionada da Tabela de Resumo de Sequência.

[0174] Em certas concretizações, os peptídeos da divulgação são codificados por uma sequência de nucleotídeos. As sequências de nucleotídeos da divulgação podem ser úteis para uma série de aplicações, incluindo: clonagem, terapia gênica, expressão e purificação de proteínas, introdução de mutação, vacinação de DNA de um hospedeiro em necessidade, geração de anticorpo para, por exemplo, imunização passiva, PCR,

iniciador e geração de sondas e semelhantes. Em certas concretizações, a sequência de nucleotídeos da divulgação compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 e 33. Em certas concretizações, uma sequência de nucleotídeos inclui uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de nucleotídeos apresentada na Tabela de Resumo de Sequência. Em certas concretizações, uma sequência de nucleotídeos inclui uma sequência de nucleotídeos contígua de pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a uma sequência de nucleotídeos contígua apresentada na Tabela de Resumo de Sequência. Em certas concretizações, uma sequência de nucleotídeos inclui uma sequência de nucleotídeos com pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400 ou 500 (ou qualquer número inteiro dentro desses números) nucleotídeos contíguos de uma sequência de nucleotídeos apresentada na Tabela de Resumo de Sequência.

[0175] Será também entendido por um versado na técnica que os polipeptídeos adequados para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras divulgadas neste documento podem ser alterados de modo que variem em sequência das sequências de ocorrência natural ou nativas das quais foram derivados, embora retendo a atividade desejável das sequências nativas. Por exemplo, podem ser feitas substituições de nucleótidos ou aminoácidos que conduzem a substituições conservativas ou

alterações em resíduos de aminoácidos "não essenciais". As mutações podem ser introduzidas por técnicas padrão, como mutagênese dirigida ao local e mutagênese mediada por PCR.

[0176] Os polipeptídeos adequados para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras divulgadas neste documento podem compreender substituições conservativas de aminoácidos em um ou mais resíduos de aminoácidos, por exemplo, em resíduos de aminoácidos essenciais ou não essenciais. Uma "substituição conservativa de aminoácido" é aquela em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácidos com cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica, incluindo cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares sem carga (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). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial em um polipeptídeo de ligação é preferencialmente substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Em certas concretizações, uma cadeia de aminoácidos pode ser substituída por uma cadeia estruturalmente semelhante que difere na ordem e/ou composição dos membros da família da cadeia lateral. Alternativamente, em certas concretizações, as mutações podem ser introduzidas

aleatoriamente ao longo de toda ou parte de uma sequência de codificação, tal como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser incorporados em polipeptídeos de ligação da divulgação e rastreados quanto à sua capacidade de se ligar ao alvo desejado.

[0177] Conforme usado neste documento, o termo "célula efetora" ou "célula imune efetora" refere-se a uma célula envolvida em uma resposta imune, por exemplo, na promoção de uma resposta imune. Em algumas concretizações, as células efetoras imunes reconhecem especificamente um antígeno. Exemplos de células imunes efetoras incluem, mas não estão limitados a, células Natural Killer (NK), células B, monócitos, macrófagos, células T (por exemplo, linfócitos T citotóxicos (CTLs)). Em algumas concretizações, a célula efetora é uma célula T. Conforme usado neste documento, o termo "função imune efetora" ou "resposta imune efetora" refere-se a uma função ou resposta de uma célula imune efetora que promove uma resposta imune a um alvo.

[0178] Tal como aqui utilizado, o termo "região Fc" refere-se à porção de uma imunoglobulina nativa formada pelos respectivos domínios Fc (ou porções Fc) das suas duas cadeias pesadas. Em algumas concretizações, o termo "domínio Fc" refere-se a uma porção de uma única cadeia pesada de imunoglobulina (Ig) em que o domínio Fc não compreende um domínio Fv. Em algumas concretizações, o termo "domínio Fc" refere-se a uma porção de uma única cadeia pesada de imunoglobulina (Ig) também compreendendo um domínio Fv. Como tal, um domínio Fc também pode ser referido como "Ig" ou "IgG". Em certas concretizações, um domínio Fc começa na região de dobradiça logo a montante do local de clivagem da

papaína e termina no terminal C do anticorpo. Consequentemente, um domínio Fc completo compreende pelo menos um domínio de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3. Em certas concretizações, um domínio Fc compreende pelo menos um de: um domínio de dobradiça (por exemplo, região de dobradiça superior, média e/ou inferior), um domínio CH2, um domínio CH3, um domínio CH4 ou uma variante, porção ou fragmento do mesmo. Em certas concretizações, um domínio Fc compreende um domínio Fc completo (ou seja, um domínio de dobradiça, um domínio CH2 e um domínio CH3). Em certas concretizações, um domínio Fc compreende um domínio de dobradiça (ou parte dele) fundido a um domínio CH3 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc compreende um domínio CH2 (ou parte dele) fundido a um domínio CH3 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio CH3 ou parte dele. Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio de dobradiça (ou parte dele) e um domínio CH3 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio CH2 (ou parte dele) e um domínio CH3. Em certas concretizações, um domínio Fc consiste em um domínio de dobradiça (ou parte dele) e um domínio CH2 (ou parte dele). Em certas concretizações, um domínio Fc carece de pelo menos uma porção de um domínio CH2 (por exemplo, todo ou parte de um domínio CH2). Um domínio Fc aqui geralmente se refere a um polipeptídeo compreendendo todo ou parte do domínio Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Isto inclui, mas não está limitado a, polipeptídeos compreendendo os domínios CH1, dobradiça, CH2 e/ou CH3 inteiros, bem como fragmentos de tais peptídeos compreendendo apenas, por exemplo, a dobradiça, CH2

e domínio CH3. O domínio Fc pode ser derivado de uma imunoglobulina de qualquer espécie e/ou qualquer subtipo, incluindo, mas não se limitando a, um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE ou IgM humano. Uma região constante de IgG1 humana pode ser encontrada em Uniprot P01857 e SEQ ID NO: 114. O domínio Fc de IgG1 humano pode ser encontrado em SEQ ID NO: 115. O domínio Fc abrange moléculas Fc nativas e variantes Fc. Tal como acontece com as variantes Fc e Fc's nativos, o termo domínio Fc inclui moléculas na forma monomérica ou multimérica, digeridas a partir do anticorpo inteiro ou produzidas por outros meios. A atribuição de números de resíduos de aminoácidos a um domínio Fc está de acordo com as definições de Kabat. Ver, por exemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Índice, Introdução e seções de Sequências de Região Constante), 5ª edição, Bethesda, MD: NIH vol. 1: 647-723 (1991); Kabat et al., "Introduction" Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept of Health and Human Services, NIH, 5ª edição, Bethesda, MD vol. I: xiii-xcvi (1991); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-883 (1989), cada um dos quais é aqui incorporado por referência para todos os efeitos.

[0179] Conforme estabelecido neste documento, será entendido por um versado na técnica que qualquer domínio Fc pode ser modificado de modo que varie na sequência de aminoácidos do domínio Fc nativo de uma molécula de imunoglobulina de ocorrência natural. Em certas concretizações, o domínio Fc tem função efetora reduzida (por exemplo, ligação de Fc γ R).

[0180] Os domínios Fc adequados para uso nas proteínas de

fusão imunomoduladoras aqui divulgadas podem ser derivados de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, um domínio Fc de um polipeptídeo pode compreender um domínio CH2 e/ou CH3 derivado de uma molécula de IgG1 e uma região de dobradiça derivada de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, um domínio Fc pode compreender uma região de dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Em outro exemplo, um domínio Fc pode compreender uma dobradiça quimérica derivada, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG4.

[0181] Como aqui utilizado, o termo "ligante polipeptídico gly-ser" ou "ligante gly-ser" refere-se a um peptídeo que consiste em resíduos de glicina e serina. Um exemplo de ligante polipeptídico gly-ser compreende a sequência de aminoácidos Ser (Gly4Ser) n. Em certas concretizações, n = 1. Em certas concretizações, n = 2. Em certas concretizações, n = 3, ou seja, Ser (Gly4Ser) 3. Em certas concretizações, n = 4, ou seja, Ser (Gly4Ser) 4. Em certas concretizações, n = 5. Em certas concretizações, n = 6. Em certas concretizações, n = 7. Em certas concretizações, n = 8. Em certas concretizações, n = 9. Em certas concretizações, n = 10. Outro ligante polipeptídico de gly-ser exemplar compreende a sequência de aminoácidos (Gly4Ser) n. Em certas concretizações, n = 1. Em certas concretizações, n = 2. Em certas concretizações, n = 3. Em certas concretizações, n = 4. Em certas concretizações, n = 5. Em certas concretizações, n = 6. Outro ligante polipeptídico de gly-ser exemplar compreende a sequência de aminoácidos (Gly3Ser) n. Em certas concretizações, n = 1. Em certas concretizações, n = 2. Em

certas concretizações, n = 3. Em certas concretizações, n = 4. Em certas concretizações, n = 5. Em certas concretizações, n = 6.

[0182] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo humano" inclui anticorpos com regiões variáveis e constantes (se presentes) de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da divulgação podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do local in vitro ou por mutação somática in vivo) (ver, Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93 e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764: 536-546). No entanto, o termo "anticorpo humano" não inclui anticorpos nos quais as sequências CDR derivadas da linha germinal de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foi enxertado em sequências estruturais humanas (isto é, anticorpos humanizados).

[0183] Conforme usado neste documento, o termo um "anticorpo heterólogo" é definido em relação ao organismo transgênico não humano que produz tal anticorpo. Este termo refere-se a um anticorpo possuindo uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de ácido nucleico de codificação correspondente àquela encontrada em um organismo que não consiste no animal não humano transgênico e, geralmente, de uma espécie diferente daquela do animal não humano transgênico.

[0184] Conforme usado neste documento, "célula imune" é uma

célula de origem hematopoiética e que desempenha um papel na resposta imune. As células imunes incluem linfócitos (por exemplo, células B e células T), células assassinas naturais e células mieloides (por exemplo, monócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, basófilos e granulócitos).

[0185] Tal como aqui utilizado, "ponto de verificação imunológico" refere-se a sinais co-estimuladores e inibidores que regulam as células imunológicas. Em certas concretizações, o ponto de verificação imunológico é um sinal inibitório. Em certas concretizações, o sinal inibitório é a interação entre PD-1 e PD-L1. Em certas concretizações, o sinal inibitório é a interação entre CTLA-4 e CD80 ou CD86 para deslocar a ligação de CD28. Em certas concretizações, o sinal inibidor é a interação entre as moléculas LAG3 e MHC de classe II. Em certas concretizações, o sinal inibitório é a interação entre TIM3 e galectina 9.

[0186] Tal como aqui utilizado, "bloqueador de ponto de controle imunológico" refere-se a uma molécula que reduz, inibe, interfere ou modula uma ou mais proteínas de ponto de controle total ou parcialmente. Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de controle imunológico evita sinais inibitórios associados ao ponto de controle imunológico. Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de controle imunológico é um anticorpo, ou fragmento do mesmo, que interrompe a sinalização inibitória associada ao ponto de controle imunológico. Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de controle imunológico é uma pequena molécula que interrompe a sinalização inibitória. Em certas concretizações, o bloqueador de checkpoint imune é um anticorpo, fragmento deste ou imitador de anticorpo, que

evita a interação entre proteínas bloqueadoras de checkpoint, por exemplo, um anticorpo, ou fragmento deste, que evita a interação entre PD-1 e PD-L1. Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de controle imunológico é um anticorpo, ou fragmento do mesmo, que evita a interação entre CTLA-4 e CD80 ou CD86. Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de verificação imunológico é um anticorpo, ou fragmento do mesmo, que impede a interação entre LAG3 e seus ligantes, ou TIM-3 e seus ligantes.

[0187] Tal como aqui utilizado, o termo "proteína de fusão imunomoduladora" refere-se a um polipeptídeo que compreende um domínio de ligação ao colágeno operacionalmente ligado a pelo menos um domínio imunomodulador. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno está operacionalmente ligado ao domínio imunomodulador por meio de um ligante.

[0188] Tal como aqui utilizado, o termo "domínio imunomodulador" refere-se a um polipeptídeo (por exemplo, citocina, agonista ou anticorpo antagonista) que confere uma atividade que resulta na ativação ou supressão de uma resposta imune (por exemplo, estimulação de células T CD8 +). Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador se refere a um polipeptídeo que se liga ao seu ligante ou receptor cognato, resultando assim na ativação ou supressão de uma resposta imune.

[0189] Os termos "indução de uma resposta imune" e "aumento de uma resposta imune" são usados indistintamente e se referem à estimulação de uma resposta imune (isto é, passiva ou adaptativa) a um antígeno particular. O termo "induzir", conforme usado em relação à indução de CDC ou ADCC, refere-se

à estimulação de determinados mecanismos diretos de morte celular.

[0190] Conforme usado neste documento, um sujeito "em necessidade de prevenção", "em necessidade de tratamento" ou "em necessidade dele" refere-se a alguém que, pelo julgamento de um médico adequado (por exemplo, um médico, uma enfermeira ou uma enfermeira no caso de humanos; um veterinário no caso de mamíferos não humanos), se beneficiaria razoavelmente de um determinado tratamento (tal como o tratamento com uma composição compreendendo uma proteína de fusão aqui descrita).

[0191] O termo "*in vivo*" refere-se a processos que ocorrem em um organismo vivo.

[0192] Tal como aqui utilizado, "interleucina (IL) -2," refere-se a uma citocina pleiotrópica que ativa e induz a proliferação de células T e células assassinas naturais (NK). A IL-2 sinaliza ligando-se ao seu receptor, IL-2R, que é composto pelas subunidades alfa, beta e gama. A sinalização de IL-2 estimula a proliferação de células T ativadas por antígeno.

[0193] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo isolado" destina-se a referir-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos com diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga a bloqueadores de ponto de controle imunológico ou moléculas coestimulatórias) é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antígenos diferentes do alvo de interesse. Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítipo pode, no entanto, ter reatividade cruzada com outros alvos de diferentes espécies. Além disso, um anticorpo

isolado é tipicamente substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos.

[0194] Tal como aqui utilizado, o termo "molécula de ácido nucleico isolada" refere-se a ácidos nucleicos que codificam proteínas de fusão, polipeptídeos, anticorpos ou porções de anticorpos aqui divulgados, destina-se a se referir a uma molécula de ácido nucleico na qual as sequências de nucleotídeos que codificam a proteína de fusão, polipeptídeo, o anticorpo ou a porção do anticorpo estão livres de outras sequências de nucleotídeos, cujas outras sequências podem flanquear naturalmente o ácido nucleico no DNA genômico humano.

[0195] Tal como aqui utilizado, "isotipo" refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificada por genes da região constante da cadeia pesada. Em algumas concretizações, um anticorpo da divulgação é do isotipo IgG1. Em algumas concretizações, um anticorpo da divulgação é do isotipo IgG2. Em algumas concretizações, um anticorpo da divulgação é do isotipo IgG3. Em algumas concretizações, um anticorpo da divulgação é do isotipo IgG4.

[0196] Tal como aqui utilizado, o termo "KD" ou "KD" refere-se à constante de dissociação de equilíbrio de uma reação de ligação entre, por exemplo, um ligante e um receptor, um antígeno e um anticorpo ou uma proteína de ligação ao colágeno e colágeno. O valor de KD é uma representação numérica da razão entre a constante de taxa de saída da proteína de ligação (kd) e a constante de taxa de saída da proteína de ligação (ka). O valor de KD está inversamente relacionado à afinidade de ligação da proteína de ligação ao seu parceiro de ligação. Quanto menor o valor

de KD, maior a afinidade da proteína de ligação para seu parceiro de ligação. Afinidade é a força de ligação de uma única molécula ao seu ligante e é normalmente medida e relatada pela constante de dissociação de equilíbrio (KD), que é usada para avaliar e classificar as forças de ordem das interações bimoleculares.

[0197] Tal como aqui utilizado, o termo "kd" ou " k_d " (alternativamente "koff" ou " k_{off} ") destina-se a referir-se à constante de taxa de dissociação para a dissociação de uma proteína de ligação da proteína de ligação/complexo parceiro. O valor de kd é uma representação numérica da fração de complexos que decaem ou se dissociam por segundo e é expresso em unidades sec^{-1} .

[0198] Tal como aqui utilizado, o termo "ka" ou " k_a " (alternativamente "kon" ou " k_{on} ") destina-se a referir-se à constante de taxa de ligação para a associação de uma proteína de ligação com um parceiro de ligação. O valor de ka é uma representação numérica do número de complexos de anticorpo/antígeno formados por segundo em uma solução 1 molar (1M) de parceiros de ligação e é expresso em unidades $\text{M}^{-1}\text{seg}^{-1}$.

[0199] Conforme usado neste documento, os termos "ligado", "operacionalmente ligado", "fundido" ou "fusão" são usados indistintamente. Estes termos referem-se à união de mais dois elementos ou componentes ou domínios, por qualquer meio, incluindo conjugação química, formação de complexo não covalente ou meios recombinantes. Métodos de conjugação química (por exemplo, usando agentes de reticulação heterobifuncionais) são conhecidos na técnica.

[0200] Tal como aqui utilizado, "administração local" ou

"entrega local" refere-se à entrega que não depende do transporte da composição ou agente para o seu tecido ou local alvo pretendido através do sistema vascular. Por exemplo, a proteína de fusão imunomoduladora ou composição compreendendo a proteína de fusão pode ser entregue por injeção ou implantação da proteína de fusão ou composição, ou por injeção ou implantação de um dispositivo contendo a proteína de fusão ou composição. Após a administração local na vizinhança de um tecido ou local alvo, a composição ou agente, ou um ou mais componentes do mesmo, pode se difundir para o local ou tecido alvo pretendido. Em algumas concretizações, uma proteína de fusão imunomoduladora é administrada localmente por vetores virais, eletroporação, transplante de células que expressam a proteína de fusão imunomoduladora ou replicons.

[0201] "Gene-3 ativação do linfócito (LAG3)" é um receptor inibitório associado à inibição da atividade de linfócitos por ligação a moléculas MHC de classe II. Este receptor aumenta a função das células Treg e inibe a função das células T efectoras CD8+. O termo "LAG3", tal como aqui utilizado, inclui LAG3 humana (hLAG3), variantes, isoformas e espécies homólogas de hLAG3 e análogos com pelo menos um epítipo comum. A sequência hLAG3 completa pode ser encontrada no N° de Acesso do GenBank P18627 (SEQ ID NO:47).

[0202] O termo "mamífero" ou "sujeito" ou "paciente", tal como aqui utilizado, inclui humanos e não humanos e inclui, mas não está limitado a, humanos, primatas não humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos e suínos.

[0203] "Ácido nucleico" refere-se a desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e seus polímeros na forma de fita simples

ou dupla. A menos que especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucleicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que têm propriedades de ligação semelhantes às do ácido nucleico de referência e são metabolizados de uma maneira semelhante aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que indicado de outra forma, uma sequência de ácido nucleico particular também engloba implicitamente as suas variantes modificadas de forma conservativa (por exemplo, substituições de códons degenerados) e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, as substituições degeneradas de códons podem ser alcançadas gerando sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com base mista e/ou resíduos de desoxinossina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081, 1991; Ohtsuka et al., *Biol. Chem.* 260: 2605-2608, 1985; e Cassol et al, 1992; Rossolini et al, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98, 1994). Para arginina e leucina, as modificações na segunda base também podem ser conservadoras. O termo ácido nucleico é usado indistintamente com gene, cDNA e mRNA codificado por um gene.

[0204] Os polinucleotídeos usados aqui podem ser compostos de qualquer polirribonucleotídeo ou polidesoxiribonucleotídeo, que pode ser RNA ou DNA não modificado ou RNA ou DNA modificado. Por exemplo, os polinucleotídeos podem ser compostos de DNA de fita simples e dupla, DNA que é uma mistura de regiões de fita simples e dupla, RNA de fita simples e dupla e RNA que é uma mistura de fita simples e dupla regiões, moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que podem ser de fita simples ou, mais tipicamente, fita dupla ou

uma mistura de regiões de fita simples e dupla. Além disso, o polinucleotídeo pode ser composto por regiões de fita tripla compreendendo RNA ou DNA ou RNA e DNA. Um polinucleotídeo também pode conter uma ou mais bases modificadas ou esqueletos de DNA ou RNA modificados para estabilidade ou por outras razões. Bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases incomuns, como inosina. Uma variedade de modificações podem ser feitas no DNA e no RNA; assim, "polinucleotídeo" abrange formas modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente.

[0205] Tal como aqui utilizado, "administração parenteral", "administrado parenteralmente" e outras frases gramaticalmente equivalentes, referem-se a modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e incluem, sem limitação, intravenosa, intranasal, intraocular, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaco, intradérmico, intraperitoneal, transtraqueal, subcutâneo, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide, intraespinal, epidural, intracerebral, intracraniana, intracarotídeo, intracolônico/intraintestinal e injeção intravaginal e intravaginal, intracolônico/intraintestinal e intravaginal e intravaginal.

[0206] O termo "porcentagem de identidade", no contexto de duas ou mais sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo, refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que têm uma porcentagem especificada de nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos que são iguais, quando comparados e alinhados no máximo correspondência, medida usando um dos algoritmos de comparação de sequência descritos abaixo (por exemplo, BLASTP

e BLASTN ou outros algoritmos disponíveis para pessoas com habilidade) ou por inspeção visual. Dependendo da aplicação, a "percentagem de identidade" pode existir sobre uma região da sequência a ser comparada, por exemplo, sobre um domínio funcional ou, alternativamente, sobre o comprimento total das duas sequências a serem comparadas. Para comparação de sequência, normalmente uma sequência atua como uma sequência de referência à qual as sequências de teste são comparadas. Ao usar um algoritmo de comparação de sequência, as sequências de teste e referência são inseridas em um computador, as coordenadas da subsequência são designadas, se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo da sequência são designados. O algoritmo de comparação de sequência calcula então a identidade de sequência percentual para a (s) sequência (s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

[0207] O alinhamento ideal de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Matemática. 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), pelo método de pesquisa de similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Ou por inspeção visual (ver geralmente Ausubel et al., infra).

[0208] Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a percentagem de identidade de sequência e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, que é descrito

em Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). O software para realizar análises BLAST está publicamente disponível através do website do National Center for Biotechnology Information.

[0209] Como geralmente usado neste documento, "farmaceuticamente aceitável" refere-se aos compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo do bom julgamento médico, adequados para uso em contato com os tecidos, órgãos e/ou fluidos corporais de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outros problemas ou complicações proporcionais a uma relação risco/benefício razoável.

[0210] "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados aqui indistintamente para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um mimético químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como a polímeros de aminoácidos de ocorrência natural e polímeros de aminoácidos de ocorrência não natural.

[0211] O receptor de "Morte Programada-1 (PD-1)" refere-se a um receptor imuno-inibitório pertencente à família CD28. PD-1 é expresso predominantemente em células T previamente ativadas in vivo e se liga a dois ligantes, PD-L1 e PD-L2. O termo "PD-1", tal como aqui utilizado, inclui PD-1 humano (hPD-1), variantes, isoformas e homólogos de espécies de hPD-1 e análogos com pelo menos um epítipo comum com hPD-1. A sequência hPD-1 completa pode ser encontrada no N° de Acesso do GenBank AAC51773 (SEQ ID NO: 44).

[0212] "Programmed Death Ligand-1 (PD-L1)" é um dos dois

ligantes de glicoproteína de superfície celular para PD-1 (sendo o outro PD-L2) que regula negativamente a ativação de células T e a secreção de citocinas após a ligação a PD-1. O termo "PD-L1", tal como aqui utilizado, inclui PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas e espécies homólogas de hPD-L1 e análogos com pelo menos um epítipo comum com hPD-L1. A sequência hPD-L1 completa pode ser encontrada no N° de Acesso do GenBank Q9NZQ7 (SEQ ID NO: 45).

[0213] Tal como aqui utilizado, o termo "purificado" ou "isolado" aplicado a qualquer uma das proteínas (proteínas de fusão, anticorpos ou fragmentos) aqui descritos refere-se a um polipeptídeo que foi separado ou purificado de componentes (por exemplo, proteínas ou outras naturalmente ocorrendo moléculas biológicas ou orgânicas) que o acompanham naturalmente, por exemplo, outras proteínas, lipídios e ácido nucléico em um procarioto que expressa as proteínas. Normalmente, um polipeptídeo é purificado quando constitui pelo menos 60 (por exemplo, pelo menos 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 97 ou 99)%, em peso, da proteína total em uma amostra .

[0214] Conforme usado neste documento, os termos "se liga especificamente" e "se liga seletivamente" referem-se à ligação por um domínio de ligação ao colágeno ao colágeno ou à ligação por um anticorpo a um epítipo em um antígeno predeterminado. Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ou se liga seletivamente ao colágeno com base no KD para o colágeno (ou seja, o KD para a ligação ao colágeno é menor do que o KD para pelo menos fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio).

[0215] O termo "quantidade suficiente" ou "quantidade suficiente para" significa uma quantidade suficiente para produzir um efeito desejado, por exemplo, uma quantidade suficiente para reduzir o tamanho de um tumor.

[0216] O termo "célula T" refere-se a um tipo de glóbulo branco que pode ser distinguido de outros glóbulos brancos pela presença de um receptor de célula T na superfície da célula. Existem vários subconjuntos de células T, incluindo, mas não se limitando a, células T auxiliares (também conhecidas como células TH ou células T CD4 +) e subtipos, incluindo TH1, TH2, TH3, TH17, TH9 e células TFH, células T citotóxicas (também conhecido como Células TC, células T CD8+, linfócitos T citotóxicos, células T killer, células T killer), células T de memória e subtipos, incluindo células T de memória central (células TCM), células T efetoras de memória (células TEM e TEMRA) e residentes células T de memória (células TRM), células T reguladoras (também conhecidas como células Treg ou células T supressoras) e subtipos, incluindo células Treg CD4+ FOXP3+, células Treg CD4+ FOXP3-, células Tr1, células Th3 e células Treg17, células T natural killer (também conhecidas como células NKT), células T invariantes associadas à mucosa (MAITs) e células T gama delta (células T $\gamma\delta$), incluindo células T V γ 9/V δ 2. Qualquer uma ou mais das células T mencionadas ou não mencionadas podem ser o tipo de célula alvo para um método como aqui divulgado.

[0217] O termo "citotoxicidade de células T" inclui qualquer resposta imune que é mediada pela ativação de células T CD8 +. Respostas imunes exemplares incluem produção de citocinas, proliferação de células T CD8+, produção de

granzima ou perforina e eliminação de um agente infeccioso.

[0218] "T Cell Membrane Protein-3 (TIM3)" é um receptor inibidor envolvido na inibição da atividade dos linfócitos pela inibição das respostas das células TH1. Seu ligante é a galectina 9, que é regulada positivamente em vários tipos de câncer. O termo "TIM3", tal como aqui utilizado, inclui TIM3 humano (hTIM3), variantes, isoformas e homólogos de espécies de hTIM3 e análogos com pelo menos um epítipo comum. A sequência hTIM3 completa pode ser encontrada no N° de Acesso do GenBank Q8TDQo (SEQ ID NO: 48).

[0219] Um "anticorpo terapêutico" é um anticorpo, fragmento de um anticorpo ou construto que é derivado de um anticorpo e pode se ligar a um antígeno de superfície celular em uma célula alvo para causar um efeito terapêutico. Esses anticorpos podem ser quiméricos, humanizados ou anticorpos totalmente humanos. Os métodos são conhecidos na técnica para a produção de tais anticorpos. Tais anticorpos incluem fragmentos Fc de cadeia simples de anticorpos, minicorpos e diacorpos. Qualquer um dos anticorpos terapêuticos conhecidos na técnica como sendo úteis para a terapia do câncer pode ser usado na terapia de combinação adequada para uso nos métodos aqui divulgados. Os anticorpos terapêuticos podem ser anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais. Em concretizações preferidas, os anticorpos terapêuticos têm como alvo antígenos de câncer.

[0220] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" é uma quantidade que é eficaz para melhorar um sintoma de uma doença. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser uma "quantidade profilaticamente eficaz", visto que a profilaxia pode ser considerada terapia.

[0221] Conforme usado neste documento, o termo "vetor" se destina a referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma alça de DNA de fita dupla circular na qual os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos com uma origem de replicação bacteriana e vetores episomais de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não episomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e, assim, são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Esses vetores são aqui referidos como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vetores de expressão"). Em geral, os vetores de expressão úteis em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados indistintamente, pois o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. No entanto, a divulgação se destina a incluir outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, retrovírus defeituosos de replicação, adenovírus e vírus adeno-associados), que servem funções equivalentes.

Proteína de fusão imunomoduladora

[0222] Em alguns aspectos, a divulgação fornece uma

proteína de fusão imunomoduladora compreendendo um domínio de ligação ao colágeno operacionalmente ligado a um domínio imunomodulador. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende ainda um ligante, de modo que o domínio de ligação ao colágeno esteja operacionalmente ligado a um ligante e o ligante esteja operacionalmente ligado ao domínio imunomodulador.

I. Domínios de ligação ao colágeno

[0223] Em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem um MW de cerca de 5-100 kDa, cerca de 10-80 kDa, cerca de 20-60 kDa, cerca de 30-50 kDa, ou cerca de 10 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 30 kDa, cerca de 40 kDa, cerca de 50 kDa, cerca de 60 kDa, cerca de 70 kDa, cerca de 80 kDa, cerca de 90 kDa ou cerca de 100 kDa. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 5 kDa, cerca de 10 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 30 kDa, cerca de 40 kDa, cerca de 50 kDa, cerca de 60 kDa, cerca de 70 kDa, cerca de 80 kDa, cerca de 90 kDa, ou cerca de 100 kDa. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é de cerca de 30 kDa. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é de cerca de 40 kDa.

[0224] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é de cerca de 10-350, cerca de 10-300, cerca de 10-250, cerca de 10-200, cerca de 10-150, cerca de 10-100, cerca de 10-50 ou cerca de 10-20 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 10 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de

15 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 20 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 30 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 40 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 50 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 60 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 70 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 80 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 90 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 100 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 120 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 150 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 200 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 250 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 300 aminoácidos de comprimento. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem cerca de 350 aminoácidos de comprimento.

A. Ponto Isoelétrico

[0225] O ponto isoelétrico (pI, pH (I), IEP), é o pH no

qual uma molécula particular (por exemplo, um domínio de ligação ao colágeno) não carrega nenhuma carga elétrica líquida ou é eletricamente neutra. A Tabela 1 fornece o pI calculado para domínios de ligação de colágeno exemplares, aqui descritos. A ferramenta ExPASy do Swiss Institute of Bioinformatics (https://web.expasy.org/compute_pi/) foi usada para calcular os pontos isoelétricos (pI) dos domínios de ligação ao colágeno mostrados na Tabela 1.

[0226] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico pI menor que (<) cerca de 10, cerca de 8, cerca de 6, cerca de 4, cerca de 2 ou cerca de 1. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico ponto pI menor que (<) 10. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico pI menor que (<) 10 e um peso molecular (MW) maior que (>) 5 kDa.

Tabela 1: pI calculado para domínios de ligação de colágeno exemplares

Domínio de ligação ao colágeno	PI calculado	SEQ ID NO
LAIR1	5,23	98
LAIR2	4,88	99
Glicoproteína IV	7,68	100
Nidogen	5,05	101
Perlecan	6,03	102
Biglican	8,13	103
Decorin	8,76	104
Asporin	6,1	105
Fibromodulina	5,66	106
Lumican	6,17	107
PRELP	9,45	108
Osteoadherina/Osteomodulina	5,22	109
Opticin	5,38	110
Osteoglicina/Mimecan	5,22	111
Chondroadherin	9,14	112
Podcan	6,41	113
Lumican (murino)	6,01	195

B. Colágeno Tipo I

[0227] O colágeno é a proteína estrutural predominante localizada dentro do espaço extracelular e o colágeno tipo I é a proteína mais abundante em mamíferos (Di Lullo et al., (2002) J Biol Chem 277 (6): 4223-4231). A unidade estrutural fundamental do colágeno tipo I é uma proteína longa (300 nm) e fina (1,5 nm de diâmetro) que consiste em três subunidades enroladas: duas cadeias $\alpha 1$ (I) e uma $\alpha 2$ (I). Cada cadeia contém 1050 aminoácidos enrolados em uma hélice tripla característica para a direita. Em humanos, o colágeno tipo I é codificado pelos genes COL1A1 e COL1A2. O gene COL1A1 codifica a cadeia pró- $\alpha 1$ do colágeno tipo I. O gene COL1A2 codifica a cadeia pró- $\alpha 2$ do colágeno tipo I, cuja tripla hélice compreende duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$. O tipo I é um colágeno formador de fibrilas encontrado na maioria dos tecidos conjuntivos e é abundante nos ossos, córnea, derme e tendão.

[0228] Uma sequência de aminoácidos exemplar para o precursor da cadeia $\alpha 1$ humana de colágeno tipo I é apresentada na SEQ ID NO: 90 (Sequência de Referência NCBI: NP_000079.2).

[0229] Uma sequência de aminoácidos exemplar para o precursor da cadeia $\alpha 2$ humana de colágeno tipo I é apresentada na SEQ ID NO: 91 (Sequência de Referência NCBI: NP_000080.2).

C. Colágeno Tipo IV

[0230] O colágeno tipo IV é composto por uma família de polipeptídeos e é um dos principais constituintes das membranas basais de mamíferos (Timpl (1989) Eur J Biochem 180: 487-502; Paulsson (1992) Crit Rev Biochem Mol Biol 27: 93-127). As cadeias $\alpha 1$ (IV) e $\alpha 2$ (IV) são produtos de genes

distintos (COL4A1 e COL4A2, respectivamente) localizados em pares de uma forma cabeça a cabeça no cromossomo 13 em humanos (Hudson et al., (1993) J Biol Chem 268: 26033-26036). As cadeias $\alpha 3$ (IV) e $\alpha 4$ (IV) (codificadas pelos genes COL4A3 e COL4A4, respectivamente) estão presentes na mesma orientação no cromossomo 2 em humanos, e as cadeias $\alpha 5$ (IV) e $\alpha 6$ (IV) (codificadas pelos Os genes COL4A5 e COL4A6, respectivamente) estão localizados no cromossomo X em humanos (Hudson et al., (1991) em Pathobiochemistry, ed Kang A. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp 17-30).

[0231] Uma sequência de aminoácidos exemplificativa para a cadeia alfa1 humana do colágeno tipo IV é apresentada na SEQ ID NO: 92 (Sequência de Referência NCBI: XP_011519350.1).

[0232] Uma sequência de aminoácidos exemplar para a cadeia alfa2 humana do colágeno tipo IV é apresentada em SEQ ID NO: 93 (Sequência de Referência NCBI: NP_001837.2).

[0233] Uma sequência de aminoácidos exemplar para a cadeia alfa3 humana do colágeno tipo IV é apresentada na SEQ ID NO: 94 (Sequência de Referência NCBI: NP_000082.2).

[0234] Uma sequência de aminoácidos exemplificativa para a cadeia alfa4 humana do colágeno tipo IV é apresentada na SEQ ID NO: 95 (Sequência de Referência NCBI: NP_000083.3).

[0235] Uma sequência de aminoácidos exemplar para a cadeia alfa5 humana do colágeno tipo IV é apresentada na SEQ ID NO: 96 (Sequência de Referência NCBI: XP_011529151.2).

[0236] Uma sequência de aminoácidos exemplificativa para a cadeia alfa6 humana do colágeno tipo IV é apresentada na SEQ ID NO: 97 (Sequência de Referência NCBI: XP_006724680.1).

[0237] Por conseguinte, em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras

compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I humano e/ou colágeno tipo IV humano. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno tipo I humano. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno tipo IV humano. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I humano e ao colágeno tipo IV humano. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I humano ou colágeno tipo IV humano.

D. Afinidade de ligação ao colágeno

[0238] Em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 0,5 nM, conforme determinado por um ensaio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 5 nM, conforme determinado por um ensaio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 50 nM, conforme determinado por um ensaio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao

colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 500 nM, conforme determinado por um ensaio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) de cerca de 0,5-5 nM, 5-50 nM ou 50-500 nM conforme determinado por um ensaio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) de cerca de 50-100 nM, 100-200 nM, 200-300 nM, 300-400 nM ou 400-500 nM conforme determinado por um colágeno - ensaio de ligação.

[0239] Em algumas concretizações, o ensaio de ligação ao colágeno determina uma afinidade de ligação do domínio de ligação ao colágeno para o colágeno. Em algumas concretizações, o ensaio de ligação ao colágeno determina uma afinidade de ligação do domínio de ligação ao colágeno para o colágeno tipo I. Em algumas concretizações, o ensaio de ligação ao colágeno determina uma afinidade de ligação para o colágeno tipo IV.

[0240] Em algumas concretizações, o ensaio de ligação ao colágeno é um ELISA. Métodos e técnicas para realizar um ELISA de ligação ao colágeno são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Smith et al., (2000) J Biol Chem 275: 4205-4209). Por conseguinte, em algumas concretizações, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 0,5 nM, conforme determinado por um ELISA. Por conseguinte, em algumas concretizações, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo um

domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 5 nM, conforme determinado por um ELISA. Por conseguinte, em algumas concretizações, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 50 nM, conforme determinado por um ELISA. Por conseguinte, em algumas concretizações, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 500 nM, conforme determinado por um ELISA. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) de cerca de 0,5-5 nM, 4-40 nM, 50-500 nM conforme determinado por um ELISA. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) de cerca de 50-100 nM, 100-200 nM, 200-300 nM, 300-400 nM ou 400-500 nM conforme determinado por um ELISA .

[0241] Em algumas concretizações, o ensaio de ligação ao colágeno é um ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Métodos e técnicas para realizar um ensaio de SPR de ligação ao colágeno são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Saenko et al., (2002) Anal Biochem 302 (2): 252-262). Por conseguinte, em algumas concretizações, a divulgação fornece uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) inferior a cerca de 500 nM, conforme determinado por um ensaio SPR. Em

algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) de cerca de 50-500 nM, conforme determinado por um ensaio SPR. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno com uma afinidade (KD) de cerca de 50-100 nM, 100-200 nM, 200-300 nM, 300-400 nM ou 400-500 nM conforme determinado por um SPR ensaio.

[0242] A frase "ressonância plasmônica de superfície" inclui um fenômeno óptico que permite a análise de interações bioespecíficas em tempo real pela detecção de alterações nas concentrações de proteínas dentro de uma matriz de biossensor, por exemplo, usando o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway , NJ). Para obter descrições adicionais, consulte Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Reconhecer. 8: 125-131; e Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

E. Especificidade de ligação ao colágeno

[0243] Em algumas concretizações, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno que se liga especificamente ao colágeno e não se liga especificamente a um ou mais componentes da matriz extracelular de não colágeno (ECM), incluindo, mas não se limitando a, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina e fibrinogênio. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno com um KD inferior do que a um ou mais componentes de ECM sem colágeno. Em algumas concretizações, o KD do domínio de ligação ao colágeno para o colágeno tipo I é

menor do que o KD do domínio de ligação ao colágeno para um componente da matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno com cerca de 10%, cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de KD 99% menor do que para um ou mais componentes de ECM sem colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno com cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, KD cerca de 10 vezes menor do que a um ou mais componentes de ECM sem colágeno.

[0244] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno não é um ligante promíscuo de componentes ECM. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno não compreende um domínio de ligação à heparina. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno não é um fator de crescimento ou porção do mesmo que se liga à matriz extracelular.

[0245] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno tipo I com um KD mais baixo do que o colágeno tipo IV. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno se liga ao colágeno tipo IV com um KD mais baixo do que o colágeno tipo I.

[0246] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compete com um domínio de ligação ao colágeno de referência pela ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compete com um domínio de ligação ao colágeno de referência pela ligação ao colágeno tipo I. Em algumas concretizações, o domínio de

ligação ao colágeno compete com um domínio de ligação ao colágeno de referência pela ligação ao colágeno tipo IV. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compete com um domínio de ligação ao colágeno de referência pela ligação ao colágeno tipo I e colágeno tipo IV. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compete com um domínio de ligação ao colágeno de referência pela ligação ao colágeno tipo I, mas não ao colágeno tipo IV. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compete com um domínio de ligação ao colágeno de referência pela ligação ao colágeno tipo IV, mas não ao colágeno tipo I.

[0247] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende uma ou mais (por exemplo, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) repetições ricas em leucina que ligam o colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um proteoglicano. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um proteoglicano, em que o proteoglicano é selecionado do grupo que consiste em: decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecan, nidogênio. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência é lumican. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um pequeno proteoglicano rico em leucina de classe I (SLRP). As SLRPs são conhecidas por se ligar ao colágeno (Chen e Birk (2013) FEBS Journal 2120-2137). Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um SLRP de

classe II. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um SLRP de classe III. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um SLRP classe IV. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende um SLRP de classe V. Uma descrição adicional das classes SLRP é divulgada em Schaefer & Iozzo (2008) J Biol Chem 283 (31): 21305-21309, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0248] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende a proteína do receptor 1 do tipo imunoglobulina associada a leucócitos (LAIR-1). Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende a proteína do receptor 2 do tipo imunoglobulina associada a leucócitos (LAIR-2). Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno de referência compreende Glicoproteína IV.

F. Domínios de ligação de colágeno exemplares

[0249] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende uma ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) repetições ricas em leucina que ligam o colágeno. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um proteoglicano. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um proteoglicano, em que o proteoglicano é selecionado do grupo que consiste em: decorina, biglicano, testicano, bicunina, fibromodulina, lumicano, condroaderina, queratina, ECM2, epifíciano, asporina, PRELP, queratocano, osteoadherin, opticin, osteoglican, nictalopin, Tsukushi, podocan, proteína

semelhante a podocan 1 versican, perlecan, nidogen, neurocan, agrecan e brevican.

[0250] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um pequeno proteoglicano rico em leucina de classe I (SLRP). Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP de classe II. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP de classe III. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP classe IV. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende um SLRP de classe V. Uma descrição adicional das classes SLRP é divulgada em Schaefer & Iozzo (2008) J Biol Chem 283 (31): 21305-21309, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0251] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende uma ou mais repetições ricas em leucina de um membro de classe II de proteoglicanos humanos da família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP). Em algumas concretizações, o SLRP é selecionado de lumican, decorin, biglican, fibromodulina, queratina, epifican, asporina e osteoglicina. Em algumas concretizações, o SLRP é lumican. Em algumas concretizações, lumican compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 107.

Lumican

[0252] Lumican, também conhecido como LUM, é uma proteína da matriz extracelular que, em humanos, é codificada pelo gene LUM no cromossomo 12 (Chakravarti et al., (1995) Genomics 27 (3): 481-488). Lumican é um proteoglicano de Classe II da família de pequenos proteoglicanos ricos em

leucina (SLRP) que inclui decorina, biglicano, fibromodulina, queratocano, epifiano e osteoglicina (Iozzo & Schaefer (2015) Matrix Biology 42: 11-55).

[0253] Como as outras SLRPs, lumican tem um peso molecular de cerca de 40 kDa e quatro domínios intramoleculares principais: 1) um peptídeo sinal de 16 resíduos de aminoácidos, 2) um domínio N-terminal com carga negativa contendo tirosina sulfatada e ligação dissulfeto (s), 3) dez repetições tandem ricas em leucina permitindo que lumican se ligue ao colágeno, e 4) um domínio carboxil terminal de 50 resíduos de aminoácidos contendo duas cisteínas conservadas com 32 resíduos separados. Kao et al., (2006) Experimental Eye Research 82 (1): 3-4). Existem quatro sítios N-ligados dentro do domínio de repetição rico em leucina do núcleo da proteína que podem ser substituídos por sulfato de queratana. A proteína central do lumican (como decorina e fibromodulina) tem a forma de ferradura. Isso permite que ele se ligue a moléculas de colágeno dentro de uma fibrila de colágeno, ajudando assim a manter as fibrilas adjacentes separadas. Scott (1996) Biochemistry 35 (27): 8795-8799.

Receptores semelhantes a imunoglobulina associados a leucócitos (LAIR-1 e LAIR-2)

[0254] O receptor do tipo Ig associado a leucócitos (LAIR)-1 é um receptor de colágeno que inibe a função das células imunes após a ligação do colágeno. Ao lado de LAIR-1, o genoma humano codifica LAIR-2, um homólogo solúvel. O (h) LAIR-1 humano é expresso na maioria dos PBMC e timócitos (Maasho et al., (2005) Mol Immunol 42: 1521-1530). A reticulação de hLAIR-1 por mAbs in vitro fornece um sinal inibitório potente que é capaz de inibir a função das células

imunológicas (4, 10-15). Os colágenos são conhecidos por serem ligantes naturais de alta afinidade para as moléculas LAIR. A interação de hLAIR-1 com colágenos inibe diretamente a ativação de células imunes in vitro (Meyaard et al., (1997) Immunity 7: 283-290; Poggi (1998) Eur J Immunol 28: 2086-2091; Van der Vuurst de Vries et al ., (1999) Eur J Immunol 29: 3160-3167; Lebbink et al., (2006) J Exp Med 203: 1419-1425).

[0255] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende uma glicoproteína humana tipo I com um domínio semelhante a Ig ou uma porção extracelular da mesma que se liga ao colágeno. Em algumas concretizações, a glicoproteína tipo I compete com lumican pela ligação para a ligação ao colágeno tipo I. Em algumas concretizações, a glicoproteína humana tipo I é selecionada de LAIR1, LAIR2 e glicoproteína IV. Em algumas concretizações, a glicoproteína humana tipo I é LAIR1. Em algumas concretizações, a glicoproteína humana tipo I é LAIR1 e o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos conforme estabelecido na SEQ ID NO: 98.

[0256] Em algumas concretizações, o doman de ligação ao colágeno é uma variante de LAIR1, LAIR2 ou Glicoproteína IV. Em algumas concretizações, a variante LAIR1, variante LAIR2 ou variante da glicoproteína IV compreende uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) relativas à sequência de proteína LAIR1, LAIR 2 ou glicoproteína IV de tipo selvagem. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é uma

variante LAIR1 que compreende uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) em relação a uma Proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é uma variante LAIR1 compreendendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) no bolso de ligação LAIR1 (por exemplo, um sítio de ligação LAIR1 compreendendo um ou mais resíduos E61, S66, Y68, I102, W109, Y115, R59, E63, R100, E111 e Q112, e suas combinações) (Brondijk et. al., (2010) Blood 115: 1364-1373). Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é uma variante LAIR1 que compreende uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais) fora do LAIR1 bolso de encadernação.

[0257] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é uma variante LAIR1 com afinidade de ligação aumentada ao colágeno em relação à afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 de tipo selvagem. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 demonstra um aumento na afinidade de ligação ao colágeno em relação à afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 tendo afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação à afinidade de ligação ao colágeno da proteína LAIR1 de tipo selvagem. Em algumas concretizações, a variante LAIR1 demonstra uma diminuição na afinidade de ligação ao colágeno em relação à afinidade de

ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:98.

Glicoproteína IV (CD36)

[0258] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno compreende Glicoproteína IV (GPIV). A glicoproteína IV se liga a muitos ligantes, incluindo o colágeno (Tandon (1989) J Biol Chem 264 (13): 7576-7583). Uma glicoproteína multifuncional, GPIV atua como receptor para uma ampla gama de ligantes, incluindo trombospondina, fibronectina, colágeno ou beta-amilóide, bem como de natureza lipídica, como lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), fosfolipídeos aniônicos, ácidos graxos de cadeia longa e lipopeptídeos diacilados bacterianos. GPIV é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene CD36. O antígeno CD36 é uma proteína de membrana integral encontrada na superfície de muitos tipos de células em animais vertebrados. Importa ácidos graxos para o interior das células e é membro da família de receptores necrófagos classe B de proteínas de superfície celular. Em algumas concretizações, o CD36 compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 100.

II. Domínio Imunomodulador

[0259] As proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas compreendem pelo menos um domínio imunomodulador operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um, dois, três, quatro ou cinco domínios imunomoduladores. Em algumas concretizações, quando mais de um domínio imunomodulador está presente na proteína de fusão, os domínios imunomoduladores são os mesmos. Em

algumas concretizações, quando mais de um domínio imunomodulador está presente na proteína de fusão, os domínios imunomoduladores são diferentes. Em algumas concretizações, quando mais de um domínio imunomodulador está presente na proteína de fusão, cada domínio está localizado no terminal N de um domínio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, quando mais de um domínio imunomodulador está presente na proteína de fusão, cada domínio está localizado no terminal C de um domínio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, quando mais de um domínio imunomodulador está presente na proteína de fusão, pelo menos um domínio está localizado no terminal N de um domínio de ligação ao colágeno e pelo menos um domínio está localizado no terminal C do domínio de ligação ao colágeno.

[0260] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador ativa a atividade de uma célula do sistema imunológico. Por exemplo, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um estimulador da resposta imune, tal como, mas não limitado a, uma citocina, tal como uma interleucina, uma quimiocina, um membro da família TNF, um anticorpo agonístico, um bloqueador de ponto de controle imunológico, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador aumenta uma resposta imune. Em algumas concretizações, o aumento de uma resposta imune inclui estimulação de células T, estimulação de células B, estimulação de respostas de células dendríticas ou uma combinação das mesmas. Em algumas concretizações, o aumento de uma resposta imune resulta na produção de citocinas, produção de anticorpos, produção de células imunes

específicas de antígeno (por exemplo, células T CD8+ ou células T CD4+), estimulação de respostas de interferon Tipo I ou suas combinações.

[0261] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador compreende um polipeptídeo que ativa, aumenta ou promove uma resposta de uma célula imune. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador compreende um polipeptídeo que inibe, reduz ou suprime uma resposta de uma célula imune. Em algumas concretizações, a célula imune é uma célula linfóide, incluindo, mas não se limitando a células T, células B, células NK e células linfóides inatas. Em algumas concretizações, a célula imune é uma célula mieloide, incluindo, mas não se limitando a monócitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos e granulócitos.

[0262] Em algumas concretizações, a resposta da célula imune é a produção de citocinas, produção de anticorpos, produção de células imunes específicas do antígeno ou uma combinação das mesmas.

A. Interleucinas

[0263] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é uma interleucina (IL). As interleucinas são proteínas secretadas que se ligam a seus receptores específicos e desempenham um papel na comunicação entre os leucócitos. As interleucinas adequadas para uso como um domínio imunomodulador das proteínas de fusão imunomoduladoras incluem, mas não estão limitadas a: IL-2, IL-12, IL-15, superagonista IL-15 (IL-15SA), IL-21, IL-6, IL-5, IL-8, IL-7, IL-17, IL-23, IL-18, IL-1, IL-4, IL-3, IL-10, IL-13 e IL-9. Em algumas concretizações, a interleucina

adequada para uso como um domínio imunomodulador compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs:1-5 e 9-24. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IL-2. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IL-12. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IL-15. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IL-15SA.

[0264] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo de interleucina que se liga a um receptor de cadeia gama comum. As interleucinas que se ligam ao receptor de cadeia gama comum incluem, mas não estão limitadas a, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-15/IL-15R α e IL-21.

[0265] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo pertencente à família IL-12. A família IL-12 compreende ligantes heterodiméricos constituídos por uma subunidade α com estrutura helicoidal (por exemplo, IL-12p35, IL-23p19, IL-27p28) e uma subunidade β (por exemplo, IL-12p40, IL-23p40 (que é idêntica a IL-12p40), EBI3). Membros exemplares incluem IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35.

[0266] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo pertencente à superfamília IL-1. A família Interleucina-1 (IL-1) consiste em 11 membros da família estruturalmente relacionados (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 e IL-1F5 a IL-1 F10), que estão entre as moléculas de sinalização do sistema imunológico mais potente, agindo por meio de um grupo de receptores intimamente relacionados. Todos os receptores de IL-1 têm um modo de ativação semelhante: após a ligação do ligante à subunidade do

receptor primário (ou seja, IL-1R1 para IL-1 α e β , IL-18R para IL-18 e ST2 para IL-33), um segundo a subunidade do receptor é recrutada (ou seja, IL-1RAP para IL-1 α e β , IL-18RAP para IL-18 e IL-1RAP para IL-33) e a sinalização é iniciada por justaposição das subunidades do receptor citoplasmático Toll/receptor de IL-1 (TIR) domínios. Os domínios TIR dimerizados fornecem uma plataforma de acoplamento para a proteína adaptadora MYD88, que por meio do recrutamento de outros intermediários leva à ativação das vias do fator nuclear pró-inflamatório κ B (NF- κ B) e da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Os membros da família IL-1 são produzidos principalmente por células imunes inatas e atuam em uma variedade de tipos de células durante a resposta imune. Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IL-18.

Interleukin-2 (IL-2)

[0267] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um membro da família IL-2 operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno, opcionalmente por meio de um ligante. Em algumas concretizações, o membro da família IL-2 é IL-2. A interleucina-2 (IL-2) é uma citocina que induz a proliferação de células T ativadas por antígeno e estimula as células natural killer (NK). A atividade biológica da IL-2 é mediada por um complexo de receptor de IL-2 com várias subunidades (IL-2R) de três subunidades polipeptídicas que se estendem pela membrana celular: p55 (IL-2R α , a subunidade alfa, também conhecida como CD25 em humanos), p75 (IL-2R β , a subunidade beta, também conhecida como CD 122 em humanos) e p64 (IL-2R γ , a subunidade gama, também conhecida como CD 132

em humanos). A resposta das células T à IL-2 depende de uma variedade de fatores, incluindo: (1) a concentração de IL-2; (2) o número de moléculas de IL-2R na superfície celular; e (3) o número de IL-2R ocupado por IL-2 (ou seja, a afinidade da interação de ligação entre IL-2 e IL-2R (Smith, "Cell Growth Signal Transduction is Quantal" In Receptor Activation by Antigens, Cytokines, Hormones, and Growth Factors 766: 263-271, 1995)). O complexo IL-2: IL-2R é internalizado após a ligação do ligante e os diferentes componentes sofrem classificação diferencial. IL-2R α é reciclado para a superfície celular, enquanto IL-2 associado ao complexo IL-2: IL-2R β é encaminhado para o lisossoma e degradado. Quando administrada como um bolus intravenoso (iv), IL-2 tem uma depuração sistêmica rápida (uma fase de depuração inicial com meia-vida de 12,9 minutos seguida por uma fase de depuração mais lenta com meia-vida de 85 minutos) (Konrad et al., Cancer Res. 50: 2009-2017, 1990).

[0268] Os resultados da administração sistêmica de IL-2 em pacientes com câncer estão longe dos ideais. Enquanto 15 a 20 por cento dos pacientes respondem objetivamente a altas doses de IL-2, a grande maioria não o faz, e muitos sofrem graves efeitos colaterais com risco de vida, incluindo náusea, confusão, hipotensão e choque séptico. A grave toxicidade associada ao tratamento com altas doses de IL-2 é amplamente atribuída à atividade das células natural killer (NK). As células NK expressam o receptor de afinidade intermediária, IL-2R β , e, portanto, são estimuladas em concentrações nanomolares de IL-2, que de fato resultam em soros de pacientes durante a terapia com IL-2 em altas doses. Tentativas de reduzir a concentração sérica e, portanto,

estimular seletivamente as células portadoras de IL-2RaP α c, reduzindo a dose e ajustando o regime de dosagem, foram tentadas e, embora menos tóxicos, tais tratamentos também foram menos eficazes. Dadas as questões de toxicidade associadas à terapia do câncer de IL-2 em altas doses, vários grupos tentaram melhorar a eficácia anticâncer da IL-2 administrando simultaneamente anticorpos terapêuticos. No entanto, tais esforços foram amplamente malsucedidos, não produzindo nenhum benefício clínico adicional ou limitado em comparação com a terapia com IL-2 sozinha. Consequentemente, novas terapias de IL-2 são necessárias para combater mais eficazmente vários tipos de câncer.

[0269] Em algumas concretizações, a ligação de IL-2 a um domínio de ligação ao colágeno localiza a citocina em uma célula e, portanto, evita a toxicidade sistêmica. Além disso, em algumas concretizações, quando administrado diretamente a um tumor ou lesão, o domínio de ligação ao colágeno localiza a citocina no tumor ou microambiente da lesão, evitando assim a toxicidade sistêmica associada ao tratamento com IL-2.

[0270] Em algumas concretizações, a IL-2 é uma IL-2 recombinante humana, como Proleukin® (aldesleucina). Proleukin® é um produto de interleucina-2 recombinante humana produzido em *E.coli*. Proleukin® difere da interleucina-2 nativa nas seguintes maneiras: a) não é glicosilado; b) não possui alanina N-terminal; ec) tem serina substituída por cisteína nas posições de aminoácido 125. Proleukin® existe como microagregados biologicamente ativos, não covalentemente ligados, com um tamanho médio de 27 moléculas de interleucina-2 recombinantes. Proleukin® (aldesleukin) é administrado por infusão intravenosa. Em algumas

concretizações, IL-2 é IL-2 de tipo selvagem (por exemplo, IL-2 humana em sua forma precursora ou IL-2 madura. Em algumas concretizações, IL-2 compreende a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 1.

[0271] Em certas concretizações, IL-2 é mutado de modo que tenha uma afinidade alterada (por exemplo, uma afinidade mais alta) para o receptor IL-2R alfa em comparação com IL-2 não modificada. A mutagênese dirigida ao local pode ser usada para isolar mutantes de IL-2 que exibem ligação de alta afinidade a CD25, isto é, IL-2R α , em comparação com IL-2 de tipo selvagem. O aumento da afinidade de IL-2 para IL-2R α na superfície celular aumentará a ocupação do receptor dentro de uma faixa limitada de concentração de IL-2, bem como aumentará a concentração local de IL-2 na superfície celular.

[0272] Em algumas concretizações, a divulgação apresenta mutantes de IL-2, que podem ser, mas não necessariamente, substancialmente purificados e que podem funcionar como ligantes de CD25 de alta afinidade. IL-2 é um fator de crescimento de células T que induz a proliferação de células T ativadas por antígeno e estimulação de células NK. Mutantes de IL-2 exemplares que são ligantes de alta afinidade incluem aqueles descritos em WO2013/177187A2 (aqui incorporado por referência na sua totalidade). Outros exemplos de mutantes de IL-2 com afinidade aumentada para CD25 são divulgados em US 7,569,215, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

[0273] Em algumas concretizações, a divulgação apresenta mutantes de IL-2 com afinidade de ligação reduzida para CD25 em relação a IL-2 de tipo selvagem. Em algumas concretizações, o mutante IL-2 não se liga ao CD25.

[0274] Em algumas concretizações, os mutantes de IL-2 compreendem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à SEQ ID NO: 1 que se liga a CD25. Por exemplo, algumas concretizações, um mutante de IL-2 tem pelo menos uma mutação (por exemplo, uma deleção, adição ou substituição de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais resíduos de aminoácidos) que aumenta a afinidade para a subunidade alfa do receptor de IL-2 em relação à IL-2 de tipo selvagem. Deve ser entendido que as mutações identificadas em IL-2 de camundongo podem ser feitas nos resíduos correspondentes em IL-2 humana de comprimento total (sequência de ácido nucleico (acesso: NM000586); sequência de aminoácidos (acesso: P60568)) ou IL-2 humana sem o peptídeo sinal. Por conseguinte, em algumas concretizações, a IL-2 é IL-2 humana. Em outras concretizações, a IL-2 é uma IL-2 humana mutante.

[0275] Em algumas concretizações, os mutantes de IL-2 são pelo menos ou cerca de 50%, pelo menos ou cerca de 65%, pelo menos ou cerca de 70%, pelo menos ou cerca de 80%, pelo menos ou cerca de 85%, pelo menos ou cerca de 87% , pelo menos ou cerca de 90%, pelo menos ou cerca de 95%, pelo menos ou cerca de 97%, pelo menos ou cerca de 98%, ou pelo menos ou cerca de 99% idêntica na sequência de aminoácidos à IL-2 de tipo selvagem (em sua forma precursora ou, de preferência, a forma madura). A mutação pode consistir em uma mudança no número ou conteúdo de resíduos de aminoácidos. Por exemplo, os mutantes de IL-2 podem ter um número maior ou menor de resíduos de aminoácidos do que IL-2 de tipo selvagem. Alternativamente, ou adicionalmente, os mutantes de IL-2 podem conter uma substituição de um ou mais resíduos de aminoácidos que estão

presentes na IL-2 de tipo selvagem.

[0276] A título de ilustração, um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica a uma sequência de aminoácidos de referência de SEQ ID NO: 1 é um polipeptídeo que inclui uma sequência que é idêntica à sequência de referência, exceto para a inclusão de até cinco alterações do aminoácido de referência de SEQ ID NO: 1. Por exemplo, até 5% dos resíduos de aminoácido na sequência de referência podem ser deletados ou substituídos por outro aminoácido, ou um número de aminoácidos acima a 5% dos resíduos de aminoácidos totais na sequência de referência podem ser inseridos na sequência de referência. Estas alterações da sequência de referência podem ocorrer nas posições terminais amino (N-) ou carboxi (C-) da sequência de aminoácidos de referência ou em qualquer lugar entre essas posições terminais, intercaladas individualmente entre os resíduos na sequência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência de referência.

[0277] O(s) resíduo (s) de aminoácido substituído (s) pode (m) ser, mas não necessariamente, substituições conservativas, que tipicamente incluem substituições dentro dos seguintes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutâmico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; e fenilalanina, tirosina. Essas mutações podem ser em resíduos de aminoácidos que contatam IL-2R α .

Interleucina-12 (IL-12)

[0278] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um polipeptídeo IL-12 operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno,

opcionalmente por meio de um ligante. A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante na imunidade inata e adaptativa. Gately, MK et al., Annu Rev Immunol. 16:495-521 (1998). IL-12 funciona principalmente como uma proteína heterodimérica de 70 kDa que consiste em duas subunidades p35 e p40 ligadas por dissulfeto. A forma precursora da subunidade p40 da IL-12 (NM_002187; P29460; também referida como IL-12B, fator estimulador de células natural killer 2, fator de maturação de linfócitos citotóxicos 2) tem 328 aminoácidos de comprimento, enquanto sua forma madura é 306 aminoácidos de comprimento. A forma precursora da subunidade p35 de IL-12 (NM_000882; P29459; também referida como IL-12A, fator estimulador de células assassinas naturais 1, fator de maturação de linfócitos citotóxicos 1) tem 219 aminoácidos de comprimento e a forma madura tem 197 aminoácidos longo. Eu iria. Os genes para as subunidades p35 e p40 de IL-12 residem em cromossomos diferentes e são regulados independentemente um do outro. Gately, MK et al., Annu Rev Immunol. 16: 495-521 (1998). Muitas células imunes diferentes (por exemplo, células dendríticas, macrófagos, monócitos, neutrófilos e células B) produzem IL-12 mediante estímulos antigênicos. O heterodímero de IL-12 ativo é formado após a síntese de proteínas. Id.

[0279] Devido à sua capacidade de ativar células NK e células T citotóxicas, a proteína IL-12 tem sido estudada como um promissor terapêutico anticâncer desde 1994. Ver Nastala, C. L. et al., J Immunol 153: 1697-1706 (1994). Mas, apesar das altas expectativas, os primeiros estudos clínicos não produziram resultados satisfatórios. Lasek W. et al.,

Cancer Immunol Immunother 63: 419-435, 424 (2014). A administração repetida de IL-12, na maioria dos pacientes, levou a uma resposta adaptativa e um declínio progressivo dos níveis de interferon gama (IFN γ) induzido por IL-12 no sangue. Eu iria. Além disso, embora tenha sido reconhecido que a atividade anticâncer induzida por IL-12 é amplamente mediada pela secreção secundária de IFN γ , a indução concomitante de IFN γ junto com outras citocinas (por exemplo, TNF- α) ou quimiocinas (IP-10 ou MIG) por IL-12 causou toxicidade grave. Id.

[0280] Além do feedback negativo e da toxicidade, a eficácia marginal da terapia com IL-12 em ambientes clínicos pode ser causada pelo forte ambiente imunossupressor em humanos. Eu iria. Para minimizar a toxicidade do IFN γ e melhorar a eficácia da IL-12, os cientistas tentaram diferentes abordagens, como diferentes doses e protocolos de tempo para a terapia com IL-12. Ver Sacco, S. et al., Blood 90: 4473-4479 (1997); Leonard, J. P. et al., Blood 90: 2541-2548 (1997); Coughlin, C. M. et al., Cancer Res. 57: 2460-2467 (1997); Asselin-Paturel, C. et al., Cancer 91: 113-122 (2001); e Saudemont, A. et al., Leukemia 16: 1637-1644 (2002). No entanto, essas abordagens não afetaram significativamente a sobrevida do paciente. Kang, W. K., et al., Human Gene Therapy 12: 671-684 (2001).

[0281] Versões de IL-12 ancoradas em membrana foram estudadas como um meio de reduzir a toxicidade associada à administração sistêmica, usando vetores retrovirais e adenovirais para expressão em células tumorais. Veja Pan, W-Y. et al., Mol. Ther. 20 (5): 927-937 (2012). Porém, o uso de vetores virais apresenta um risco potencial à saúde, uma vez

que os vírus subjacentes podem atuar como oncogenes e os vetores virais podem ser imunogênicos.

[0282] Por conseguinte, em algumas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas compreendem um polipeptídeo IL-12 operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno. Em algumas concretizações, a ligação de um polipeptídeo IL-12 a um domínio de ligação ao colágeno localiza a citocina em uma célula e, portanto, evita a toxicidade sistêmica. Além disso, em algumas concretizações, quando administrado diretamente a um tumor ou lesão, o domínio de ligação ao colágeno localiza a citocina no tumor ou microambiente da lesão, evitando assim a toxicidade sistêmica.

[0283] Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-12 compreende IL-12A (por exemplo, SEQ ID NO: 3). Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-12 compreende IL-12B (por exemplo, SEQ ID NO: 2). Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-12 compreende IL-12A e IL-12B.

[0284] Em algumas concretizações, IL-12B está localizado no terminal N de IL-12A no polipeptídeo IL-12. Em algumas concretizações, IL-12A está localizado no terminal N de IL-12B no polipeptídeo IL-12. A frase "localizado no terminal N até" indica a localização em um polipeptídeo em relação a outras sequências no polipeptídeo em relação ao terminal N do polipeptídeo. Por exemplo, IL-12B que é "N-terminal de" IL-12A significa que IL-12B está localizada mais perto do terminal N do polipeptídeo IL-12 do que IL-12A.

[0285] Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-12 compreende uma única cadeia polipeptídica compreendendo IL-12B e IL-12A, que são fundidos diretamente um ao outro ou

estão ligados um ao outro por um ligante (referido aqui como um "ligante de subunidade"). Exemplos não limitativos de ligantes são divulgados em outro lugar neste documento.

[0286] Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-12 da divulgação compreende IL-12A e/ou IL-12B que é uma variante, que é um fragmento funcional ou que contém uma substituição, uma inserção e/ou uma adição, uma deleção, e/ou uma modificação covalente em relação a uma sequência de IL-12A ou IL-12B de tipo selvagem. Em algumas concretizações, os resíduos de aminoácidos localizados nas regiões carboxi, amino-terminal ou internas do polipeptídeo IL-12 são deletados, proporcionando assim fragmentos.

[0287] Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-12 compreende uma variante de substituição de uma sequência de aminoácidos IL-12A e/ou IL-12B, que pode compreender uma, duas, três ou mais de três substituições. Em algumas concretizações, a variante substitucional pode compreender uma ou mais substituições conservadoras de aminoácidos. Em outras concretizações, a variante é uma variante de inserção. Em outras concretizações, a variante é uma variante de deleção.

[0288] Conforme reconhecido pelos versados na técnica, fragmentos de proteína IL-12, domínios de proteína funcionais, variantes e proteínas homólogas (ortólogos) também são considerados como estando dentro do escopo dos polipeptídeos de IL-12 da divulgação. Exemplos não limitativos de polipeptídeos IL-12 adequados para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas são apresentados em SEQ ID NOs:2-3.

[0289] Em algumas concretizações, a proteína de fusão

imunomoduladora compreende um polipeptídeo IL-12 compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 2. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um polipeptídeo IL-12 compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida em SEQ ID NO: 3. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um polipeptídeo IL-12 que compreende as sequências de aminoácidos estabelecidas em SEQ ID NOs: 2 e 3.

Interleucina-15 (IL-15)

[0290] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um polipeptídeo IL-15 operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno, opcionalmente por meio de um ligante. IL-15 é um membro da família de citocinas do feixe de hélice 4 α e desempenha um papel importante no desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. Waldmann, T.A., Cancer Immunol. Res. 3: 219-227 (2015). A IL-15 é essencial para o desenvolvimento adequado das células NK e a manutenção a longo prazo das células T CD8 + de memória. O gene IL-15 codifica uma preproteína de 162 aminoácidos possuindo um peptídeo sinal de 48 aminoácidos, com a proteína madura tendo 114 aminoácidos de comprimento. Bamford, R.N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2897-2902 (1996). Ver também, por exemplo, Números de Acesso do GenBank NM_000585 para a sequência de mRNA da variante 3 do transcrito de IL15 de Homo sapiens e NP_000576 para a préproteína da isoforma 1 de IL15 correspondente.

[0291] A IL-15 compartilha certas semelhanças estruturais com a interleucina-2 (IL-2). Como a IL-2, a IL-15 sinaliza através da cadeia beta do receptor da IL-2 (CD122) e da

cadeia gama comum (CD132). Mas, ao contrário da IL-2, a IL-15 não pode ligar eficazmente CD122 e CD132 por conta própria. A IL-15 deve primeiro ligar-se à subunidade do receptor alfa da IL-15 (IL-15R α). O gene IL-15R α codifica uma pré-proteína de 267 aminoácidos possuindo um peptídeo sinal de 30 aminoácidos, com a proteína madura tendo 237 aminoácidos de comprimento. Ver, por exemplo, Números de Acesso GenBank NM_002189 para o Homo sapiens IL-15R α transcrito variante 1 mRNA e NP_002180 para a sequência de aminoácidos precursora da isoforma 1 de IL-15R α do Homo sapiens IL-15R α .

[0292] O IL-15R α humano é predominantemente uma proteína transmembrana que se liga à IL-15 na superfície das células, como células dendríticas ativadas e monócitos. Waldmann, T.A., Cancer Immunol. Res. 3: 219-227 (2015). O complexo ligado à membrana de IL-15/IL-15R α apresenta então IL-15 em trans para as subunidades CD122 e CD132. Consequentemente, IL-15R α é um componente essencial da atividade de IL-15.

[0293] Para superar a meia-vida curta da IL-15 injetada sistemicamente, a pré-complexação de IL-15 com IL-15Ra recombinante solúvel, resultando no superagonista de IL-15 (IL-15SA), mostrou aumentar a potência sistêmica de IL-15 em ~50 vezes, e também aumenta a meia-vida da citocina no soro após a injeção sistêmica para ~ 20 horas. (Stoklasek et al., J Immunol 177 (9): 6072, 2006; Dubois et al., J Immunol 180 (4): 2099, 2008; Rubinstein et. Al. Proc Natl Acad Sci USA 103 (24): 9166, 2006.)

[0294] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador da proteína de fusão imunomoduladora é um polipeptídeo IL-15. Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-15 compreende a sequência de aminoácidos

estabelecida na SEQ ID NO: 5. Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-15 compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 4. Em algumas concretizações, o polipeptídeo IL-15 é um superagonista IL-15, compreendendo IL-15 e IL-15R α . Em algumas concretizações, o superagonista IL-15 compreende as sequências de aminoácidos estabelecidas em SEQ ID NOs: 4 e 5.

B. Interferons

[0295] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um interferon (IFN). Os interferons compreendem uma família de proteínas secretoras induzidas em resposta a estímulos extracelulares específicos através da estimulação de receptores toll-like (TLRs). Em algumas concretizações, os interferons aumentam as defesas antivirais do sistema imunológico (por exemplo, apresentação de antígeno). Por meio de receptores de superfície celular de alta afinidade, os IFNs estimulam genes usando moléculas de sinalização. Os interferões adequados para uso como um domínio imunomodulador das proteínas de fusão imunomoduladoras incluem, mas não estão limitados a: IFN-gama e IFN-alfa.

[0296] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um polipeptídeo IFN-gama operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno. O IFN-gama é produzido por uma variedade de células do sistema imunológico, como células T ativadas e células NK. O IFN-gama interage com um receptor específico na superfície celular e ativa as vias de transdução de sinal que produzem efeitos imunomoduladores. Por conseguinte, em algumas

concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IFN-gama. Em algumas concretizações, o polipeptídeo IFN-gama compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:7.

[0297] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um polipeptídeo IFN-alfa operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno. O IFN-alfa é produzido por linfócitos B, linfócitos nulos e macrófagos e ativa as células NK, além de apresentar atividades antivirais e antitumorais. Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo IFN-alfa. Em algumas concretizações, o polipeptídeo IFN-alfa compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6.

C. Fatores estimuladores da diferenciação de células imunológicas

[0298] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um fator estimulador de diferenciação de células imunes. Em algumas concretizações, os fatores de estimulação da diferenciação de células imunes ativam as vias de sinalização intracelular que conduzem a diferenciação, desenvolvimento e proliferação de células progenitoras hematopoéticas em subtipos específicos de células imunes. Os fatores estimuladores da diferenciação de células imunes adequados para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas incluem, mas não estão limitados a: GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos), G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos) e FLT3L (FMS do tipo tirosina quinase 3).

[0299] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo GM-CSF. GM-CSF é uma glicoproteína monomérica secretada por macrófagos, células T, mastócitos, células NK, células endoteliais e fibroblastos. Além de ter uma função de estimulação e diferenciação do crescimento nas células precursoras hematopoiéticas, o GM-CSF tem uma variedade de efeitos nas células imunes que expressam o receptor de GM-CSF. Em algumas concretizações, o polipeptídeo GM-CSF compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 27.

[0300] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo FLT3L. FLT3 é um receptor tirosina quinase (RTK) que é expresso por células precursoras hematopoiéticas imaturas. FLT3L é uma proteína transmembrana ou proteína solúvel e é expressa por um grande número de células, incluindo células hematopoiéticas e células do estroma na medula óssea. Em combinação com outros fatores de crescimento, FLT3L estimula a proliferação e o desenvolvimento de vários tipos de células, incluindo células precursoras mieloides e linfoides, células dendríticas e células NK. Em algumas concretizações, o polipeptídeo FLT3L compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 28.

[0301] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um polipeptídeo G-CSF. Em algumas concretizações, o G-CSF regula a proliferação, diferenciação e ativação funcional de granulócitos neutrofílicos. Em algumas concretizações, o polipeptídeo G-CSF compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 29.

D. Quimiocinas

[0302] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é uma quimiocina. Em algumas concretizações, as quimiocinas são proteínas que induzem a quimiotaxia direcionada de uma célula responsiva (por exemplo, leucócitos). Em geral, as quimiocinas são agrupadas em quatro subfamílias: CXC, CC, (X) C e CX3C. Nas quimiocinas CXC, um aminoácido separa as duas primeiras cisteínas ("o motivo CXC"). As quimiocinas ELR + CXC são ligantes para os receptores das quimiocinas CXCR1 e/ou CXCR2, que são receptores do tipo de domínio transmembrana acoplados à proteína G sete que se ligam especificamente às quimiocinas ELR + CXC. As sete quimiocinas ELR + CXC humanas são Gro-alfa humana (também conhecida como CXCL1), Gro-beta humana (também conhecida como CXCL2), Gro-gama humana (também conhecida como CXCL3), ENA-78 humana (também conhecida como CXCL5), GCP-2 humano (também conhecido como CXCL6), NAP-2 humano (também conhecido como CXCL7) e IL-8 humano (também conhecido como CXCL8). Todas as quimiocinas ELR + CXC se ligam ao receptor CXCR2; além disso, algumas quimiocinas ELR + CXC se ligam aos receptores CXCR1 e CXCR2 (ou seja, CXCL6 e CXCL8), todos contribuindo para a redundância nas vias de ativação. As cinco quimiocinas ELR + CXC murinas são quimioatraentes de queratinócitos (KC) (também conhecido como CXCL1), Proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) (também conhecido como CXCL2), proteína inflamatória de células dendríticas-1 (DCIP-1) (também conhecido como CXCL3), quimiocina CXC induzida por lipopolissacarídeo (LIX) (também conhecida como CXCL5) e peptídeo ativador de neutrófilos-2 (NAP-2) (também conhecido como CXCL7).

[0303] As quimiocinas adequadas para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui divulgada incluem, mas não estão limitados a: LIF, M-CSF, MIP-2, MIP-1-beta, KP (CXCL1), MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10), MCP-1, eotaxina, RANTES, LIX e MIP-1-alfa.

[0304] Os aminoácidos que codificam quimiocinas exemplares adequados para uso como um domínio imunomodulador para a proteína de fusão imunomoduladora divulgada neste documento são apresentados abaixo:

Quimiocina	Sequência de aminoácidos (SEQ ID NO)
LIF	30
M-CSF	31
MIP-2	32
MIP-1-beta	33
KP (CXCL1)	34
MIG (CXCL9)	35
IP-10 (CXCL10)	36
MCP-1	37
Eotaxin	38
RANTES	39
LIX	40
MIP-1-alfa	41

E. Superfamília do fator de necrose tumoral (TNF)

[0305] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um domínio extracelular de um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). A superfamília de ligantes e receptores do fator de necrose tumoral é uma série de proteínas de superfície celular estruturalmente homóloga que sinalizam por meio da formação de agrupamentos triméricos de complexos ligante-receptor. A ligação dos receptores da superfamília TNF ativadores pode levar a uma ampla gama de respostas pró-imunes, incluindo proliferação, função efetora aprimorada e produção de

quimiocinas e citocinas. Alguns ligantes como o Fas, podem levar à indução de apoptose e são expressos na superfície das células do sistema imunológico. Além disso, outros ligantes funcionam como receptores inibitórios que enfraquecem a resposta imune. Em algumas concretizações, o domínio extracelular é derivado de: TNF-alfa, LIGHT, LT-alfa, LT-beta, BTLA, CD160, CD40L, FasL, CD30L, 4-1BBL, CD27L, OX40L, TWEAK, APRIL, BAFF, RANKL, TRAIL, EDA1, EDA2 ou GITRL. O domínio extracelular é capaz de se ligar ao receptor do membro da superfamília TNF selecionado, induzindo ou estimulando uma resposta imune.

[0306] A tabela a seguir mostra o receptor correspondente ao domínio extracelular derivado:

Ligando	Receptor	Sequência de aminoácidos do domínio extracelular do ligante (SEQ ID NO)
TNF-alfa	TNFR1, TNFR2	51
LUZ	HEVM, LT-betaR	52
LT-alfa	TNFR1, TNFR2, HEVM	53
LT-beta	LT-BetaR	54
CD160	HVEM	56
CD40L	CD40	57
FasL	Fas	58
CD30L	CD30	59
4-1BBL	4-1BB	60
CD27L	CD27	61
OX40L	OX40	62
PUXÃO	Fn14	63
ABRIL	BCMA, TACI	64
BAFF	BCMA, TACI, BAFFR	65
RANKL	RANK, OPG	66
TRILHA	OPG, TRAIL R1 (DR4), TRAIL R2 (DR5), DcR1, DcR2	67
EDA1	EDAR	68
EDA2	XEDAR	69
GITRL	GITR	70

F. Família CD28

[0307] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um domínio extracelular de um membro da família CD28. A família CD28 é uma família de receptores inibitórios (PD1, CTLA-4) e ativadores (CD28, ICOS) que se ligam a membros da família B7 de ligantes. O CD28 é um receptor coestimulador que fornece o segundo sinal necessário para ativar as células T virgens (junto com a ligação do TCR) e tem dois ligantes naturais, CD80 e CD86. A sinalização de CD28 pode servir para aumentar a proliferação, função efetora e sinalização anti-apoptótica. Recentemente, foi demonstrado que a sinalização de CD28 é necessária no bloqueio PD1/PDL1 eficaz. ICOS (coestimulador de células T induzíveis) é um receptor de superfície intimamente relacionado que é expresso em células T ativadas e exibe funções semelhantes às de CD28.

[0308] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um domínio extracelular de CD80 (B7-1). Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 71.

[0309] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um domínio extracelular de CD86 (B7-2), capaz de se ligar a CD28. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 72.

[0310] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um domínio extracelular de ICOSLG. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID

NO: 73.

G. Anticorpos Agonísticos

[0311] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Os anticorpos agonísticos ativam seu alvo de interesse, em contraste com os anticorpos antagonistas que bloqueiam a função de seu alvo. Em algumas concretizações, os anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, ligam-se aos receptores de ativação imunológica. Em algumas concretizações, os receptores de ativação imunológica incluem, mas não estão limitados a: receptores do fator de necrose tumoral (TNF), membros da família CD28, receptores de células T (TCRs), receptores semelhantes a Ig de células assassinas (KIRs), receptores semelhantes a Ig de leucócitos (LIRs), receptores CD94/NKG2, receptores Fc, moléculas de ativação linfocítica de sinalização (SLAMs) e receptores Siglec ativadores.

Superfamília do fator de necrose tumoral (TNF)

[0312] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor do membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). A superfamília de TNF é descrita supra. Por exemplo, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno, que se liga a TNFR1, ativando assim o receptor.

[0313] A tabela a seguir fornece uma lista de receptores do membro da superfamília TNF que anticorpos agonísticos, ou

fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita:

Ligando	Receptor	Receptor Uniprot KB
TNF-alfa	TNFR1	P19438
	TNFR2	P20333
LUZ	HEVM	Q92956
	LT-betaR	Q06643
LT-alfa	TNFR1	P19438
	TNFR2	P20333
	HEVM	Q92956
LT-beta	LT-BetaR	Q06643
CD160	HVEM	Q92956
CD40L	CD40	P25942
FasL	Fas	P25445
CD30L	CD30	P28908
4-1BBL	4-1BB	Q07011
CD27L	CD27	P26842
OX40L	OX40	P43489
PUXÃO	Fn14	Q9NP84
ABRIL	BCMA	Q02223
	TACI	O14836
BAFF	BCMA	Q02223
	TACI	O14836
	BAFFR	Q96RJ3
RANKL	CLASSIFICAÇÃO	Q9Y6Q6
	OPG	O00300
TRILHA	OPG	O00300
	TRAIL R1 (DR4)	O00220
	TRAIL R2 (DR5)	O14763
	DcR1	O14798
	DcR2	Q9UBN6
EDA1	EDAR	Q9UNE0
EDA2	XEDAR	Q9HAV5
GITRL	GITR	Q9Y5U5

[0314] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonista anti-4-1BB. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonista anti-OX40. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonista de CD40.

Superfamília do receptor CD28

[0315] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação, é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor da superfamília CD28. A superfamília CD28 é descrita supra. Por exemplo, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno, que se liga ao CD28, ativando assim o receptor.

[0316] A tabela a seguir fornece uma lista de receptores do membro da superfamília CD28 que anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita:

Ligando	Receptor	Receptor Uniprot KB
CD80 (B7-1)	CD28	P10747
CD86 (B7-2)	CD28	P10747
ICOSLG	ICOS	Q9Y6W8

Complexo do receptor de células T (TCR)

[0317] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um complexo de receptor de células T (TCR). O receptor de células T (TCR) é o receptor da superfície celular responsável por transmitir especificidade de antígeno às células T. Cada TCR é específico para um determinado peptídeo apresentado por MHC Classe I (para células T CD8+) ou MHC Classe II (para células T CD4+). Para células T virgens, a ligação do TCR fornece o primeiro de dois sinais necessários para ativar a célula T. A ligação de TCR de células T CD8+ leva à morte da célula que exibe o pMHC cognato (e células potencialmente observadoras)

por meio da liberação de fatores solúveis, como perforina e granzima B, bem como a regulação positiva de ligantes indutores de apoptose, como o ligante Fas. Para células T auxiliares CD4+, a ligação do TCR com seu pMHC cognato resulta na liberação de citocinas,

[0318] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um TCR. Por exemplo, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno, que se liga a CD3 γ , ativando assim o receptor.

[0319] A tabela a seguir fornece uma lista de membros de complexos de TCR que anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita:

Fichário TCR	Membro Complexo TCR	Membro Uniprot KB
pMHC	CD3 γ	P09693
pMHC	CD3 δ	P04234
pMHC	CD3 ζ	P20963
pMHC	CD3 ϵ	P07766

Receptor semelhante a Ig de célula assassina (KIR)

[0320] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor semelhante a Ig de célula assassina (KIR). O receptor semelhante à imunoglobulina de células assassinas (KIR) é uma família de receptores expressos principalmente nas células NK e em alguns subconjuntos de células T. Esses receptores são principalmente responsáveis pelo reconhecimento de si

próprios (e, portanto, da função inibitória), pela ligação às moléculas MHC de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C). Esses receptores podem ser ativadores ou inibidores, dependendo do comprimento da cauda citoplasmática. Os receptores inibitórios têm uma cauda mais longa e contêm um domínio ITIM. Os KIRs ativadores têm um domínio citoplasmático mais curto e se associam ao DAP12 para mediar a sinalização.

[0321] Os KIRs de ativação são fornecidos na tabela abaixo, em que anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita:

Ligando	Receptor	Receptor Uniprot KB
HLA molecules	KIR 2DS1	Q14954
HLA molecules	KIR 2DS2	P43631
HLA molecules	KIR 2DS3	Q14952
HLA molecules	KIR 2DS4	P43632
HLA molecules	KIR 2DS5	Q14953
HLA molecules	KIR 3DS1	Q14943

Receptor semelhante a Ig de leucócitos (LIR)

[0322] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor semelhante a Ig de leucócito (LIR). Os receptores LIR são uma classe de receptores imunológicos expressos principalmente nas células imunes inatas. Seu ligante primário são moléculas MHC de classe I e exibem amplamente funções inibidoras, embora algumas tenham funções ativadoras. LIRA2, por exemplo, atua como um sensor inato de fragmentos de imunoglobulina que foram clivados por proteases microbianas.

[0323] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao

antígeno do mesmo, que se liga a LIRA2. Em algumas concretizações, os anticorpos capazes de se ligar a LIRA2 podem ser gerados com base em Uniprot ID Q8N149.

Família de receptores CD94 / NKG2

[0324] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação, é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor CD94/NKG2. CD94/NKG2 são receptores de lectina do tipo C de heterodímero que são expressos na superfície das células NK e alguns subconjuntos de células T CD8. Eles se ligam a moléculas HLA-E (moléculas MHC Classe I não clássicas) e podem transmitir sinais inibitórios e ativadores para as células NK. Os receptores inibitórios contêm domínios ITIM em suas caudas citoplasmáticas, enquanto os receptores ativadores se associam a DAP12 e DAP10 que contêm domínios ITAM.

[0325] Os receptores de ativação de CD94/NKG2 são fornecidos na tabela abaixo, na qual anticorpos agonísticos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

[0326] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um domínio extracelular de um ligante CD94/NKG2. A tabela a seguir mostra o receptor correspondente ao domínio extracelular derivado.

Ligando	Receptor	Receptor Uniprot KB	Sequência de aminoácidos do domínio extracelular do ligante (SEQ ID NO)
MICA	CD94	Q13241	74
	NKG2D	P26718	
MICB	CD94	Q13241	75
	NKG2D	P26718	
ULBP1	CD94	Q13241	76
	NKG2D	P26718	
ULBP2	CD94	Q13241	77
	NKG2D	P26718	
ULBP3	CD94	Q13241	78
	NKG2D	P26718	
ULBP4	CD94	Q13241	79
	NKG2D	P26718	
ULBP5, isoform 1	CD94	Q13241	80
	NKG2D	P26718	
ULBP5, isoform 2	CD94	Q13241	81
	NKG2D	P26718	
ULBP6	NKG2D	P26718	82
	NKG2C	P26717	
	NKG2E	Q07444	
	NKG2H	O43908	
	CD94	Q13241	

Receptores Fc

[0327] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor Fc. Os receptores Fc são receptores de células imunes expressos principalmente em células imunes inatas que se ligam à região constante de anticorpos e desencadeiam uma ampla gama de funções. Os receptores Fc são quase exclusivamente ativados (exceto para FcγRIIB, que transmite sinais inibitórios). A ligação do receptor Fc pode levar a ADCC, fagocitose, degranulação e a transmissão de sinais de ativação que aumentam a função efetora.

[0328] A tabela a seguir fornece uma lista de receptores Fc que anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita:

Ligando	Receptor	Receptor Uniprot KB
IgG	FcγRI	P12314
IgG	FcγRIIC	P31995
IgG	FcγRIIIA	P12318
IgG	FcγRIIIB	P31994
IgE	FcεRI	P30273
IgE	FcεRII	P06734
IgA	FcαR	P24071
IgA/IgM	FcμR	Q8WWV6

Moléculas de Ativação Linfocítica de Sinalização (SLAM)

[0329] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor de molécula de ativação linfocítica de sinalização (SLAM). Os receptores SLAM são uma série de moléculas que funcionam tanto como receptores quanto como ligantes. As moléculas SLAM interagem umas com as outras nas células adjacentes para enviar sinais de ativação ou inibição. As moléculas SLAM contêm motivos Swith baseados em imunorreceptor de tirosina em suas caudas citoplasmáticas, permitindo que se associem a moléculas de sinalização ativadoras e inibitórias intracelularmente.

[0330] A tabela a seguir fornece uma lista de receptores SLAM que anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

[0331] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da

presente divulgação é um domínio extracelular de um ligante SLAM. A tabela a seguir mostra o receptor correspondente ao domínio extracelular derivado.

Ligando	Receptor	Receptor Uniprot KB	Sequência de aminoácidos do domínio extracelular do ligante (SEQ ID NO)
SLAMF1	SLAMF1	Q13291	83
SLAMF2	SLAMF2	P09326	84
SLAMF3	SLAMF3	Q9HBG7	85
SLAMF4	SLAMF4	Q9BZW8	86
SLAMF5	SLAMF5	Q9UIB8	87
SLAMF6	SLAMF6	Q96DU3	88
SLAMF7	SLAMF7	Q9NQ25	89

Receptores da Família Siglec

[0332] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação, é um anticorpo agonístico, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor da família Siglec. Siglecs são uma família de receptores de superfície encontrados principalmente nas células do sistema imunológico que fazem parte da família das lectinas (proteínas de ligação do açúcar). Esses receptores se ligam a ligantes contendo ácido siálico. Esses receptores funcionam principalmente como receptores inibitórios em uma ampla variedade de tipos de células do sistema imunológico, embora alguns (siglec 14, 15 e 16) contenham um domínio de ativação ITAM.

[0333] Os receptores Siglec de ativação são fornecidos na tabela abaixo, na qual anticorpos agonísticos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita:

Receptor	Receptor Uniprot KB
Siglec 14	<u>Q08ET2</u>
Siglec 15	<u>Q6ZMC9</u>
Siglec 16	<u>A6NMB1</u>

H. Anticorpos Antagonistas

[0334] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Os anticorpos antagonistas bloqueiam a função de seu alvo. Em algumas concretizações, os anticorpos antagonistas, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, ligam-se aos receptores inibitórios imunológicos, permitindo assim a indução de uma resposta imunológica. Em algumas concretizações, os anticorpos antagonistas, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, se ligam a ligantes inibitórios imunológicos, permitindo assim a indução de uma resposta imunológica. Em algumas concretizações, os receptores e ligantes do inibidor imunológico incluem, mas não estão limitados a: receptores CD28, receptores da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), receptores Siglec, receptores CD94/NKG2, receptores semelhantes a leucócitos Ig (LIRs), Killer Cell Ig- Receptores semelhantes (KIRs), receptores Fc, moléculas da via da adenosina, outros inibidores de checkpoint e LAIR1.

Moléculas CD28

[0335] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a uma molécula de CD28. Conforme descrito supra, a família CD28 inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em

algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0336] A tabela a seguir fornece uma lista de moléculas de CD28 que anticorpos antagonistas, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

Molécula	Molécula Uniprot KB
PD1	<u>Q15116</u>
PDL1	<u>Q9NZQ7</u>
PDL2	<u>Q9BQ51</u>
CTLA-4	<u>P16410</u>
B7-H4	<u>Q7Z7D3</u>
B7-H3	<u>Q5ZPR3</u>

[0337] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a PD-1. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a PD-L1. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a CTLA-4.

Moléculas de Superfamília TNF

[0338] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um membro da superfamília TNF. Conforme descrito supra, a superfamília TNF inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0339] A tabela a seguir fornece uma lista de moléculas da superfamília de TNF que anticorpos antagonistas, ou

fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

Molécula	Molécula Uniprot KB
TIGIT	Q495A1
BTLA	Q7Z6A9

Receptores Siglec

[0340] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor Siglec. Conforme descrito supra, a família Siglec inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0341] A tabela a seguir fornece uma lista de receptores Siglec que anticorpos antagonistas, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

Receptor	Receptor Uniprot KB
Siglec 1 (sialoadesão)	Q9BZZ2
Siglec 2 (CD22)	P20273
Siglec 3 (CD33)	P20138
Siglec 4a (MAG)	P20916
Siglec 5	O15389
Siglec 6	O43699
Siglec 7	Q9Y286
Siglec 8	Q9NYZ4
Siglec 9	Q9Y336
Siglec 10	Q96LC7
Siglec 11	Q96RL6
Siglec 12	Q96PQ1

Receptores CD94/NKG2

[0342] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador

adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação, é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a receptores CD94/NKG2. Conforme descrito supra, a família CD94/NKG2 inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0343] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a CD94/NKG2A. Em algumas concretizações, tais anticorpos são gerados com base em UniProt ID P26715.

[0344] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a CD94/NKG2B. Em algumas concretizações, tais anticorpos são gerados com base em UniProt ID Q13241.

Receptores semelhantes a leucócitos Ig (LIRs)

[0345] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação, é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a receptores semelhantes a leucócitos Ig (LIR). Conforme descrito supra, a família LIR inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0346] A tabela a seguir fornece uma lista de LIRs que os anticorpos antagonistas, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso

na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

Receptor	Receptor Uniprot KB
LIRB1	<u>Q8NHL6</u>
LIRB2	<u>Q8N423</u>
LIRB3	<u>O75022</u>
LIRB4	<u>Q8NHJ6</u>

Receptores semelhantes a células assassinas de Ig (KIRs)

[0347] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor semelhante a Ig de célula assassina (KIR). Conforme descrito supra, a família KIR inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0348] A tabela a seguir fornece uma lista de KIRs que os anticorpos antagonistas, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

Receptor	Receptor Uniprot KB
KIR 2DL1	<u>P43626</u>
KIR 2DL2	<u>P43627</u>
KIR 2DL3	<u>P43628</u>
KIR 2DL4	<u>Q99706</u>
KIR 2DL5A	<u>Q8N109</u>
KIR 2DL5B	<u>Q8N HK3</u>
KIR 3DL1	<u>P43629</u>
KIR 3DL2	<u>P43630</u>
KIR 3DL3	<u>Q8N743</u>

Receptores Fc

[0349] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um receptor

Fc. Como descrito supra, a família de receptores Fc inclui moléculas ativadoras e inibidoras. Por conseguinte, em algumas concretizações, antagonizar as moléculas inibidoras resulta em uma indução ou estimulação de respostas imunes.

[0350] Em algumas concretizações, o receptor Fc do inibidor é Fc γ RIIB. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a Fc γ RIIB. Em algumas concretizações, tais anticorpos são gerados com base em UniProt ID P31994.

Moléculas da via da adenosina

[0351] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um membro da via da adenosina. Por exemplo, CD39 e CD73 são enzimas expressas na superfície das células que catalisam a transformação de ATP em adenosina. O ATP extracelular é uma molécula perigosa que induz uma resposta imunológica, enquanto a adenosina é imunossupressora. Essas moléculas contribuem para um ambiente localmente imunossupressor ao gerar adenosina.

[0352] Por conseguinte, em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga ao CD39. Em algumas concretizações, tais anticorpos são gerados com base em UniProt ID P49961.

[0353] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a CD73. Em algumas

concretizações, tais anticorpos são gerados com base em UniProt ID P21589.

Outros inibidores de checkpoint

[0354] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras da presente divulgação é um anticorpo antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que se liga a um inibidor de ponto de verificação imunológico. Em algumas concretizações, ao antagonizar esses inibidores de checkpoint imune, uma resposta imune é induzida ou estimulada.

[0355] A tabela a seguir fornece uma lista de inibidores de ponto de verificação imunológico que anticorpos antagonistas, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser gerados para o alvo, adequados para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita.

Molecula	Molecula Uniprot KB
VISTA	<u>Q9H7M9</u>
TIM-3	<u>Q8TDQ0</u>
LAG-3	<u>P18627</u>
CD47	<u>Q08722</u>
SIRP α	<u>P78324</u>

III. Linkers

[0356] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio imunomodulador operacionalmente ligado a uma proteína de ligação ao colágeno por meio de um ligante. Em algumas concretizações, o ligante entre o domínio imunomodulador e a proteína de ligação ao colágeno fornece uma separação estérica de modo que o domínio imunomodulador retém sua atividade (por exemplo, promova o acoplamento receptor/ligante). Em algumas concretizações, o ligante entre o domínio imunomodulador e a proteína de ligação ao colágeno é de comprimento ou massa suficiente para

reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno. Os métodos para medir a adsorção são conhecidos dos especialistas na técnica. Por exemplo, a adsorção pode ser medida por elipsometria (ELM), ressonância de plasmon de superfície (SPR), espectroscopia de modo de luz de guia de onda óptica (OWLS), espectroscopia de infravermelho-refletância interna total atenuada (ATR-IR), espectroscopia de dicroísmo circular (CD), espectroscopia interna total espectroscopia infravermelha de refletância (TIRF) e outras técnicas de microscopia de alta resolução. Em algumas concretizações, esses métodos mostram o arranjo espacial entre os domínios da proteína de fusão imunomoduladora.

[0357] Em algumas concretizações, o ligante entre o domínio imunomodulador e a proteína de ligação ao colágeno fornece peso molecular suficiente para retardar ou reduzir a difusão do tecido. Os métodos para medir a difusão a partir do tecido são conhecidos dos especialistas na técnica. Por exemplo, a difusão pode ser medida por imagem in vivo ou por microscopia de seções de tecido ao longo do tempo. Métodos exemplares são descritos em pelo menos Schmidt & Wittrup, Mol Canc Ther. 2009' e Wittrup et al., Methods in Enzymol 2012, cada um dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0358] Em algumas concretizações, o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que N = 1-1000, 50-800, 100-600 ou 200-500.

A. Albumina do Soro

[0359] Em algumas concretizações, o ligante é uma albumina de soro ou fragmentos da mesma. Métodos de fusão de albumina sérica a proteínas são divulgados em, por exemplo, US2010/0144599, US2007/0048282 e US2011/0020345, que são aqui

incorporados por referência em sua totalidade. Em algumas concretizações, o ligante é albumina de soro humano (HSA), ou variantes ou fragmentos dos mesmos, como aqueles divulgados em US 5.876.969, WO 2011/124718, WO 2013/075066 e WO 2011/0514789.

[0360] As albuminas adequadas para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras podem ser de humano, primata, roedor, bovino, equino, burro, coelho, cabra, ovelha, cão, galinha ou porco. Em algumas concretizações, a albumina é uma albumina sérica, por exemplo, uma albumina sérica humana (SEQ ID NO: 42, albumina sérica de primata (por exemplo, albumina sérica de chimpanzé, albumina sérica de gorila), albumina sérica de roedor (por exemplo, albumina sérica de hamster, albumina de soro de cobaia, albumina de soro de camundongo e albumina de soro de rato), albumina de soro bovino, albumina de soro equino, albumina de soro de burro, albumina de soro de coelho, albumina de soro de cabra, albumina de soro de ovelha, albumina de soro de cão, albumina de soro de galinha e albumina de soro de porco.

[0361] Em algumas concretizações, a albumina, ou uma variante ou fragmento da mesma, tem uma identidade de sequência com a sequência de HSA de tipo selvagem conforme estabelecido na SEQ ID NO: 42 de pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99%.

[0362] Em algumas concretizações, o número de alterações, por exemplo, substituições, inserções ou deleções, em

variantes de albumina é 1-20, por exemplo, 1-10 e 1-5, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 alterações em comparação com a albumina de tipo selvagem correspondente (por exemplo, HSA).

[0363] Em algumas concretizações, fragmentos de albumina, ou fragmentos de variantes dos mesmos, são adequados para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras. Fragmentos de albumina exemplares são divulgados em WO 2011/124718. Em algumas concretizações, um fragmento de albumina (por exemplo, um fragmento de HSA) tem pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, como pelo menos 40 aminoácidos, pelo menos 60 aminoácidos, pelo menos 80 aminoácidos, pelo menos 100 aminoácidos, pelo menos 150 aminoácidos, pelo menos 200 aminoácidos, pelo menos 300 aminoácidos, pelo menos 400 aminoácidos ou pelo menos 500 aminoácidos de comprimento.

[0364] Em algumas concretizações, um fragmento de albumina pode compreender pelo menos um subdomínio inteiro de albumina. Os domínios de HSA foram expressos como proteínas recombinantes (Dockal et al., JBC 1999; 274: 9303-10), onde o domínio I foi definido como consistindo nos aminoácidos 1-197 (SEQ ID NO: 116), o domínio II foi definido como consistindo nos aminoácidos 189-385 (SEQ ID NO: 117), e o domínio III foi definido como consistindo nos aminoácidos 381-585 (SEQ ID NO: 118) de HSA (SEQ ID NO: 42). A sobreposição parcial dos domínios ocorre dada a estrutura de hélice α estendida (h10-h1) que existe entre os domínios I e II, e entre os domínios II e III (Peters, 1996, op. Cit, Tabela 2-4). HSA também compreende seis subdomínios (subdomínios IA, IB, NA, NB, INA e NIB). O subdomínio IA compreende os aminoácidos 6-105, o subdomínio IB compreende os aminoácidos 120-177, o subdomínio

NA compreende os aminoácidos 200-291, o subdomínio NB compreende os aminoácidos 316-369, o subdomínio INA compreende os aminoácidos 392-491 e subdomínio NIB compreende os aminoácidos 512-583 de SEQ ID NO: 42.

[0365] Em algumas concretizações, um fragmento compreende um todo ou parte de um ou mais domínios ou subdomínios conforme definido acima, ou qualquer combinação desses domínios e/ou subdomínios. Em algumas concretizações, um fragmento de albumina compreende pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ou 99% de uma albumina ou de um domínio de uma albumina, ou uma variante ou fragmento do mesmo.

B. Domínios Fc

[0366] Em algumas concretizações, o ligante adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita é um domínio Fc. Em algumas concretizações, o domínio Fc é um componente dos anticorpos agonista ou antagonista descritos supra e, portanto, um domínio Fc separado não é necessário.

[0367] Em certas concretizações, o domínio Fc compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 115. Em algumas concretizações, o domínio Fc não contém uma região variável que se liga ao antígeno. Em algumas concretizações, o domínio Fc contém uma região variável que se liga ao antígeno. Os domínios Fc adequados para as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas podem ser obtidos a partir de várias fontes diferentes. Em certas concretizações, um domínio Fc é derivado de uma imunoglobulina humana. Em certas concretizações, o domínio Fc é de uma região constante de IgG1 humana. O domínio Fc da IgG1 humana é estabelecido na SEQ ID NO: 115. Entende-se, no entanto, que o domínio Fc pode

ser derivado de uma imunoglobulina de outra espécie de mamífero, incluindo, por exemplo, um roedor (por exemplo, um camundongo, rato, coelho, porquinho da índia) ou espécies de primatas não humanos (por exemplo, chimpanzés, macacos). Além disso, o domínio Fc ou porção do mesmo pode ser derivado de qualquer classe de imunoglobulina, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isotipo de imunoglobulina, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

[0368] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio Fc mutante. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um mutante, domínio Fc de IgG1. Em algumas concretizações, um domínio Fc mutante compreende uma ou mais mutações nos domínios de dobradiça, CH2 e/ou CH3. Em alguns aspectos, um domínio Fc mutante inclui uma mutação D265A.

[0369] Uma variedade de sequências de genes de domínio Fc (por exemplo, sequências de genes de região constante de camundongos e humanos) estão disponíveis na forma de depósitos acessíveis ao público. Domínios de região constante compreendendo uma sequência de domínio Fc podem ser selecionados sem uma função efetora particular e/ou com uma modificação particular para reduzir a imunogenicidade. Muitas sequências de anticorpos e genes que codificam anticorpos foram publicadas e as sequências de domínio Fc adequadas (por exemplo, sequências de dobradiça, CH2 e/ou CH3, ou porções das mesmas) podem ser derivadas dessas sequências usando técnicas reconhecidas na técnica. O material genético obtido usando qualquer um dos métodos anteriores pode então ser alterado ou sintetizado para obter polipeptídeos adequados para uso nos métodos aqui divulgados. Será ainda apreciado

que o escopo desta divulgação abrange alelos, variantes e mutações de sequências de DNA de região constante.

[0370] As sequências de domínio Fc podem ser clonadas, por exemplo, usando a reação em cadeia da polimerase e iniciadores que são selecionados para amplificar o domínio de interesse. Para clonar uma sequência de domínio Fc de um anticorpo, o mRNA pode ser isolado de hibridoma, baço ou células linfáticas, transcrito reversamente em DNA e genes de anticorpos amplificados por PCR. Os métodos de amplificação por PCR são descritos em detalhes na Patente U.S. 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; e em, por exemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, Calif. (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217: 270. A PCR pode ser iniciada por iniciadores de região constante de consenso ou por iniciadores mais específicos com base nas sequências de DNA e de aminoácidos de cadeia pesada e leve publicadas. Conforme discutido acima, a PCR também pode ser usada para isolar clones de DNA que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo. Neste caso, as bibliotecas podem ser rastreadas por iniciadores de consenso ou sondas homólogas maiores, tais como sondas de região constante de camundongo. Numerosos conjuntos de iniciadores adequados para a amplificação de genes de anticorpos são conhecidos na técnica (por exemplo, iniciadores 5' baseados na sequência N-terminal de anticorpos purificados (Benhar e Pastan. 1994. Protein Engineering 7: 1509); amplificação rápida de extremidades de cDNA (Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173: 33); sequências líderes de anticorpos (Larrick et al. Biochem Biophys Res Commun 1989; 160: 1250).

A clonagem de sequências de anticorpos é ainda descrita em Newman et al ., Patente US No. 5.658.570, depositada em 25 de janeiro de 1995, que é aqui incorporada por referência.

[0371] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora divulgada compreende um ou mais domínios Fc (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais domínios Fc). Em certas concretizações, os domínios Fc podem ser de diferentes tipos. Em certas concretizações, pelo menos um domínio Fc presente na proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio de dobradiça ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc que compreende pelo menos um domínio CH2 ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc que compreende pelo menos um domínio CH3 ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc que compreende pelo menos um domínio CH4 ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc que compreende pelo menos um domínio de dobradiça ou parte do mesmo e pelo menos um domínio CH2 ou parte do mesmo (por exemplo, na orientação de dobradiça-CH2). Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc que compreende pelo menos um domínio CH2 ou porção do mesmo e pelo menos um domínio CH3 ou porção do mesmo (por exemplo, na orientação CH2-CH3). Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc compreendendo pelo menos um domínio de dobradiça ou parte do mesmo, pelo menos um domínio CH2 ou parte do mesmo, e pelo

menos um domínio CH3 ou parte do mesmo, por exemplo, na orientação de dobradiça-CH2 -CH3, dobradiça-CH3-CH2 ou CH2-CH3-dobradiça.

[0372] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos uma região Fc completa derivada de uma ou mais cadeias pesadas de imunoglobulina (por exemplo, um domínio Fc incluindo domínios de dobradiça, CH2 e CH3, embora estes não precisem ser derivados do mesmo anticorpo). Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos dois domínios Fc completos derivados de uma ou mais cadeias pesadas de imunoglobulina. Em certas concretizações, o domínio Fc completo é derivado de uma cadeia pesada de imunoglobulina IgG humana (por exemplo, IgG1 humana).

[0373] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc compreendendo um domínio CH3 completo. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc compreendendo um domínio CH2 completo. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc compreendendo pelo menos um domínio CH3 e pelo menos um de uma região de dobradiça e um domínio CH2. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc compreendendo uma dobradiça e um domínio CH3. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc compreendendo uma dobradiça, um CH2 e um domínio CH3. Em certas concretizações, o domínio Fc é derivado de uma cadeia pesada de imunoglobulina IgG humana (por exemplo, IgG1

humana).

[0374] Os domínios da região constante ou suas porções que constituem um domínio Fc da proteína de fusão imunomoduladora podem ser derivados de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, um polipeptídeo adequado para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras divulgadas neste documento pode compreender um domínio CH2 ou porção deste derivado de uma molécula de IgG1 e uma região CH3 ou porção desta derivada de uma molécula de IgG3. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio Fc que compreende um domínio de dobradiça derivado, em parte, de uma molécula de IgG1 e, em parte, de uma molécula de IgG3. Conforme estabelecido neste documento, será entendido por aqueles versados na técnica que um domínio Fc pode ser alterado de modo que varie na sequência de aminoácidos de uma molécula de anticorpo de ocorrência natural.

[0375] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora carece de um ou mais domínios de região constante de uma região Fc completa, isto é, eles são parcial ou totalmente deletados. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora carece de um domínio CH2 inteiro. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende regiões Fc excluídas do domínio CH2 derivadas de um vetor (por exemplo, da IDEC Pharmaceuticals, San Diego) que codifica um domínio de região constante humana IgG1 (ver, por exemplo, WO02/060955A2 e WO02/096948A2). Este vetor exemplar é projetado para excluir o domínio CH2 e fornecer um vetor sintético que expressa uma região constante de IgG1 com domínio excluído. Será observado que estes constructos

exemplares são preferencialmente projetados para fundir um domínio CH3 de ligação diretamente a uma região de dobradiça do respectivo domínio Fc.

[0376] Em outros constructos, pode ser desejável fornecer um espaçador de peptídeo entre um ou mais domínios Fc constituintes. Por exemplo, um espaçador de peptídeo pode ser colocado entre uma região de dobradiça e um domínio CH2 e/ou entre um domínio CH2 e um CH3. Por exemplo, constructos compatíveis podem ser expressos onde o domínio CH2 foi deletado e o domínio CH3 restante (sintético ou não sintético) é unido à região de dobradiça com um espaçador de peptídeo de 1-20, 1-10 ou 1-5 aminoácidos. Esse espaçador de peptídeo pode ser adicionado, por exemplo, para garantir que os elementos reguladores do domínio da região constante permaneçam livres e acessíveis ou que a região da dobradiça permaneça flexível. De preferência, qualquer peptídeo ligante compatível usado na presente divulgação será relativamente não imunogênico e não impedirá o dobramento adequado do Fc.

[0377] Em certas concretizações, um domínio Fc empregado na proteína de fusão imunomoduladora é alterado ou modificado, por exemplo, por mutação de aminoácido (por exemplo, adição, deleção ou substituição). Tal como aqui utilizado, o termo "variante de domínio Fc" refere-se a um domínio Fc possuindo pelo menos uma modificação de aminoácido, tal como uma substituição de aminoácido, em comparação com o Fc de tipo selvagem do qual o domínio Fc é derivado. Por exemplo, em que o domínio Fc é derivado de um anticorpo IgG1 humano, uma variante compreende pelo menos uma mutação de aminoácido (por exemplo, substituição) em comparação com um aminoácido de tipo selvagem na posição correspondente da região Fc de IgG1

humana.

[0378] Em certas concretizações, a variante Fc compreende uma substituição em uma posição de aminoácido localizada em um domínio de dobradiça ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a variante Fc compreende uma substituição em uma posição de aminoácido localizada em um domínio CH2 ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a variante Fc compreende uma substituição em uma posição de aminoácido localizada em um domínio CH3 ou porção do mesmo. Em certas concretizações, a variante Fc compreende uma substituição em uma posição de aminoácido localizada em um domínio CH4 ou porção do mesmo.

[0379] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende uma variante Fc que compreende mais de uma substituição de aminoácido. A proteína de fusão imunomoduladora pode compreender, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais substituições de aminoácidos no domínio Fc. De preferência, as substituições de aminoácidos são posicionadas espacialmente umas das outras por um intervalo de pelo menos 1 posição de aminoácido ou mais, por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos posições ou mais. Mais preferencialmente, os aminoácidos projetados são posicionados espacialmente separados uns dos outros por um intervalo de pelo menos 5, 10, 15, 20 ou 25 posições de aminoácidos ou mais.

[0380] Em algumas concretizações, um domínio Fc inclui mudanças na região entre os aminoácidos 234-238, incluindo a sequência LLGGP no início do domínio CH2. Em algumas concretizações, uma variante Fc altera a função efetora mediada por Fc, particularmente ADCC, e/ou diminui a avides

de ligação para receptores Fc. Em alguns aspectos, as mudanças de sequência mais próximas da junção CH2-CH3, em posições como K322 ou P331 podem eliminar a citotoxicidade mediada pelo complemento e/ou alterar a avidéz para a ligação de FcR. Em algumas concretizações, um domínio Fc incorpora alterações nos resíduos P238 e P331, por exemplo, alterando as prolínas de tipo selvagem nestas posições para serina. Em algumas concretizações, alterações na região de dobradiça em uma ou mais das três cisteínas de dobradiça, para codificar CCC, SCC, SSC, SCS ou SSS nestes resíduos também podem afetar a ligação de FcR e homogeneidade molecular, por exemplo, por eliminação de cisteínas desemparelhadas que pode desestabilizar a proteína dobrada.

[0381] Outras mutações de aminoácidos no domínio Fc são contempladas para reduzir a ligação ao receptor Fc gama e subtipos de receptor Fc gama. Por exemplo, mutações nas posições 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 280, 283, 285, 298, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 312, 315, 322, 324, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 356, 360, 373, 376, 378, 379, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439 da região Fc podem alterar a ligação, conforme descrito na Patente US No. 6.737.056, emitida em 18 de maio de 2004, incorporada neste documento por referência em sua totalidade. Esta patente relatou que alterar Pro331 em IgG3 para Ser resultou em afinidade seis vezes menor em comparação com IgG3 não mutado, indicando o envolvimento de Pro331 na ligação de Fc gama RI. Além disso, as modificações de aminoácidos nas posições 234, 235, 236 e 237, 297, 318, 320 e 322 são divulgadas como

potencialmente alterando a afinidade de ligação ao receptor na U.S. 5.624.821, emitida em 29 de abril de 1997 e incorporada aqui por referência na sua totalidade.

[0382] Outras mutações contempladas para uso incluem, por exemplo, aquelas descritas na Patente U.S. Aplicativo. Bar. No. 2006/0235208, publicado em 19 de outubro de 2006 e incorporado neste documento por referência em sua totalidade. Além disso, as mutações descritas na Pat. Aplicativo. Bar. No. 2006/0235208, incorporado aqui por referência em sua totalidade, são contemplados para uso. O mutante L234A/L235A é descrito, por exemplo, na Patente U.S. Aplicativo. Bar. No. 2003/0108548, publicado em 12 de junho de 2003 e incorporado neste documento por referência em sua totalidade. Nas concretizações, as modificações descritas são incluídas individualmente ou em combinação. Em certas concretizações, a mutação é D265A em IgG1 humana.

[0383] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende uma variante Fc que compreende uma substituição de aminoácido que altera as funções efetoras dependentes de antígeno do polipeptídeo, em particular ADCC ou ativação do complemento, por exemplo, em comparação com uma região Fc de tipo selvagem. Essa proteína de fusão imunomoduladora exibe uma ligação diminuída a FcR gama quando comparada com polipeptídeos de tipo selvagem e, portanto, medeia a função efetora reduzida. Espera-se que as variantes Fc com afinidade de ligação FcR gama diminuída reduzam a função efetora, e tais moléculas também são úteis, por exemplo, para o tratamento de condições em que a destruição de células alvo é indesejável, por exemplo, onde células normais podem expressar moléculas alvo, ou onde crônicas a

administração do polipeptídeo pode resultar na ativação indesejada do sistema imunológico.

[0384] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora exibe uma ligação alterada a um Fc γ R de ativação (por exemplo, Fc γ 1, Fc γ 11a ou Fc γ RIIIa). Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora exibe afinidade de ligação alterada para um Fc γ R inibitório (por exemplo, Fc γ RIIb). Substituições de aminoácidos exemplares que alteraram FcR ou atividade de ligação de complemento são divulgadas na Publicação Internacional PCT Nº WO05/063815 que é aqui incorporada por referência.

[0385] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende uma substituição de aminoácido que altera a glicosilação da proteína de fusão. Por exemplo, em algumas concretizações, o domínio Fc compreende uma mutação que leva a glicosilação reduzida (por exemplo, glicosilação ligada a N ou O) ou compreende uma glicofoma alterada do domínio Fc de tipo selvagem (por exemplo, uma baixa fucose ou livre de fucose glicano). Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora tem uma substituição de aminoácido próximo ou dentro de um motivo de glicosilação, por exemplo, um motivo de glicosilação ligado a N que contém a sequência de aminoácidos NXT ou NXS. Substituições de aminoácidos exemplares que reduzem ou alteram a glicosilação são divulgadas em WO05/018572 e US2007/0111281, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência. Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende pelo menos um domínio Fc com resíduo de cisteína manipulado ou análogo deste que está localizado na superfície exposta ao solvente. Em certas concretizações, a proteína de

fusão imunomoduladora compreende um domínio Fc compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína livre manipulado ou análogo do mesmo que é substancialmente livre de ligação dissulfeto com um segundo resíduo de cisteína. Qualquer um dos resíduos de cisteína manipulados acima ou seus análogos podem ser subsequentemente conjugados a um domínio funcional usando técnicas reconhecidas na técnica (por exemplo, conjugado com um ligante heterobifuncional reativo com tiol).

[0386] Em certas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um domínio Fc geneticamente fundido com dois ou mais dos seus domínios Fc constituintes selecionados independentemente a partir dos domínios Fc aqui descritos. Em certas concretizações, os domínios Fc são iguais. Em certas concretizações, pelo menos dois dos domínios Fc são diferentes. Por exemplo, os domínios Fc compreendem o mesmo número de resíduos de aminoácidos ou podem diferir em comprimento por um ou mais resíduos de aminoácidos (por exemplo, por cerca de 5 resíduos de aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos resíduos de ácido), cerca de 10 resíduos, cerca de 15 resíduos, cerca de 20 resíduos, cerca de 30 resíduos, cerca de 40 resíduos ou cerca de 50 resíduos). Em certas concretizações, os domínios Fc diferem na sequência em uma ou mais posições de aminoácidos. Por exemplo, pelo menos dois dos domínios Fc podem diferir em cerca de 5 posições de aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 posições de aminoácidos), cerca de 10 posições, cerca de 15 posições, cerca de 20 posições, cerca de 30 posições, cerca de 40 posições ou cerca de 50 posições).

C. Ligantes Adicionais

[0387] Em algumas concretizações, o ligante adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita é um domínio de polietilenoglicol (PEG). O PEG é um polímero solúvel em água bem conhecido que está disponível comercialmente ou pode ser preparado por polimerização por abertura de anel de etilenoglicol de acordo com métodos bem conhecidos na técnica (Sandler e Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, páginas 138-161). O termo "PEG" é usado amplamente para abranger qualquer molécula de polietilenoglicol e pode ser representado pela fórmula: $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH$, onde n é 20 a 2300 e X é H ou uma modificação terminal, por exemplo, um alquila C_{1-4} . Em certas concretizações, o PEG adequado para uso nos métodos divulgados neste documento termina em uma extremidade com hidroxil ou metoxil, isto é, X é H ou CH_3 ("metoxil PEG"). O PEG pode conter outros grupos químicos que são necessários para as reações de ligação; que resulta da síntese química da molécula; ou que é um espaçador para distância ideal de partes da molécula. Além disso, esse PEG pode consistir em uma ou mais cadeias laterais de PEG que estão ligadas entre si. PEGs com mais de uma cadeia de PEG são chamados de PEGs multiarmed ou ramificados. PEGs ramificados podem ser preparados, por exemplo, pela adição de óxido de polietileno a vários polióis, incluindo glicerol, pentaeritriol e sorbitol. Por exemplo, um PEG ramificado de quatro braços pode ser preparado a partir de pentaeritriol e óxido de etileno. PEG ramificado são descritos em, por exemplo, EP-A 0 473 084 e US 5,932,462, ambos os quais são aqui incorporados por referência. Uma forma de PEGs inclui duas cadeias laterais de PEG (PEG2) ligadas através dos grupos amino

primários de uma lisina (Monfardini et al., Bioconjugate Chem 1995; 6: 62-9).

[0388] Em certas concretizações, o PEG é conjugado a uma fração de cisteína no terminal N ou C dos domínios da proteína de fusão imunomoduladora (por exemplo, domínio imunomodulador e domínio de ligação ao colágeno). Uma porção PEG também pode ser ligada por outra química, incluindo por conjugação a aminas. A conjugação de PEG a peptídeos ou proteínas geralmente envolve a ativação de PEG e o acoplamento dos intermediários PEG ativados diretamente a proteínas/peptídeos alvo ou a um ligante, que é subsequentemente ativado e acoplado a proteínas/peptídeos alvo (ver Abuchowski et al., JBC 1977; 252: 3571 e JBC 1977; 252: 3582, e Harris et al., Em: Poly (etilenoglicol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (JM Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Cap. 21 e 22). Uma variedade de formas de massa molecular de PEG pode ser selecionada, por exemplo, de cerca de 1.000 Daltons (Da) a 100.000 Da (n é 20 a 2300). O número de unidades de repetição "n" no PEG é aproximado para a massa molecular descrita em Daltons.

[0389] Um especialista na técnica pode selecionar uma massa molecular adequada para PEG, por exemplo, com base em pelo menos a massa molecular da proteína de fusão imunomoduladora sem PEG.

[0390] Em certas concretizações, as moléculas de PEG podem ser ativadas para reagir com grupos amino nos domínios, tais como com lisinas (Bencham CO et al., Anal. Biochem., 131, 25 (1983); Veronese, FM et al., Appl. Biochem., 11, 141 (1985); Zalipsky, S. et al., Polymeric Drugs and Drug Delivery

Systems, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. et al., Europ. Polym. J. , 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. et al., Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990)).

[0391] Em certas concretizações, ésteres de carbonato de PEG são usados para conjugar PEG. N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC) pode ser usado na reação com PEG para formar PEG-succinimidil carbonato misto ativo que pode ser subsequentemente reagido com um grupo nucleofílico de um ligante ou um grupo amino de IL-2 (ver Patente US No. 5.281.698 e Patente US No. 5.932.462). Em um tipo semelhante de reação, 1,1'- (dibenzotriazolil) carbonato e di- (2-piridil) carbonato podem ser reagidos com PEG para formar PEG-benzotriazolil e PEG-piridil carbonato misto (Patente US 5.382.657), respectivamente. A peguilação pode ser realizada de acordo com os métodos do estado da técnica, por exemplo, por reação de IL-2 com PEGs eletrof ilicamente ativos (Shearwater Corp., EUA, www.shearwatercorp.com). Os reagentes de PEG preferidos adequados para uso nos métodos divulgados neste documento são, por exemplo, N-hidroxisuccinimidil propionatos (PEG-SPA), butanoatos (PEG-SBA), PEG-succinimidil propionato ou N-hidroxisuccinimidas ramificadas, tais como mPEG2-NHS (Monfardini, C , et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69).

[0392] Em algumas concretizações, o ligante adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita é a transferrina, conforme divulgado em US 7.176.278 e US 8.158.579, que são incorporados neste documento por referência em sua totalidade.

[0393] Em algumas concretizações, o ligante adequado para

uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita é uma proteína de ligação de imunoglobulina sérica, como aquelas divulgadas em US2007/0178082, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0394] Em algumas concretizações, o ligante adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita é uma globulina, tal como globulina de ligação à tiroxina, macroglobulina a2 ou haptoglobulina.

[0395] Em algumas concretizações, o ligante adequado para uso na proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita é uma proteína de domínio de esqueleto baseada em fibronectina (Fn), tal como aqueles divulgados em US2012/0094909, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Métodos de produção de proteínas de domínio-esqueleto baseadas em fibronectina também são divulgados em US2012/0094909. Um exemplo não limitativo de um grupo de PK estendida baseado em Fn3 é Fn3 (HSA).

D. Outros Ligantes

[0396] Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador está operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno por meio de um ligante, por exemplo, um ligante gly-ser. Em algumas concretizações, o domínio imunomodulador está operacionalmente ligado a um domínio de ligação ao colágeno por meio de um ligante (por exemplo, albumina sérica), onde o ligante está ligado ao domínio de ligação ao colágeno e ao domínio imunomodulador por meio de ligantes adicionais (por exemplo, ligante gly-ser). Ligantes adequados para fundir o domínio de ligação de colágeno e domínio imunomodulador, ou para fundir o domínio de ligação de colágeno, o domínio imunomodulador e o ligante (por exemplo, albumina sérica) são

bem conhecidos na técnica e são divulgados em, por exemplo, US2010/0210511, US2010/0179094, e US2012/0094909, que são aqui incorporados por referência na sua totalidade. Ligantes exemplares incluem ligantes polipeptídicos de glicer, ligantes polipeptídicos de glicina-prolina e ligantes polipeptídicos de prolina-alanina. Em certas concretizações, o ligante é um ligante polipeptídico gli-ser, ou seja, um peptídeo que consiste em resíduos de glicina e serina.

[0397] Ligantes polipeptídicos de gli-ser exemplares compreendem a sequência de aminoácidos

Ser (Gly4Ser) n. Em certas concretizações, n = 1. Em certas concretizações, n = 2. Em certas concretizações, n = 3, ou seja, Ser (Gly4Ser) 3. Em certas concretizações, n = 4, ou seja, Ser (Gly4Ser) 4. Em certas concretizações, n = 5. Em certas concretizações, n = 6. Em certas concretizações, n = 7. Em certas concretizações, n = 8. Em certas concretizações, n = 9. Em certas concretizações, n = 10. Outro ligante polipeptídico de gly-ser exemplar compreende a sequência de aminoácidos Ser (Gly4Ser) n. Em certas concretizações, n = 1. Em certas concretizações, n = 2. Em certas concretizações, n=3. Em certas concretizações, n=4. Em certas concretizações, n=5. Em certas concretizações, n=6. Outro ligante polipeptídico de gli-ser exemplar compreende (Gly4Ser)n. Em certas concretizações, n=1. Em certas concretizações, n=2. Em certas concretizações, n=3. Em certas concretizações, n=4. Em certas concretizações, n=5. Em certas concretizações, n=6. Outro ligante polipeptídico de gly-ser exemplar compreende (Gly3Ser)n. Em certas concretizações, n=1. Em certas concretizações, n=2. Em certas concretizações, n=3. Em certas concretizações, n=4. Em certas concretizações, n=5. Em certas

concretizações, n=6.

[0398] Outros ligantes que são adequados para uso nas proteínas de fusão imunomoduladoras são conhecidos na técnica, por exemplo, os ligantes ricos em serina divulgados em US 5.525.491, a hélice formando ligantes peptídicos (por exemplo, A (EAAAK)_nA (n=2-5)) divulgado em Arai et al., Protein Eng 2001; 14: 529-32, e os ligantes estáveis divulgados em Chen et al., Mol Pharm 2011; 8: 457-65, ou seja, o ligante dipeptídeo LE, uma trombina- ligante de ciclopeptídeo dissulfeto sensível e o ligante formador de hélice alfa LEA (EAAAK) 4ALEA (EAAAK) 4ALE (SEQ ID NO: 119).

[0399] Outros ligantes exemplares incluem ligantes GS (isto é, (GS)_n), ligantes GGSG (isto é, (GGSG)_n), ligantes GSAT, ligantes SEG e ligantes GGS (isto é, (GGSGGS)_n), em que n é um número inteiro positivo (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5). Outros ligantes adequados para uso nas moléculas de albumina-nuclease híbrida podem ser encontrados usando bancos de dados disponíveis publicamente, como o Linker Database (ibi.vu.nl/programs/linkerdbwww). O Linker Database é um banco de dados de ligantes interdomínio em enzimas multifuncionais que servem como ligantes potenciais em novas proteínas de fusão (ver, por exemplo, George et al., Protein Engineering 2002; 15: 871-9).

[0400] Será entendido que as formas variantes destes ligantes polipeptídicos exemplares podem ser criadas através da introdução de uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos que codifica um ligante polipeptídico de modo que uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos sejam introduzidas no ligante polipeptídico. As mutações podem ser

introduzidas por técnicas padrão, como mutagênese dirigida ao local e mutagênese mediada por PCR.

[0401] Os ligantes polipeptídicos da divulgação têm pelo menos um aminoácido de comprimento e podem ser de comprimentos variáveis. Em uma concretização, um ligante polipeptídico da divulgação tem cerca de 1 a cerca de 50 aminoácidos de comprimento. Conforme usado neste contexto, o termo "cerca de" indica +/- dois resíduos de aminoácidos. Uma vez que o comprimento do ligante deve ser um número inteiro positivo, o comprimento de cerca de 1 a cerca de 50 aminoácidos de comprimento, significa um comprimento de 1 a 48-52 aminoácidos de comprimento. Em outra concretização, um ligante polipeptídico da divulgação tem cerca de 10-20 aminoácidos de comprimento. Em outra concretização, um ligante polipeptídico da divulgação tem cerca de 15 a cerca de 50 aminoácidos de comprimento.

[0402] Em outra concretização, um ligante polipeptídico da divulgação tem cerca de 20 a cerca de 45 aminoácidos de comprimento. Em outra concretização, um ligante polipeptídico da divulgação tem cerca de 15 a cerca de 25 aminoácidos de comprimento. Em outra concretização, um ligante polipeptídico da divulgação é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 ou 61 ou mais aminoácidos de comprimento.

[0403] Os ligantes polipeptídicos podem ser introduzidos em sequências polipeptídicas usando técnicas conhecidas na técnica. As modificações podem ser confirmadas pela análise da sequência de DNA. O DNA de plasmídeo pode ser usado para

transformar células hospedeiras para produção estável dos polipeptídeos produzidos.

IV. Proteínas de fusão imunomoduladoras exemplares

[0404] A divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio imunomodulador e um domínio de ligação ao colágeno, opcionalmente um ligante, em que o domínio imunomodulador está operacionalmente ligado com ou sem o ligante ao domínio de ligação ao colágeno. As proteínas de fusão imunomoduladoras da divulgação são modulares e podem ser configuradas para incorporar vários domínios individuais.

A. Proteínas de Fusão de IL-2

[0405] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende IL-2 e lumican, em que IL-2 está operacionalmente ligada a lumican. Em algumas concretizações, IL-2 está operacionalmente ligado a lumican com albumina. Em algumas concretizações, IL-2 está operacionalmente ligada ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, IL-2 está operacionalmente ligada ao terminal C de lumican.

[0406] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência de IL-2 humana estabelecida em SEQ ID NO:1 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO: 107. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende o humano Sequência de IL-2 estabelecida em SEQ ID NO: 1 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO:107 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO:42 e SEQ ID NO:43.

[0407] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende IL-2 e LAIR-1, em que IL-2 está

operacionalmente ligada a LAIR-1. Em algumas concretizações, IL-2 está operacionalmente ligado a LAIR-1 com albumina. Em algumas concretizações, IL-2 está operacionalmente ligada ao terminal N de LAIR-1. Em algumas concretizações, IL-2 está operacionalmente ligada ao C-terminal de LAIR-1.

[0408] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência de IL-2 humana estabelecida em SEQ ID NO: 1 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida em SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência de IL-2 humana estabelecida em SEQ ID NO: 1 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida em SEQ ID NO: 98 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43 .

B. Proteínas de Fusão IL-12

[0409] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende IL-12 e lumican, em que IL-12 está operacionalmente ligada a lumican. Em algumas concretizações, IL-12 está operacionalmente ligado a lumican com albumina. Em algumas concretizações, IL-12 está operacionalmente ligada ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, IL-12 está operacionalmente ligada ao C-terminal de lumican.

[0410] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende as sequências de IL-12 humana estabelecidas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 operacionalmente ligadas à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO: 107. Em algumas concretizações, A proteína de fusão imunomoduladora compreende as sequências de IL-12 humana estabelecidas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 operacionalmente ligadas à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO:

107 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO : 42 e SEQ ID NO: 43.

[0411] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende IL-12 e LAIR-1, em que IL-12 está operacionalmente ligada a LAIR-1. Em algumas concretizações, IL-12 está operacionalmente ligado a LAIR-1 com albumina. Em algumas concretizações, IL-12 está operacionalmente ligada ao terminal N de LAIR-1. Em algumas concretizações, IL-12 está operacionalmente ligada ao C-terminal de LAIR-1.

[0412] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende as sequências de IL-12 humana estabelecidas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3, operacionalmente ligadas à sequência LAIR-1 humana estabelecida em SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende as sequências de IL-12 humana estabelecidas em SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3 operativamente ligadas à sequência LAIR-1 humana estabelecida em SEQ ID NO: 98 com uma sequência de albumina de soro humano selecionado de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43.

C. Proteínas de fusão CCL-3

[0413] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende CCL-3 e lumican, em que CCL-3 está operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o CCL-3 está operacionalmente ligado a lumican com albumina. Em algumas concretizações, CCL-3 está operacionalmente ligado ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, CCL-3 está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0414] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-3 humana estabelecida na SEQ ID NO: 41 operacionalmente ligada à

sequência lumican humana estabelecida na SEQ ID NO: 107. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende o humano Sequência CCL-3 estabelecida em SEQ ID NO: 41 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO: 107 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43.

[0415] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende CCL-3 e LAIR-1, em que CCL-3 está operacionalmente ligado a LAIR-1. Em algumas concretizações, CCL-3 está operacionalmente ligado a LAIR-1 com albumina. Em algumas concretizações, CCL-3 está operacionalmente ligado ao terminal N de LAIR-1. Em algumas concretizações, CCL-3 está operacionalmente ligado ao C-terminal de LAIR-1.

[0416] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-3 humana estabelecida na SEQ ID NO: 41 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-3 humana estabelecida na SEQ ID NO: 41 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida na SEQ ID NO: 98 com uma sequência de albumina sérica humana selecionada a partir de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43 .

D. Proteínas de Fusão CCL-4

[0417] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende CCL-4 e lumican, em que CCL-4 está operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o CCL-4 está operacionalmente ligado a lumican com albumina. Em algumas concretizações, CCL-4 está operacionalmente ligado ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, o CCL-4

está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0418] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-4 humana estabelecida na SEQ ID NO: 33 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida na SEQ ID NO: 107. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende o humano Sequência CCL-4 estabelecida em SEQ ID NO: 33 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO: 107 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43.

[0419] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende CCL-4 e LAIR-1, em que CCL-4 está operacionalmente ligado a LAIR-1. Em algumas concretizações, CCL-4 está operacionalmente ligado a LAIR-1 com albumina. Em algumas concretizações, o CCL-4 está operacionalmente ligado ao terminal N de LAIR-1. Em algumas concretizações, CCL-4 está operacionalmente ligado ao terminal C de LAIR-1.

[0420] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-4 humana estabelecida na SEQ ID NO:33 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-4 humana estabelecida na SEQ ID NO:33 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida na SEQ ID NO: 98 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada a partir de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO:43.

E. Proteínas de fusão CCL-5

[0421] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende CCL-5 e lumican, em que CCL-5 está

operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o CCL-5 está operacionalmente ligado a lumican com albumina. Em algumas concretizações, o CCL-5 está operacionalmente ligado ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, o CCL-5 está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0422] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-5 humana estabelecida na SEQ ID NO: 39 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida na SEQ ID NO: 107. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a Sequência CCL-5 humana estabelecida em SEQ ID NO: 39 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO: 107 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43.

[0423] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende CCL-5 e LAIR-1, em que CCL-5 está operacionalmente ligado a LAIR-1. Em algumas concretizações, CCL-5 está operacionalmente ligado a LAIR-1 com albumina. Em algumas concretizações, CCL-5 está operacionalmente ligado ao terminal N de LAIR-1. Em algumas concretizações, CCL-5 está operacionalmente ligado ao terminal C de LAIR-1.

[0424] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-5 humana estabelecida na SEQ ID NO: 39 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida na SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência CCL-5 humana estabelecida na SEQ ID NO: 39 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida na SEQ ID NO: 98 com uma sequência de albumina sérica humana selecionada a partir de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID

NO: 43 .

F. Proteínas de fusão de eotaxina

[0425] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende eotaxina e lumican, em que a eotaxina está operacionalmente ligada a lumican. Em algumas concretizações, a eotaxina está operacionalmente ligada a lumican com albumina. Em algumas concretizações, a eotaxina está operacionalmente ligada ao N-terminal de lumican. Em algumas concretizações, a eotaxina está operacionalmente ligada ao C-terminal de lumican.

[0426] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência de eotaxina humana estabelecida em SEQ ID NO:38 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida em SEQ ID NO:107. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência de eotaxina humana estabelecida na SEQ ID NO:38 operacionalmente ligada à sequência lumican humana estabelecida na SEQ ID NO:107 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada a partir de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO:43.

[0427] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende eotaxina e LAIR-1, em que a eotaxina está operacionalmente ligada a LAIR-1. Em algumas concretizações, a eotaxina está operacionalmente ligada a LAIR-1 com albumina. Em algumas concretizações, a eotaxina está operacionalmente ligada ao N-terminal de LAIR-1. Em algumas concretizações, a eotaxina está operacionalmente ligada ao C-terminal de LAIR-1.

[0428] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende a sequência de eotaxina humana

estabelecida em SEQ ID NO: 38 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida em SEQ ID NO: 98. Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende o humano Sequência de eotaxina estabelecida em SEQ ID NO: 38 operacionalmente ligada à sequência LAIR-1 humana estabelecida em SEQ ID NO: 98 com uma sequência de albumina de soro humano selecionada de SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43.

G. Proteínas de fusão de anticorpos

[0429] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-CD3 e lumican, em que o anticorpo anti-CD3 está operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD3 está operacionalmente ligado ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD3 está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0430] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-CD3 e LAIR-1, em que o anticorpo anti-CD3 está operacionalmente ligado a LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD3 está operacionalmente ligado ao N-terminal de LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD3 está operacionalmente ligado ao C-terminal de LAIR-1.

[0431] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-4-1-BB e lumican, em que o anticorpo anti-4-1-BB está operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-4-1-BB está operacionalmente ligado ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-4-1-BB está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0432] Em algumas concretizações, a proteína de fusão

imunomoduladora compreende um anticorpo anti-4-1-BB e LAIR-1, em que o anticorpo anti-4-1-BB está operacionalmente ligado a LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-4-1-BB está operacionalmente ligado ao terminal N de LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-4-1-BB está operacionalmente ligado ao C-terminal de LAIR-1.

[0433] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-CD40 e lumican, em que o anticorpo anti-CD40 está operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD40 está operacionalmente ligado ao N-terminal de lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD40 está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0434] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-CD40 e LAIR-1, em que o anticorpo anti-CD40 está operacionalmente ligado a LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD40 está operacionalmente ligado ao N-terminal de LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-CD40 está operacionalmente ligado ao C-terminal de LAIR-1.

[0435] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-OX40 e lumican, em que o anticorpo anti-OX40 está operacionalmente ligado a lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-OX40 está operacionalmente ligado ao terminal N de lumican. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-OX40 está operacionalmente ligado ao C-terminal de lumican.

[0436] Em algumas concretizações, a proteína de fusão imunomoduladora compreende um anticorpo anti-OX40 e LAIR-1, em que o anticorpo anti-OX40 está operacionalmente ligado a

LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-OX40 está operacionalmente ligado ao N-terminal de LAIR-1. Em algumas concretizações, o anticorpo anti-OX40 está operacionalmente ligado ao C-terminal de LAIR-1.

V. Métodos para fazer proteínas de fusão imunomoduladoras

[0437] Em alguns aspectos, os polipeptídeos aqui descritos (por exemplo, domínios de ligação de colágeno, citocinas, anticorpos) são feitos em células hospedeiras transformadas usando técnicas de DNA recombinante. Para isso, é preparada uma molécula de DNA recombinante que codifica o peptídeo. Os métodos de preparação de tais moléculas de DNA são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, as sequências que codificam para os peptídeos podem ser excisadas do DNA utilizando enzimas de restrição adequadas. Alternativamente, a molécula de DNA pode ser sintetizada usando técnicas de síntese química, como o método do fosforamidato. Além disso, uma combinação dessas técnicas pode ser usada.

[0438] Os métodos de preparação de polipeptídeos também incluem um vetor capaz de expressar os peptídeos em um hospedeiro apropriado. O vetor compreende a molécula de DNA que codifica os peptídeos operativamente ligados a sequências de controle de expressão apropriadas. Os métodos para afetar esta ligação operativa, antes ou depois da molécula de DNA ser inserida no vetor, são bem conhecidos. As sequências de controle de expressão incluem promotores, ativadores, intensificadores, operadores, domínios de nucleose ribossomal, sinais de início, sinais de parada, sinais de cap, sinais de poliadenilação e outros sinais envolvidos com o controle da transcrição ou tradução.

[0439] O vector resultante com a molécula de DNA é usado

para transformar um hospedeiro apropriado. Esta transformação pode ser realizada usando métodos bem conhecidos na técnica.

[0440] Qualquer uma de um grande número de células hospedeiras disponíveis e bem conhecidas pode ser adequada para uso nos métodos aqui divulgados. A seleção de um determinado hospedeiro depende de uma série de fatores reconhecidos pela técnica. Estes incluem, por exemplo, compatibilidade com o vetor de expressão escolhido, toxicidade dos peptídeos codificados pela molécula de DNA, taxa de transformação, facilidade de recuperação dos peptídeos, características de expressão, biossegurança e custos. Um equilíbrio desses fatores deve ser alcançado com o entendimento de que nem todos os hospedeiros podem ser igualmente eficazes para a expressão de uma sequência de DNA particular. Dentro dessas diretrizes gerais, hospedeiros microbianos úteis incluem bactérias (como *E. coli* sp.), Leveduras (como *Saccharomyces* sp.) E outros fungos, insetos, plantas, células de mamíferos (incluindo humanos) em cultura ou outros hospedeiros conhecidos em a arte.

[0441] Em seguida, o hospedeiro transformado é cultivado e purificado. As células hospedeiras podem ser cultivadas sob condições convencionais de fermentação de modo que os compostos desejados sejam expressos. Tais condições de fermentação são bem conhecidas na técnica. Finalmente, os peptídeos são purificados da cultura por métodos bem conhecidos na técnica.

[0442] Os compostos também podem ser preparados por métodos sintéticos. Por exemplo, podem ser utilizadas técnicas de síntese em fase sólida. As técnicas adequadas são bem conhecidas na arte e incluem as descritas em Merrifield

(1973), Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis e Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis et al. (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart e Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; Patente U.S. No. 3.941.763; Finn et al. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 105-253; e Erickson et al. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 257-527. A síntese em fase sólida é a técnica preferida para fazer peptídeos individuais, uma vez que é o método mais eficaz em termos de custos de fazer pequenos peptídeos. Os compostos que contêm peptídeos derivados ou que contêm grupos não peptídicos podem ser sintetizados por técnicas de química orgânica bem conhecidas.

[0443] Outros métodos são de expressão/síntese de moléculas são geralmente conhecidos na técnica por aqueles versados na técnica.

[0444] As moléculas de ácido nucleico descritas acima podem estar contidas em um vetor que é capaz de direcionar sua expressão, por exemplo, em uma célula que foi transduzida com o vetor. Consequentemente, além de mutantes polipeptídicos, os vetores de expressão contendo uma molécula de ácido nucleico que codifica um mutante e células transfectadas com esses vetores estão entre as certas concretizações.

[0445] Os vetores adequados para uso incluem vetores baseados em T7 para uso em bactérias (ver, por exemplo, Rosenberg et al., Gene 56: 125, 1987), o vetor de expressão pMSXND para uso em células de mamíferos (Lee e Nathans, J. Biol. Chem. 263:3521, 1988) e vetores derivados de baculovírus (por exemplo, o vetor de expressão pBacPAKS de Clontech, Palo Alto, Calif.) Para uso em células de inseto. As inserções de ácido nucleico, que codificam o polipeptídeo

de interesse em tais vetores, podem ser operativamente ligadas a um promotor, que é selecionado com base, por exemplo, no tipo de célula em que a expressão é procurada. Por exemplo, um promotor T7 pode ser usado em bactérias, um promotor poliedrina pode ser usado em células de inseto e um promotor de citomegalovírus ou metalotioneína pode ser usado em células de mamíferos. Além disso, no caso de eucariotos superiores, promotores específicos de tecido e específicos de tipo de célula estão amplamente disponíveis. Esses promotores são assim denominados por sua capacidade de dirigir a expressão de uma molécula de ácido nucleico em um determinado tecido ou tipo de célula dentro do corpo. Os artesãos qualificados estão bem cientes dos vários promotores e outros elementos reguladores que podem ser usados para dirigir a expressão de ácidos nucleicos.

[0446] Além das sequências que facilitam a transcrição da molécula de ácido nucleico inserida, os vetores podem conter origens de replicação e outros genes que codificam um marcador selecionável. Por exemplo, o gene de resistência à neomicina (neor) confere resistência G418 às células nas quais é expresso e, assim, permite a seleção fenotípica das células transfectadas. Os versados na técnica podem facilmente determinar se um determinado elemento regulador ou marcador selecionável é adequado para uso em um contexto experimental particular.

[0447] Os vetores virais que são adequados para uso incluem, por exemplo, vetores retrovirais, adenovirais e adeno-associados, vírus herpes, vírus símio 40 (SV40) e vetores de vírus do papiloma bovino (ver, por exemplo, Gluzman (Ed.), Eukaryotic Viral Vectors, CSH Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, NY).

[0448] As células procarióticas ou eucarióticas que contêm e expressam uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo mutante também são adequadas para uso. Uma célula é uma célula transfectada, i.e., uma célula na qual uma molécula de ácido nucleico, por exemplo uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo mutante, foi introduzida por meio de técnicas de DNA recombinante. A progênie de tal célula também é considerada adequada para uso nos métodos aqui divulgados.

[0449] Os componentes precisos do sistema de expressão não são críticos. Por exemplo, um polipeptídeo mutante pode ser produzido em um hospedeiro procariótico, como a bactéria *E. coli*, ou em um hospedeiro eucariótico, como uma célula de inseto (por exemplo, uma célula Sf21) ou células de mamíferos (por exemplo, células COS, Células NIH 3T3 ou células HeLa). Estas células estão disponíveis em muitas fontes, incluindo a American Type Culture Collection (Manassas, Va.). Ao selecionar um sistema de expressão, importa apenas que os componentes sejam compatíveis entre si. Artesãos ou habilidade comum são capazes de fazer tal determinação. Além disso, se a orientação for necessária na seleção de um sistema de expressão, os especialistas podem consultar Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1993) e Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 Suppl. 1987).

[0450] Os polipeptídeos expressos podem ser purificados a partir do sistema de expressão usando procedimentos bioquímicos de rotina e podem ser usados, por exemplo, como agentes terapêuticos, conforme descrito neste documento.

Composições farmacêuticas e modos de administração

[0451] Em certas concretizações, a divulgação fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão imunomoduladora com um diluente, transportador, solubilizante, emulsificante, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

[0452] Em certas concretizações, os materiais de formulação aceitáveis preferencialmente não são tóxicos para os destinatários nas dosagens e concentrações utilizadas. Em certas concretizações, o (s) material (is) de formulação são para s.c. e/ou I.V. administração. Em certas concretizações, o (s) material (is) de formulação são para administração local, por exemplo, administração intratumoral. Em certas concretizações, a composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou preservar, por exemplo, o pH, osmolalidade, viscosidade, clareza, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração de a composição. Em certas concretizações, os materiais de formulação adequados incluem, mas não estão limitados a, aminoácidos (tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tais como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogenossulfito de sódio); tampões (tais como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos); agentes de volume (tais como manitol ou glicina); agentes quelantes (tais como ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)); agentes complexantes (tais como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); enchimentos; monossacarídeos; dissacarídeos; e outros

carboidratos (como glicose, manose ou dextrinas); proteínas (tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas); agentes corantes, aromatizantes e diluentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tais como polivinilpirrolidona); polipeptídeos de baixo peso molecular; contra-íons formadores de sal (como sódio); conservantes (tais como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, cloro-hexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio); solventes (tais como glicerina, propilenoglicol ou polietilenoglicol); álcoois de açúcar (tais como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; surfactantes ou agentes molhantes (tais como plurônicos, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbato tais como polissorbato 20, polissorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes de aumento da estabilidade (tais como sacarose ou sorbitol); agentes de aumento da tonicidade (tais como halogenetos de metal alcalino, preferencialmente cloreto de sódio ou potássio, manitol sorbitol); veículos de entrega; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, AR Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995). Em certas concretizações, a formulação compreende PBS; 20 mM NaOAC, pH 5,2, 50 mM NaCl; e/ou 10 mM NAOAC, pH 5,2 , 9% de sacarose. Em certas concretizações, a composição farmacêutica ideal será determinada por um versado na técnica dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de entrega e dosagem desejada. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, supra . Em certas concretizações, tais composições podem influenciar o estado físico,

estabilidade, taxa de liberação in vivo e taxa de depuração in vivo da proteína de fusão imunomoduladora.

[0453] Em algumas concretizações, as formulações que compreendem uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descritas são de 40C a 370C quando administradas a um sujeito.

[0454] Em certas concretizações, o veículo ou transportador primário em uma composição farmacêutica pode ser de natureza aquosa ou não aquosa. Por exemplo, em certas concretizações, um veículo ou transportador adequado pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebrospinal artificial, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Em certas concretizações, a solução salina compreende solução salina tamponada com fosfato isotônico. Em certas concretizações, solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica são outros veículos exemplares. Em certas concretizações, as composições farmacêuticas compreendem tampão Tris de cerca de pH 7,0-8,5, ou tampão acetato de cerca de pH 4,0-5,5, que pode incluir ainda sorbitol ou um substituto adequado. Em certas concretizações, uma composição que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora é preparada para armazenamento misturando a composição selecionada com o grau de pureza desejado com agentes de formulação opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences, supra) na forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Além disso, em certas concretizações, uma composição que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora é formulada como um liofilizado usando excipientes apropriados, como sacarose.

[0455] Em certas concretizações, a composição farmacêutica é selecionada para entrega parenteral. Em certas concretizações, as composições são selecionadas para inalação ou para entrega através do trato digestivo, como por via oral. A preparação de tais composições farmacêuticamente aceitáveis está dentro da capacidade de um especialista na técnica.

[0456] Em certas concretizações, os componentes da formulação estão presentes em concentrações que são aceitáveis para o local de administração. Em certas concretizações, os tampões são usados para manter a composição em pH fisiológico ou em um pH ligeiramente mais baixo, tipicamente dentro de uma faixa de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

[0457] Em certas concretizações, quando a administração parenteral é contemplada, uma composição terapêutica está na forma de uma solução aquosa livre de pirogênio, parenteralmente aceitável, compreendendo uma proteína de fusão imunomoduladora, em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em certas concretizações, um veículo para injeção parenteral é água destilada estéril na qual a proteína de fusão imunomoduladora é formulada como uma solução isotônica estéril, devidamente preservada. Em certas concretizações, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, como microesferas injetáveis, partículas bioerodíveis, compostos poliméricos (como ácido polilático ou ácido poliglicólico), grânulos ou lipossomas, que podem fornecer para o controle ou liberação sustentada do produto que pode então ser entregue por meio de uma injeção de depósito. Em certas concretizações, o ácido hialurônico

também pode ser usado e pode ter o efeito de promover a duração sustentada na circulação. Em certas concretizações, dispositivos implantáveis de distribuição de drogas podem ser usados para introduzir a molécula desejada.

[0458] Em certas concretizações, uma composição farmacêutica é formulada para inalação. Em certas concretizações, uma proteína de fusão imunomoduladora é formulada como um pó seco para inalação. Em certas concretizações, uma solução para inalação compreendendo uma proteína de fusão imunomoduladora é formulada com um propelente para entrega em aerossol. Em certas concretizações, as soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar é ainda descrita no pedido PCT No. PCT/US94/001875, que descreve a distribuição pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

[0459] Em certas concretizações, é contemplado que as formulações sejam administradas por via oral. Em certas concretizações, uma proteína de fusão imunomoduladora administrada desta forma é formulada com ou sem os transportadores habitualmente usados na composição de formas de dosagem sólidas, como comprimidos e cápsulas. Em certas concretizações, uma cápsula é projetada para liberar a porção ativa da formulação no ponto no trato gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistêmica é minimizada. Em certas concretizações, pelo menos um agente adicional é incluído para facilitar a absorção da proteína de fusão imunomoduladora. Em certas concretizações, diluentes, aromatizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes desintegrantes de comprimidos e ligantes também podem ser

empregados.

[0460] Em certas concretizações, uma composição farmacêutica compreende uma quantidade eficaz de proteína de fusão imunomoduladora em uma mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para a fabricação de comprimidos. Em certas concretizações, ao dissolver os comprimidos em água estéril, ou outro veículo apropriado, as soluções são preparadas na forma de dose unitária. Em certas concretizações, os excipientes adequados incluem, mas não estão limitados a, diluentes inertes, como carbonato de cálcio, carbonato de sódio ou bicarbonato, lactose ou fosfato de cálcio; ou agentes de ligação, tais como amido, gelatina ou acácia; ou agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

[0461] Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para aqueles versados na técnica, incluindo formulações envolvendo uma proteína de fusão imunomoduladora, em formulações de entrega sustentada ou controlada. Em certas concretizações, as técnicas para formular uma variedade de outros meios de entrega sustentada ou controlada, como transportadores de lipossomas, micropartículas bioerodíveis ou grânulos porosos e injeções de depósito, também são conhecidas pelos versados na técnica. Ver, por exemplo, o Pedido PCT No. PCT/US93/00829 que descreve a liberação controlada de micropartículas poliméricas porosas para a distribuição de composições farmacêuticas. Em certas concretizações, as preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada podem incluir poliésteres,

hidrogéis, polilactídeos (Patente US 3.773.919 e EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) e Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)), acetato de etileno vinil (Langer et al., supra) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). Em certas concretizações, as composições de liberação sustentada incluem lipossomas, que podem ser preparados por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Eppstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); EP 036.676; EP 088.046 e EP 143.949.

[0462] A composição farmacêutica a ser usada para administração *in vivo* é tipicamente estéril. Em certas concretizações, isso é realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis. Em certas concretizações, onde a composição é liofilizada, a esterilização usando este método é conduzida antes ou após a liofilização e reconstituição. Em certas concretizações, a composição para administração parenteral pode ser armazenada na forma liofilizada ou em uma solução. Em certas concretizações, as composições parenterais geralmente são colocadas em um recipiente com uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa com uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[0463] Em certas concretizações, uma vez que a composição farmacêutica foi formulada, ela pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado. Em certas concretizações, tais formulações podem ser armazenadas em uma

forma pronta para uso ou em uma forma (por exemplo, liofilizada) que é reconstituída antes da administração.

[0464] Em certas concretizações, kits são fornecidos para a produção de uma unidade de administração de dose única. Em certas concretizações, o kit pode conter um primeiro recipiente com uma proteína seca e um segundo recipiente com uma formulação aquosa. Em certas concretizações, kits contendo seringas pré-cheias de uma ou várias câmaras (por exemplo, seringas líquidas e liosseringas) estão incluídos.

[0465] Em certas concretizações, a quantidade eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo proteína de fusão imunomoduladora a ser empregada terapeuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e objetivos terapêuticos. Um versado na técnica apreciará que os níveis de dosagem apropriados para o tratamento, de acordo com certas concretizações, irão, assim, variar dependendo, em parte, da molécula distribuída, da indicação para a qual a proteína de fusão imunomoduladora está sendo usada, a via de administração, e o tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e/ou condição (idade e estado geral de saúde) do paciente. Em certas concretizações, o médico pode titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o efeito terapêutico ideal.

[0466] Em certas concretizações, a frequência de dosagem levará em consideração os parâmetros farmacocinéticos da proteína de fusão imunomoduladora na formulação usada. Em certas concretizações, um clínico irá administrar a composição até que uma dosagem seja atingida que alcance o efeito desejado. Em certas concretizações, a composição pode, portanto, ser administrada como uma dose única, ou como duas

ou mais doses (que podem ou não conter a mesma quantidade da molécula desejada) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua por meio de um dispositivo de implantação ou cateter. O refinamento adicional da dosagem apropriada é rotineiramente feito por aqueles versados na técnica e está dentro do âmbito das tarefas rotineiramente realizadas por eles. Em certas concretizações, as dosagens apropriadas podem ser verificadas através do uso de dados de dose-resposta apropriados.

[0467] Em certas concretizações, a via de administração da composição farmacêutica está de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, por via oral, por meio de injeção por via intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, subcutânea, intraocular, intra-arterial, intraportal ou intralesional; por sistemas de liberação sustentada ou por dispositivos de implantação. Em certas concretizações, as composições podem ser administradas por injeção em bolus ou continuamente por infusão ou por dispositivo de implantação. Em certas concretizações, os elementos individuais da terapia de combinação podem ser administrados por diferentes vias.

[0468] Em certas concretizações, a composição pode ser administrada localmente por meio da implantação de uma membrana, esponja ou outro material apropriado no qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Em certas concretizações, onde um dispositivo de implantação é usado, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequado e a entrega da molécula desejada pode ser por difusão, bolus de liberação programada ou administração

contínua. Em certas concretizações, pode ser desejável usar uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão imunomoduladora de uma maneira ex vivo. Em tais casos, células, tecidos e/ou órgãos que foram removidos do paciente são expostos a uma composição farmacêutica que compreende a proteína de fusão imunomoduladora após a qual as células, tecidos e/ou órgãos são subsequentemente implantados de volta no paciente.

[0469] Em certas concretizações, uma proteína de fusão imunomoduladora é distribuída através da implantação de certas células que foram geneticamente modificadas, usando métodos como os descritos neste documento, para expressar e secretar os polipeptídeos. Em certas concretizações, essas células podem ser células animais ou humanas e podem ser autólogas, heterólogas ou xenogênicas. Em certas concretizações, as células podem ser imortalizadas. Em certas concretizações, a fim de diminuir a chance de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar a infiltração de tecidos circundantes. Em certas concretizações, os materiais de encapsulamento são tipicamente biocompatíveis, invólucros poliméricos semipermeáveis ou membranas que permitem a liberação do (s) produto (s) de proteína, mas evitam a destruição das células pelo sistema imunológico do paciente ou por outros fatores prejudiciais dos tecidos circundantes.

Métodos de tratamento

[0470] As proteínas de fusão imunomoduladoras e/ou ácidos nucleicos que os expressam, aqui descritos, são úteis para o tratamento de um distúrbio associado a apoptose anormal ou um processo diferenciativo (por exemplo, distúrbios

proliferativos celulares (por exemplo, distúrbios hiperproliferativos) ou distúrbios diferenciadores celulares, como câncer). Exemplos não limitativos de cânceres que são passíveis de tratamento com os métodos da presente divulgação são descritos abaixo.

[0471] Exemplos de distúrbios proliferativos e/ou diferenciativos celulares incluem câncer (por exemplo, carcinoma, sarcoma, distúrbios metastáticos ou distúrbios neoplásicos hematopoiéticos, por exemplo, leucemias). Um tumor metastático pode surgir de uma variedade de tipos de tumor primário, incluindo, mas não se limitando aos da próstata, cólon, pulmão, mama e fígado. Consequentemente, as composições aqui utilizadas, compreendendo, por exemplo, proteína de fusão imunomoduladora, podem ser administradas a um paciente com câncer.

[0472] Tal como aqui utilizado, os termos "câncer" (ou "canceroso"), "hiperproliferativo" e "neoplásico" referem-se a células com capacidade de crescimento autônomo (ou seja, um estado ou condição anormal caracterizada por crescimento celular em proliferação rápida). Os estados de doença hiperproliferativos e neoplásicos podem ser categorizados como patológicos (isto é, caracterizando ou constituindo um estado de doença), ou podem ser categorizados como não patológicos (isto é, como um desvio do normal, mas não associado a um estado de doença). Os termos pretendem incluir todos os tipos de crescimentos cancerosos ou processos oncogênicos, tecidos metastáticos ou células, tecidos ou órgãos transformados de forma maligna, independentemente do tipo histopatológico ou estágio de invasão. As células "hiperproliferativas patológicas" ocorrem em estados de

doença caracterizados por crescimento de tumor maligno. Exemplos de células hiperproliferativas não patológicas incluem a proliferação de células associadas ao reparo de feridas.

[0473] Os termos "câncer" ou "neoplasma" são usados para se referir a doenças malignas dos vários sistemas de órgãos, incluindo aqueles que afetam o pulmão, mama, tireóide, gânglios linfáticos e tecido linfóide, órgãos gastrointestinais e o trato geniturinário, bem como adenocarcinomas que são geralmente considerados como incluindo doenças malignas, como a maioria dos cânceres de cólon, carcinoma de células renais, câncer de próstata e/ou tumores testiculares, carcinoma de células não pequenas do pulmão, câncer do intestino delgado e câncer do esôfago.

[0474] O termo "carcinoma" é reconhecido na técnica e refere-se a doenças malignas de tecidos epiteliais ou endócrinos, incluindo carcinomas do sistema respiratório, carcinomas do sistema gastrointestinal, carcinomas do sistema geniturinário, carcinomas testiculares, carcinomas da mama, carcinomas prostáticos, carcinomas do sistema endócrino e melanomas. As proteínas de fusão imunomoduladoras podem ser usadas para tratar pacientes que têm, que são suspeitos de ter, ou que podem estar em alto risco de desenvolver qualquer tipo de câncer, incluindo carcinoma renal ou melanoma, ou qualquer doença viral. Os carcinomas exemplares incluem aqueles que se formam a partir de tecido do colo do útero, pulmão, próstata, mama, cabeça e pescoço, cólon e ovário. O termo também inclui carcinossarcomas, que incluem tumores malignos compostos de tecidos carcinomatosos e sarcomatosos. Um "adenocarcinoma" refere-se a um carcinoma derivado de

tecido glandular ou no qual as células tumorais formam estruturas glandulares reconhecíveis.

[0475] Exemplos adicionais de distúrbios proliferativos incluem distúrbios neoplásicos hematopoiéticos. Tal como aqui utilizado, o termo "distúrbios neoplásicos hematopoiéticos" inclui doenças envolvendo células hiperplásicas/neoplásicas de origem hematopoiética, por exemplo, surgindo de linhagens mielóides, linfóides ou eritróides, ou células precursoras das mesmas. De preferência, as doenças surgem de leucemias agudas pouco diferenciadas (por exemplo, leucemia eritroblástica e leucemia megacarioblástica aguda). Desordens mieloides exemplares adicionais incluem, mas não estão limitados a, leucemia promielóide aguda (APML), leucemia mielóide aguda (AML) e leucemia mielóide crônica (CML) (revisado em Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. em Oncol./ Hemotol. 11: 267-97); malignidades linfóides incluem, mas não estão limitadas a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que inclui LLA de linhagem B e LLA de linhagem T, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) e macro globulinemia de Waldenstrom (WM). Formas adicionais de linfomas malignos incluem, mas não estão limitados a linfoma não-Hodgkin e suas variantes, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma cutâneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), Doença de Hodgkin e doença de Reed-Sternberg.

[0476] Será apreciado por aqueles versados na técnica que as quantidades de uma proteína de fusão imunomoduladora suficiente para reduzir o crescimento e tamanho do tumor, ou uma quantidade terapeuticamente eficaz, irão variar não

apenas nos compostos ou composições particulares selecionados, mas também com a via de administração, a natureza da condição a ser tratada e a idade e condição do paciente e, em última análise, ficará a critério do médico ou farmacêutico do paciente. O período de tempo durante o qual os compostos usados no presente método serão fornecidos varia numa base individual.

[0477] Será apreciado por aqueles versados na técnica que o modelo de melanoma B16 usado aqui é um modelo generalizado para tumores sólidos. Ou seja, a eficácia dos tratamentos neste modelo também é preditiva da eficácia dos tratamentos em outros tumores sólidos não melanoma. Por exemplo, conforme descrito em Baird et al. (J Immunology 2013; 190: 469-78; Epub 7 de dezembro de 2012), a eficácia de cps, uma cepa de parasita que induz uma resposta imune adaptativa, na mediação da imunidade antitumoral contra tumores B16F10 foi considerada generalizável para outros tumores sólidos, incluindo modelos de carcinoma de pulmão e câncer de ovário. Em outro exemplo, os resultados de uma linha de pesquisa em linfócitos direcionados a VEGF também mostram que os resultados em tumores B16F10 eram generalizáveis para os outros tipos de tumor estudados (Chinnasamy et al., JCI 2010; 120: 3953-68; Chinnasamy et al., Clinnasamy et al., Clinnasamy et al., Cancer Res 2012; 18: 1672-83). Em ainda outro exemplo, a imunoterapia envolvendo LAG-3 e PD-1 levou a carga tumoral reduzida, com resultados generalizáveis em linhas de células de fibrossarcoma e adenocarcinoma do cólon (Woo et al., Cancer Res 2012; 72: 917-27).

[0478] Em certas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas são usadas para tratar o

câncer. Em certas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras divulgadas neste documento são usadas para tratar melanoma, leucemia, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de cólon e câncer de cérebro.

[0479] Em certas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas inibem o crescimento e/ou proliferação de células tumorais. Em certas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas reduzem o tamanho do tumor. Em certas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui divulgadas inibem as metástases de um tumor primário.

[0480] Será apreciado por aqueles versados na técnica que a referência aqui ao tratamento se estende à profilaxia, bem como ao tratamento dos cânceres e sintomas observados.

Terapia combinada

[0481] Em algumas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras são usadas em combinação com outras terapias. Por exemplo, em algumas concretizações, as proteínas de fusão imunomoduladoras são usadas em combinação com outra imunoterapia. Imunoterapias exemplares incluem, mas não estão limitadas a, terapia de células T do receptor de antígeno quimérico (CAR), anticorpos de direcionamento de antígeno associado a tumor, inibidores de ponto de controle imunológico e vacinas contra o câncer.

I. Células efetoras do receptor de antígeno quimérico (CAR)

[0482] Em alguns aspectos, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras a serem utilizadas ou realizadas em conjunto com terapia de células efetoras de receptor de antígeno quimérico (CAR) (por exemplo, células T CAR).

[0483] Receptores de antígenos quiméricos (CARs) são receptores transmembrana artificiais geneticamente modificados, que conferem uma especificidade arbitrária para um ligante em uma célula efetora imune (por exemplo, uma célula T, célula assassina natural ou outra célula imune) e que resulta na ativação do efector célula após reconhecimento e ligação ao ligando. Normalmente, esses receptores são usados para transmitir a especificidade do antígeno de um anticorpo monoclonal para uma célula T.

[0484] Em algumas concretizações, os CARs contêm três domínios: 1) um ectodomínio tipicamente compreendendo um peptídeo de sinal, um ligante ou região de reconhecimento de antígeno (por exemplo, scFv) e um espaçador flexível; 2) um domínio transmembranar (TM); 3) um endodomínio (alternativamente conhecido como um "domínio de ativação") tipicamente compreendendo um ou mais domínios de sinalização intracelular. O ectodomínio do CAR reside fora da célula e é exposto ao espaço extracelular, por meio do qual é acessível para interação com seu ligante cognato. O domínio TM permite que o CAR seja ancorado na membrana celular da célula efetora. O terceiro endodomínio (também conhecido como "domínio de ativação") auxilia na ativação da célula efetora após a ligação do CAR ao seu ligante específico. Em algumas concretizações, a ativação da célula efetora compreende a indução da produção de citocinas e quimiocinas, bem como a ativação da atividade citolítica das células. Em algumas concretizações, os CARs redirecionam a citotoxicidade para as células tumorais.

[0485] Em algumas concretizações, os CARs compreendem um domínio de reconhecimento específico de ligante ou antígeno

que se liga a um ligante ou antígeno alvo específico (também referido como um domínio de ligação). Em algumas concretizações, o domínio de ligação é um fragmento variável de anticorpo de cadeia única (scFv), um ligante amarrado ou o domínio extracelular de um co-receptor, fundido a um domínio de transmembrana, que está ligado, por sua vez, a um domínio de sinalização. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização é derivado de CD3ζ ou FcRγ. Em algumas concretizações, o CAR compreende um ou mais domínios coestimuladores derivados de uma proteína, como CD28, CD137 (também conhecido como 4-1BB), CD134 (também conhecido como OX40) e CD278 (também conhecido como ICOS).

[0486] O envolvimento do domínio de ligação ao antígeno do CAR com seu antígeno alvo na superfície de uma célula alvo resulta no agrupamento do CAR e entrega um estímulo de ativação para a célula que contém o CAR. Em algumas concretizações, a principal característica dos CARs é sua capacidade de redirecionar a especificidade das células efetoras imunológicas, desencadeando assim a proliferação, produção de citocinas, fagocitose ou produção de moléculas que podem mediar a morte celular do antígeno alvo que expressa a célula em uma histocompatibilidade principal (MHC) independente maneira, explorando as habilidades de direcionamento específico da célula de anticorpos monoclonais, ligantes solúveis ou co-receptores específicos da célula. Embora CARs baseados em scFv projetados para conter um domínio de sinalização de CD3ζ ou FcRγ tenham mostrado entregar um sinal potente para a ativação de células T e função efetora, eles não são suficientes para eliciar sinais que promovem a sobrevivência e expansão de células T

na ausência de um sinal coestimulatório concomitante. Uma nova geração de CARs contendo um domínio de ligação, uma dobradiça, uma transmembrana e o domínio de sinalização derivado de CD3 ζ ou FcR γ juntamente com um ou mais domínios de sinalização co-estimuladores (por exemplo, domínios co-estimuladores intracelulares derivados de CD28, CD137, CD134 e CD278) demonstrou direcionar mais eficazmente a atividade antitumoral, bem como aumento da secreção de citocinas, atividade lítica, sobrevivência e proliferação em células T expressando CAR *in vitro*, em modelos animais e pacientes com câncer (Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106: 3360-3365).

[0487] Em algumas concretizações, células efetoras que expressam receptor de antígeno quimérico (por exemplo, células CAR-T) são células que são derivadas de um paciente com uma doença ou condição e geneticamente modificadas *in vitro* para expressar pelo menos um CAR com uma especificidade arbitrária para um ligante. As células realizam pelo menos uma função efetora (por exemplo, indução de citocinas) que é estimulada ou induzida pela ligação específica do ligante ao CAR e que é útil para o tratamento da mesma doença ou condição do paciente. As células efetoras podem ser células T (por exemplo, células T citotóxicas ou células T auxiliares). Um versado na técnica entenderia que outros tipos de células (por exemplo, uma célula assassina natural ou uma célula-tronco) podem expressar CARs e que uma célula efetora do receptor de antígeno quimérico pode compreender uma célula efetora diferente de uma célula T. Em algumas concretizações, a célula efetora é uma célula T (por exemplo, uma célula T

citotóxica) que exerce sua função efetora (por exemplo, uma resposta de célula T citotóxica) em uma célula alvo quando colocada em contato ou próxima ao alvo ou célula alvo (por exemplo, uma célula cancerosa) (ver, por exemplo, Chang e Chen (2017) Trends Mol Med 23 (5): 430-450).

[0488] A exposição prolongada de células T ao seu antígeno cognato pode resultar na exaustão das funções efetoras, permitindo a persistência de células infectadas ou transformadas. Estratégias recentemente desenvolvidas para estimular ou rejuvenescer a função efetora do hospedeiro usando agentes que induzem um bloqueio de ponto de verificação imunológico resultaram em sucesso no tratamento de vários tipos de câncer. Evidências emergentes sugerem que a exaustão de células T também pode representar um impedimento significativo na sustentação da atividade antitumoral de longa duração por células T que expressam receptor de antígeno quimérico (células CAR-T. Em algumas concretizações, o status de diferenciação das células T colhidas pelo paciente antes de A transdução de CAR e o regime de condicionamento que um paciente passa antes de reintroduzir as células CAR-T (por exemplo, adição ou exclusão de agentes alquilantes, fludarabina, irradiação corporal total) podem afetar profundamente a persistência e o potencial citotóxico das células CAR-T. Cultura in vitro condições que estimulam (via células anti-CD3/CD28 ou estimuladoras) e expandem (via citocinas, como IL-2) populações de células T também podem alterar o status de diferenciação e a função efetora das células CAR-T (Ghoneim et al., (2016) Trends in Molecular Medicine 22 (12):1000-1011).

[0489] Em algumas concretizações, em particular para o tratamento de ALL e/ou NHL, os CARs adequados têm como alvo o CD19 ou CD20. Exemplos não limitativos incluem CARs compreendendo uma estrutura: (i) um scFv anti-CD19, um domínio H/TM CD8, um domínio CS 4-1BB e um domínio de sinalização TCR CD3 ζ ; (ii) um scFv anti-CD19, um domínio de dobradiça e transmembrana de CD28, um domínio coestimulador de CD28 e um domínio de sinalização de TCR CD3 ζ ; e (iii) um scFv anti-CD20, uma dobradiça de IgG e um domínio transmembranar, um domínio co-estimulador CD28/4-1BB e um domínio de sinalização de TCR CD3 ζ . Em algumas concretizações, uma célula efetora CAR adequada para combinação com as combinações e métodos aqui divulgados tem como alvo CD19 ou CD20 incluindo, mas não se limitando a Kymriah™ (tisagenlecleucel; Novartis; anteriormente CTL019) e Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel; Kite Pharma).

A. Células CAR T redirecionadas

[0490] Em algumas concretizações, a terapia CAR-T adequada para uso em combinação com as proteínas de fusão imunomoduladoras é uma célula CAR-T redirecionada. Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) modificadas para expressar um CAR que se liga a um receptor imune universal, uma etiqueta, um switch ou uma região Fc em uma imunoglobulina são adequadas para os métodos aqui descritos.

[0491] Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) são modificadas para expressar um receptor imunológico universal ou UnivIR. Um tipo de UnivIR é um receptor imune de ligação à biotina (BBIR) (ver por exemplo, Publicação de Patente US20140234348 A1 aqui

incorporada por referência em sua totalidade). Outros exemplos de métodos e composições relacionados a receptores quiméricos universais e/ou células efetoras que expressam receptores quiméricos universais são descritos nos Pedidos de Patente Internacional WO2016123122A1, WO2017143094A1, WO2013074916A1, Pedido de Patente US20160348073A1, todos os quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

[0492] Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) são modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico anti-tag universal, modular (UniCAR). Este sistema permite o redirecionamento de células imunes enxertadas com UniCAR contra vários antígenos (ver, por exemplo, Publicação de Patente US20170240612 A1 aqui incorporada por referência em sua totalidade; Cartellieri et al., (2016) Blood Cancer Journal 6, e458 aqui incorporada por referência em sua totalidade).

[0493] Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) são modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico comutável e comutadores de células efetoras de antígeno quimérico (CAR-EC). Neste sistema, os interruptores CAR-EC têm uma primeira região que é ligada por um receptor de antígeno quimérico no CAR-EC e uma segunda região que se liga a uma molécula de superfície celular na célula alvo, estimulando assim uma resposta imune do CAR-EC que é citotóxico para a célula alvo ligada. Em algumas concretizações, o CAR-EC é uma célula T, em que o interruptor CAR-EC pode atuar como um "interruptor" para a atividade do CAR-EC. A atividade pode ser "desligada" reduzindo ou cessando a administração do switch. Esses interruptores CAR-EC podem ser usados com CAR-ECs divulgados

neste documento, bem como células CAR T existentes, para o tratamento de uma doença ou condição, como câncer, em que a célula alvo é uma célula maligna. Tal tratamento pode ser referido aqui como imunoterapia comutável (Publicação de Patente dos EUA US9624276 B2 incorporada aqui por referência em sua totalidade).

[0494] Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) são modificadas para expressar um receptor que se liga à porção Fc de imunoglobulinas humanas (por exemplo, CD16V-BB-ζ) (Kudo et al., (2014) Cancer Res 74 (1):93-103 aqui incorporado por referência na sua totalidade).

[0495] Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) são modificadas para expressar um receptor imune universal (por exemplo, CAR comutável, sCAR) que se liga a um neoepítipo de peptídeo (PNE). Em algumas concretizações, o neoepítipo peptídico (PNE) foi incorporado em locais diferentes definidos dentro de um anticorpo que visa um antígeno (troca de anticorpo). Portanto, a especificidade da célula T sCAR é redirecionada apenas contra PNE, não ocorrendo no proteoma humano, permitindo assim uma interação ortogonal entre a célula T sCAR e a troca de anticorpo. Desta forma, as células sCAR-T são estritamente dependentes da presença da troca de anticorpo para se tornarem totalmente ativadas, excluindo assim o reconhecimento fora do alvo de células T CAR de tecidos endógenos ou antígenos na ausência da troca de anticorpo (Arcangeli et al., (2016) Transl Cancer Res 5 (Suppl 2): S174-S177 incorporado aqui por referência na sua totalidade). Outros exemplos de CARs comutáveis são fornecidos pelo Pedido

de Patente dos EUA US20160272718A1 aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[0496] Conforme usado neste documento, o termo "etiqueta" abrange um receptor imune universal, uma etiqueta, um switch ou uma região Fc de uma imunoglobulina conforme descrito supra. Em algumas concretizações, uma célula efetora é modificada para expressar um CAR compreendendo um domínio de ligação de etiqueta. Em algumas concretizações, o CAR se liga a isotiocianato de fluoresceína (FITC), estreptavidina, biotina, dinitrofenol, complexo de proteína de clorofila peridina, proteína fluorescente verde, ficoeritrina (PE), peroxidase de rábano bravo, palmitoilação, nitrosilação, fosfatase de alcalanina ou maltose, ligação de glicose oxidase, proteína.

B. Receptores de antígeno quimérico anti-TAG (AT-CAR)

[0497] Em algumas concretizações, a terapia CAR-T adequada para uso em combinação com as proteínas de fusão imunomoduladoras é uma célula T CAR anti-tag. Existem várias limitações para a aplicação clínica generalizada de células T CAR. Por exemplo, como não há um único antígeno tumoral universalmente expresso por todos os tipos de câncer, cada scFv em um CAR precisa ser projetado com especificidade para o antígeno tumoral desejado. Além disso, os antígenos tumorais direcionados por um CAR podem ser regulados negativamente ou sofrer mutação em resposta ao tratamento, resultando na evasão do tumor.

[0498] Como alternativa, foram desenvolvidos receptores de antígenos quiméricos anti-tag universais (AT-CAR) e células CAR-T. Por exemplo, células T humanas foram projetadas para expressar um CAR de isotiocianato de anti-fluoresceína (FITC)

(referido como anti-FITC-CAR). Esta plataforma tira vantagem da interação de alta afinidade entre o scFv anti-FITC (na superfície da célula) e FITC, bem como a capacidade de conjugar moléculas FITC (ou outras marcas) a qualquer anticorpo monoclonal anticâncer, tal como cetuximabe (anti-EGFR), rituximabe (anti-CD20) e herceptina (anti-Her2).

[0499] Por conseguinte, em algumas concretizações, as células efectoras (por exemplo, células T) são modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico anti-tag universal (AT-CAR), conforme descrito pelo menos em WO 2012082841 e US20160129109A1, aqui incorporado por referência em sua totalidade. Em tais sistemas AT-CAR, as células T reconhecem e se ligam a proteínas marcadas, como anticorpos. Por exemplo, em algumas concretizações, uma célula T AT-CAR reconhece anticorpos marcados com etiqueta, como anticorpos marcados com FITC. Em algumas concretizações, um anticorpo antígeno antitumoral é conjugado a uma etiqueta (por exemplo, FITC) e administrado antes, simultaneamente ou após a terapia AT-CAR. Os anticorpos do antígeno antitumoral são conhecidos pelos versados na técnica.

[0500] Conforme indicado, a especificidade de ligação do domínio de ligação a etiqueta depende da identidade da etiqueta que é conjugada à proteína que é usada para ligar células alvo. Por exemplo, em alguns aspectos da divulgação, a etiqueta é FITC, o domínio de ligação à etiqueta é um scFv anti-FITC. Alternativamente, em alguns aspectos da divulgação, o marcador é biotina ou PE (ficoeritrina) e o domínio de ligação ao marcador é um scFv anti-biotina ou um scFv anti-PE.

[0501] Em algumas concretizações, a proteína de cada

formulação de proteínas marcadas é a mesma ou diferente e a proteína é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em alguns aspectos, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é cetuximabe (anti-EGFR), nimotuzumabe (anti-EGFR), panitumumabe (anti-EGFR), retuximabe (anti-CD20), omalizumabe (anti-CD20), tositumomabe (anti-CD20), trastuzumab (anti-Her2), gemtuzumab (anti-CD33), alemtuzumab (anti-CD52) e bevacuzimab (anti-VEGF).

[0502] Assim, em algumas concretizações, as proteínas marcadas incluem anticorpos conjugados com FITC, anticorpos conjugados com biotina, anticorpos conjugados com PE, anticorpos conjugados com histidina e anticorpos conjugados com estreptavidina, onde o anticorpo se liga a um TAA ou TSA expresso pelas células alvo . Por exemplo, as proteínas marcadas incluem, mas não estão limitadas a, cetuximabe conjugado com FITC, retuximabe conjugado com FITC, herceptina conjugada com FITC, cetuximabe conjugado com biotina, retuximabe conjugado com biotina, herceptina conjugada com biotina, cetuximabe conjugado com PE-retuximab conjugado, herceptina conjugada com PE, cetuximab conjugado com histidina, retuximab conjugado com histidina, herceptina conjugada com histidina, cetuximab conjugado com estreptavidina, retuximab conjugado com estreptavidina e herceptina conjugada com estreptavidina.

[0503] Em algumas concretizações, o AT-CAR de cada população de células T que expressam AT-CAR é o mesmo ou diferente e o AT-CAR compreende um domínio de ligação a etiqueta, um domínio transmembrana e um domínio de ativação. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao marcador é um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

Em alguns aspectos, o domínio de ligação à etiqueta se liga especificamente a FITC, biotina, PE, histidina ou estreptavidina. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao marcador é um fragmento de ligação ao antígeno e o fragmento de ligação ao antígeno é um fragmento variável de cadeia única (scFv), como um scFv que se liga especificamente a FITC, biotina, PE, histidina ou estreptavidina. Em algumas concretizações, o domínio transmembranar são as regiões de dobradiça e transmembranar da cadeia CD8 α humana. Em algumas concretizações, o domínio de ativação compreende uma ou mais da região citoplasmática de CD28, a região citoplasmática de CD137 (41BB), OX40, HVEM, CD3 ζ e FcR ϵ .

[0504] Em algumas concretizações, a etiqueta de cada formulação de proteínas marcadas é a mesma ou diferente e a etiqueta é selecionada a partir do grupo que consiste em isotiocianato de fluoresceína (FITC), estreptavidina, biotina, histidina, dinitrofenol, complexo de proteína de clorofila de peridina, proteína fluorescente verde, ficoeritrina (PE), peroxidase de rábano bravo, palmitoilação, nitrosilação, alcalanina fosfatase, glicose oxidase e proteína de ligação à maltose.

[0505] O marcador pode ser conjugado às proteínas usando técnicas como acoplamento químico e reticuladores químicos. Alternativamente, vetores polinucleotídicos podem ser preparados que codificam as proteínas marcadas como proteínas de fusão. As linhas celulares podem então ser projetadas para expressar as proteínas marcadas e as proteínas marcadas podem ser isoladas do meio de cultura, purificadas e usadas nos métodos aqui divulgados.

[0506] Em algumas concretizações, as proteínas marcadas são

administradas a um sujeito antes, ou simultaneamente ou após a administração das células T que expressam AT-CAR. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um método de tratamento de câncer em um sujeito, compreendendo: (a) administrar uma formulação de proteínas marcadas a um sujeito em necessidade de tratamento, em que as proteínas marcadas se ligam a uma célula cancerosa no sujeito, e (b) administrar uma população terapeuticamente eficaz de células T que expressam o receptor de antígeno quimérico anti-tag (AT-CAR) ao sujeito, em que as células T que expressam AT-CAR se ligam às proteínas marcadas e induzem a morte de células cancerosas, tratando assim o câncer em um assunto.

C. Células efetoras Tandem CAR (TanCAR)

[0507] Em algumas concretizações, a terapia CAR-T adequada para uso em combinação com as proteínas de fusão imunomoduladoras é uma célula efetora do CAR em tandem. Foi observado que o uso de uma abordagem CAR para o tratamento do câncer, a heterogeneidade do tumor e a imunoedição podem causar escape do tratamento CAR (Grupp et al., New Eng. J. Med (2013) 368:1509-1518). Como uma abordagem alternativa, CARs biespecíficos, conhecidos como CARs em tandem ou TanCARs, foram desenvolvidos em uma tentativa de direcionar vários marcadores específicos de câncer simultaneamente. Em um TanCAR, o domínio extracelular compreende duas especificidades de ligação ao antígeno em tandem, unidas por um ligante. As duas especificidades de ligação (scFvs) estão, portanto, ambas ligadas a uma única porção transmembranar: um scFv sendo justaposto à membrana e o outro estando em uma posição distal. Como um TanCAR exemplar, Grada et al. (Mol Ther Nucleic Acids (2013) 2, e105) descreve um TanCAR que

inclui um scFv específico para CD19, seguido por um ligante Gly-Ser e um scFv específico para HER2. O HER2-scFv estava na posição justa-membrana e o CD19-scFv na posição distal. O TanCAR mostrou induzir reatividade de células T distintas contra cada um dos dois antígenos restritos ao tumor.

[0508] Por conseguinte, alguns aspectos da divulgação se referem a um receptor de antígeno quimérico em tandem que medeia a ativação biespecífica e o direcionamento de células T. Embora a presente divulgação se refira à biespecificidade para o CAR, em alguns aspectos os CARs são capazes de visar três, quatro ou mais antígenos tumorais. O direcionamento de múltiplos antígenos usando células CAR T pode aumentar a ativação de células T e/ou compensar o escape do tumor por perda de antígeno. TanCARs também podem ter como alvo vários antígenos expressos, vários tumores usando o mesmo produto celular com uma ampla especificidade e/ou fornecer um melhor perfil de toxicidade com um CAR de sinalização menos intensa, alcançando os mesmos resultados devido à especificidade múltipla.

[0509] Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR que inclui dois domínios de direcionamento. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR multiespecífico que inclui três ou mais domínios de direcionamento. Em outra concretização, a divulgação fornece um primeiro CAR e um segundo CAR na superfície celular, cada CAR compreendendo um domínio de ligação ao antígeno, em que o domínio de ligação ao antígeno do primeiro CAR se liga a um primeiro antígeno tumoral (por exemplo, CD19, CD20, CD22, HER2) e o domínio de ligação ao antígeno do segundo CAR se liga a outro antígeno tumoral (diferente). TanCARs são

descritos em US20160303230A1 e US20170340705A1, aqui incorporados por referência.

[0510] Em algumas concretizações, o TanCAR da divulgação tem como alvo dois ou mais antígenos tumorais. Antígenos tumorais exemplares incluem um ou mais de CD19, CD20, CD22, cadeia leve k, CD30, CD33, CD123, CD38, ROR1, ErbB2, ErbB3/4, EGFR vIII, antígeno carcinoembrionário, EGP2, EGP40, mesotelina, TAG72, PSMA, Ligantes NKG2D, B7-H6, receptor IL-13 α 2, MUC1, MUC16, CA9, GD2, GD3, HMW-MAA, CD171, Lewis Y, G250/CALX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO- 1, PSC1, receptor- α de folato, CD44v7/8, 8H9, NCAM, receptores VEGF, 5T4, AchR fetal, ligantes NKG2D, CD44v6, TEM1 e/ou TEM8.

[0511] Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo CD19 e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo CD22 e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo HER2 e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo IL13R-alfa2 e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo VEGF-A e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo Tem8 e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo FAP e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo EphA2 e outro antígeno tumoral. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo

um ou mais, dois ou mais, três ou mais, ou quatro ou mais dos seguintes antígenos tumorais: CD19, CD22, HER2, IL13R-alfa2, VEGF-A, Tem8, FAP, ou EphA2, e qualquer combinação dos mesmos. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo HER2 e IL13R-alfa2. Em algumas concretizações, a divulgação fornece um TanCAR biespecífico que tem como alvo CD19 e CD22.

D. Métodos para gerar receptores de antígenos quiméricos e células efetoras de CAR

[0512] Em algumas concretizações, as células efetoras de um sujeito (por exemplo, células T) são geneticamente modificadas com um receptor de antígeno quimérico (Sadelain et al., Cancer Discov. 3:388-398, 2013). Por exemplo, uma célula efetora (por exemplo, célula T) é fornecida e um ácido nucleico recombinante que codifica um receptor de antígeno quimérico é introduzido na célula efetora derivada do paciente (por exemplo, célula T) para gerar uma célula CAR. Em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) não derivadas do sujeito são geneticamente modificadas com um receptor de antígeno quimérico. Por exemplo, em algumas concretizações, as células efetoras (por exemplo, células T) são células alogênicas que foram projetadas para serem usadas como uma terapia celular adotiva "pronta para uso", como células T do receptor de antígeno quimérico universal (UCARTs), conforme desenvolvido por Cellectis. UCARTs são células T CAR alogênicas que foram projetadas para serem usadas no tratamento do maior número de pacientes com um tipo específico de câncer. Exemplos não limitativos de UCARTs em desenvolvimento pela Cellectis incluem aqueles que têm como alvo os seguintes antígenos

tumorais: CD19, CD123, CD22, CS1 e CD38.

[0513] Uma variedade de métodos diferentes conhecidos na técnica podem ser usados para introduzir qualquer um dos ácidos nucleicos ou vetores de expressão aqui divulgados em uma célula efetora (por exemplo, célula T). Exemplos não limitativos de métodos para a introdução de ácido nucleico em uma célula efetora (por exemplo, célula T) incluem: lipofecção, transfecção (por exemplo, transfecção de fosfato de cálcio, transfecção usando compostos orgânicos altamente ramificados, transfecção usando polímeros catiônicos, transfecção à base de dendrímero, transfecção óptica, transfecção baseada em partículas (por exemplo, transfecção de nanopartículas) ou transfecção usando lipossomas (por exemplo, lipossomas catiônicos)), microinjeção, eletroporação, compressão de células, sonoporação, fusão de protoplastos, impalefecção, distribuição hidrodinâmica, arma de gene, magnetofecção, transfecção viral e nucleofecção. Além disso, a tecnologia de edição de genoma CRISPR/Cas9 conhecida na técnica pode ser usada para introduzir ácidos nucleicos CAR em células efetoras (por exemplo, células T) e/ou para introduzir outras modificações genéticas (por exemplo, conforme descrito abaixo) em células efetoras (por exemplo, Células T) para aumentar a atividade das células CAR (para uso de tecnologia CRISPR/Cas9 em conexão com células T CAR, ver, por exemplo, US 9.890.393; US 9.855.297; US 2017/0175128; US 2016/0184362; US 2016/0272999; WO2015/161276; WO 2014/191128; CN 106755088; CN 106591363; CN 106480097; CN 106399375; CN 104894068).

[0514] São fornecidos aqui métodos que podem ser usados para gerar qualquer uma das células ou composições aqui

descritas, onde cada célula pode expressar um CAR (por exemplo, qualquer um dos CARs aqui descritos).

[0515] Receptores de antígenos quiméricos (CARs) incluem um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembranar e um domínio de sinalização citoplasmático que inclui uma sequência citoplasmática da sequência CD3ζ suficiente para estimular uma célula T quando o domínio de ligação ao antígeno se liga ao antígeno e, opcionalmente, uma sequência citoplasmática de uma ou mais (por exemplo, dois, três ou quatro) proteínas co-estimuladoras (por exemplo, uma sequência citoplasmática de um ou mais de B7-H3, BTLA, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD80, CD160, CD244, ICOS, LAG3, LFA-1, LIGHT, NKG2C, 4-1BB, OX40, PD-1, PD-L1, TIM3 e um ligante que se liga especificamente a CD83) que fornece co-estimulação da célula T quando o domínio de ligação ao antígeno se liga ao antígeno. Em algumas concretizações, um CAR pode incluir ainda um ligante. Aspectos e características não limitantes das CARs são descritos abaixo. Aspectos adicionais de CARs e células CAR, incluindo exemplos de domínios de ligação a antígeno, ligantes, domínios transmembranares e domínios de sinalização citoplasmática, são descritos em, por exemplo, Kakarla et al., Cancer J. 20: 151-155, 2014; Srivastava et al., Trends Immunol. 36: 494-502, 2015; Nishio et al., Oncoimmunology 4 (2): e988098, 2015; Ghorashian et al., Br. J. Haematol. 169: 463-478, 2015; Levine, Cancer Gene Ther. 22: 79-84, 2015; Jensen et al., Curr. Opin. Immunol. 33: 9-15, 2015; Singh et al., Cancer Gene Ther. 22: 95-100, 2015; Li et al., Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22: 1753-1756, 2014; Gill e outros, Immunol. Rev. 263: 68-89, 2015; Magee et al., Discov. Med. 18: 265-

271, 2014; Gargett et al., Front. Pharmacol. 5: 235, 2014; Yuan et al., Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22: 1137-1141, 2014; Pedgram et al., Cancer J. 20: 127-133, 2014; Eshhar et al., Cancer J. 20: 123-126, 2014; Ramos et al., Cancer J. 20: 112-118, 2014; Maus et al., Blood 123: 2625-2635, 2014; Jena et al., Curr. Hematol. Malig. Rep. 9: 50-56, 2014; Maher et al., Curr. Gene Ther. 14: 35-43, 2014; Riches et al., Discov. Med. 16: 295-302, 2013; Cheadle et al., Immunol. Rev. 257: 83-90, 2014; Davila et al., Int. J. Hematol. 99: 361-371, 2014; Xu et al., Cancer Lett. 343: 172-178, 2014; Kochenderfer et al., Nat. Rev. Clin. Oncol. 10: 267-276, 2013; Hosing et al., Curr. Hematol. Malig. Rep. 8: 60-70, 2013; Hombach et al., Curr. Mol. Med. 13: 1079-1088, 2013; Xu et al., Leuk. Lymphoma 54: 255-260, 2013; Gilham et al., Trends Mol. Med. 18: 377-384, 2012; Lipowska-Bhalla et al., Cancer Immunol. Immunother. 61: 953-962, 2012; Chmielewski et al., Cancer Immunol. Immunother. 61: 1269-1277, 2013; Jena et al., Blood 116: 1035-1044, 2010; Dotti et al., Immunology Reviews 257 (1): 107-126, 2013; Dai et al., Journal of the National Cancer Institute 108 (7): djv439, 2016; Wang e Riviere, Molecular Therapy-Oncolytics 3: 16015, 2016; Publicação do Pedido de Patente U.S. Nº 2018/0057609; 2018/0037625; 2017/0362295; 2017/0137783; 2016/0152723, 2016/0206656, 2016/0199412, 2016/0208018, 2015/0232880, 2015/0225480; 2015/0224143; 2015/0224142; 2015/0190428; 2015/0196599; 2015/0152181; 2015/0140023; 2015/0118202; 2015/0110760; 2015/0099299; 2015/0093822; 2015/0093401; 2015/0051266; 2015/0050729; 2015/0024482; 2015/0023937; 2015/0017141; 2015/0017136; 2015/0017120; 2014/0370045; 2014/0370017; 2014/0369977; 2014/0349402; 2014/0328812;

2014/0322275; 2014/0322216; 2014/0322212; 2014/0322183;
 2014/0314795; 2014/0308259; 2014/0301993; 2014/0296492;
 2014/0294784; 2014/0286973; 2014/0274909; 2014/0274801;
 2014/0271635; 2014/0271582; 2014/0271581; 2014/0271579;
 2014/0255363; 2014/0242701; 2014/0242049; 2014/0227272;
 2014/0219975; 2014/0170114; 2014/0134720; 2014/0134142;
 2014/0120622; 2014/0120136; 2014/0106449; 2014/0106449;
 2014/0099340; 2014/0086828; 2014/0065629; 2014/0050708;
 2014/0024809; 2013/0344039; 2013/0323214; 2013/0315884;
 2013/0309258; 2013/0288368; 2013/0287752; 2013/0287748;
 2013/0280221; 2013/0280220; 2013/0266551; 2013/0216528;
 2013/0202622; 2013/0071414; 2012/0321667; 2012/0302466;
 2012/0301448; 2012/0301447; 2012/0060230; 2011/0213288;
 2011/0158957; 2011/0104128; 2011/0038836; 2007/0036773; e
 2004/0043401. Aspectos adicionais de CARs e células CAR,
 incluindo exemplos de domínios de ligação a antígeno,
 ligantes, domínios transmembranares e domínios de sinalização
 citoplasmática, são descritos em WO 2016/168595; WO
 12/079000; 2015/0141347; 2015/0031624; 2015/0030597;
 2014/0378389; 2014/0219978; 2014/0206620; 2014/0037628;
 2013/0274203; 2013/0225668; 2013/0116167; 2012/0230962;
 2012/0213783; 2012/0093842; 2012/0071420; 2012/0015888;
 2011/0268754; 2010/0297093; 2010/0158881; 2010/0034834;
 2010/0015113; 2009/0304657; 2004/0043401; 2014/0322253;
 2015/0118208; 2015/0038684; 2014/0024601; 2012/0148552;
 2011/0223129; 2009/0257994; 2008/0160607; 2008/0003683;
 2013/0121960; 2011/0052554; e 2010/0178276.

Domínios de ligação ao antígeno

[0516] Os domínios de ligação ao antígeno, incluídos no
 receptor de antígeno quimérico (CAR), podem se ligar

especificamente a um antígeno (por exemplo, um antígeno associado a tumor (TAA) ou um antígeno que não é expresso em uma célula não cancerosa) ou um receptor universal (por exemplo, um tag). Exemplos não limitativos de um domínio de ligação ao antígeno incluem: um anticorpo monoclonal (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE e IgD) (por exemplo, um anticorpo totalmente humano ou quimérico (por exemplo, um humanizado)), um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo (por exemplo, fragmentos Fab, Fab 'ou F (ab') 2) (por exemplo, um fragmento de um anticorpo totalmente humano ou quimérico (por exemplo, humanizado)), um diacorpo, um triacorpo, um tetracorpo, um minicorpo, um scFv, scFv-Fc, (scFv) 2, scFab, bis-scFv, hc-IgG, um BiTE, um anticorpo de domínio único (por exemplo, um domínio V-NAR ou um domínio VhH), IgNAR e um anticorpo multiespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico). Os métodos de preparação desses domínios de ligação ao antígeno são conhecidos na técnica.

[0517] Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao antígeno inclui pelo menos um (por exemplo, um, dois, três, quatro, cinco ou seis) CDR (por exemplo, qualquer um dos três CDRs de um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina ou qualquer um dos três CDRs de um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina) de um anticorpo que é capaz de se ligar especificamente ao antígeno alvo, como moléculas de imunoglobulina (por exemplo, moléculas de imunoglobulina de cadeia leve ou pesada) e fragmentos imunologicamente ativos (ligação ao antígeno) de moléculas de imunoglobulina.

[0518] Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao antígeno é um anticorpo de cadeia única (por exemplo, um domínio V-NAR ou um domínio VHH, ou qualquer um dos

anticorpos de cadeia única como aqui descritos). Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao antígeno é uma molécula de anticorpo inteira (por exemplo, um anticorpo humano, humanizado ou quimérico) ou um anticorpo multimérico (por exemplo, um anticorpo bi-específico).

[0519] Em algumas concretizações, os domínios de ligação ao antígeno incluem fragmentos de anticorpos e anticorpos multiespecíficos (por exemplo, bi-específicos) ou fragmentos de anticorpos. Exemplos de anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos incluem, mas não estão limitados a: Fvs de cadeia única (scFvs), fragmentos Fab, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fvs ligados por dissulfeto (sdFvs), Fvs, e fragmentos contendo um domínio VL ou VH.

[0520] Os domínios de ligação de antígeno adicionais fornecidos aqui são policlonais, monoclonais, multiespecíficos (multiméricos, por exemplo, bi-específicos), anticorpos humanos, anticorpos quiméricos (por exemplo, quimera humano-camundongo), anticorpos de cadeia única, anticorpos feitos intracelularmente (ou seja, intracorporos) e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), ou subclasse. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno é um anticorpo IgG1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em alguns exemplos, o domínio de ligação ao antígeno é um anticorpo IgG4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao antígeno é uma imunoglobulina que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

[0521] Exemplos adicionais de domínios de ligação ao antígeno são fragmentos de ligação ao antígeno de uma IgG (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de um IgG humano ou humanizado, por exemplo, humano ou IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanizado), um fragmento de ligação ao antígeno de uma IgA (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de IgA1 ou IgA2) (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de uma IgA humana ou humanizada, por exemplo, um IgA1 ou IgA2 humano ou humanizado), um fragmento de ligação ao antígeno de um IgD (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de um IgD humano ou humanizado), um fragmento de ligação ao antígeno de um IgE (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de uma IgE humana ou humanizada), ou um fragmento de ligação ao antígeno de uma IgM (por exemplo, um fragmento de ligação ao antígeno de uma IgM humana ou humanizada).

[0522] Em algumas concretizações, um domínio de ligação ao antígeno pode se ligar a um antígeno específico (por exemplo, um antígeno associado a tumor) com uma afinidade (KD) de cerca ou menos de 1×10^{-7} M (por exemplo, cerca ou menos de 1×10^{-8} M, cerca ou menos do que 5×10^{-9} M, cerca ou menos do que 2×10^{-9} M, ou cerca ou menos do que 1×10^{-9} M), por exemplo, em solução salina ou em solução salina tamponada com fosfato.

[0523] Em algumas concretizações, as células efetoras CAR (por exemplo, células T CAR) compreendem uma molécula CAR que se liga a um antígeno tumoral (por exemplo, compreende um domínio de ligação ao antígeno tumoral). Em algumas concretizações, a molécula de CAR compreende um domínio de

ligação ao antígeno que reconhece um antígeno tumoral de um tumor sólido (por exemplo, câncer de mama, câncer de cólon, etc.). Em algumas concretizações, a molécula de CAR é uma molécula de CAR em tandem, conforme descrito supra, que compreende pelo menos dois domínios de ligação ao antígeno. Em algumas concretizações, a molécula do CAR compreende um domínio de ligação ao antígeno que reconhece um antígeno tumoral de uma malignidade hematológica (por exemplo, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia crônica, leucemia mielocítica crônica (granulocítica), linfocítica crônica leucemia, linfoma de células do manto, linfoma primário do sistema nervoso central, linfoma de Burkitt e linfoma de células B da zona marginal, policitemia vera, doença de Hodgkin, doença não-Hodgkin, mieloma múltiplo, etc.).

[0524] Em algumas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno tumor-específico (TSA). Um TSA é exclusivo para células tumorais e não ocorre em outras células do corpo. Em algumas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno associado ao tumor (TAA). Um TAA não é exclusivo de uma célula tumoral e, em vez disso, também é expresso em uma célula normal sob condições que falham em induzir um estado de tolerância imunológica ao antígeno. A expressão do antígeno no tumor pode ocorrer em condições que permitem ao sistema imunológico responder ao antígeno. Em algumas concretizações, um TAA é expresso em células normais durante o desenvolvimento fetal quando o sistema imunológico é imaturo e incapaz de responder ou está normalmente presente em níveis extremamente baixos em células normais, mas que são

expressos em níveis muito mais elevados em células tumorais.

[0525] Em certas concretizações, o antígeno associado ao tumor é determinado por sequenciamento de células tumorais de um paciente e identificação de proteínas mutadas encontradas apenas no tumor. Esses antígenos são chamados de "neoantígenos". Uma vez que um neoantígeno foi identificado, anticorpos terapêuticos podem ser produzidos contra ele e usados nos métodos aqui descritos.

[0526] Em algumas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno de câncer epitelial (por exemplo, mama, gastrointestinal, pulmão), um antígeno de câncer específico da próstata (PSA) ou antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), um antígeno de câncer de bexiga, um pulmão (por exemplo, pulmão de células pequenas) antígeno de câncer, um antígeno de câncer de cólon, um antígeno de câncer de ovário, um antígeno de câncer de cérebro, um antígeno de câncer gástrico, um antígeno de carcinoma de células renais, um antígeno de câncer pancreático, um antígeno de câncer de fígado, um antígeno de câncer de esôfago, uma cabeça e antígeno de câncer de pescoço, ou um antígeno de câncer colorretal. Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno de linfoma (por exemplo, linfoma não-Hodgkin ou linfoma de Hodgkin), um antígeno de câncer de linfoma de células B, um antígeno de leucemia, um antígeno de mieloma (por exemplo, mieloma múltiplo ou mieloma de células plasmáticas), um antígeno de leucemia linfoblástica aguda, um antígeno de leucemia mielóide crônica ou um antígeno de leucemia mielóide aguda.

[0527] Antígenos tumorais, (por exemplo, antígenos associados a tumor (TAAs) e antígenos específicos de tumor

(TSAs)) que podem ser direcionados por células efetoras CAR (por exemplo, células CAR T), incluem, mas não estão limitados a, 1GH-IGK, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, proteína associada a aciclofilina C, alfa-fetoproteína (AFP), α -actinina-4, A3, antígeno específico para anticorpo A33, ART-4, B7, Ba 733, BAGE, BCR-ABL, beta-catenina, beta-HCG, antígeno BrE3, BCA225, BTAA, CA125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA195, CA242, CA-50, CAM43, CAMEL, CAP-1, anidrase carbônica IX, c-Met , CA19-9, CA72-4, CAM 17.1, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD68, CD70, CD70L, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD83, CD95, CD126, CD132, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK4, CDK4m, CDKN2A, CO-029, CTLA4, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1a antígeno-p específico do cólon (CSAp), CEA (CEA CAM5), CEACAM6, c-Met, DAM, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), FGF-5 , Flt-1, Flt-3, receptor de folato, antígeno G250, Ga733VEpCAM, GAGE, gp100, GRO- β , H4-RET, HLA-DR, HM1.24, gonadotrofina coriônica humana (HCG) e suas subunidades, HER2/neu , HMGB-1, fator indutível por hipóxia (HIF-1), HSP70-2M, HST-2, HTgp-175, Ia, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- λ , IL- 4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, IL-25, fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), antígeno KC4, KSA, antígeno KS-1, KS1-4, LAGE-1a, Le-Y, LDR/FUT, M344 , MA-50, fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), MAGE, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-2, TRAG-3, mCRP, MCP-

1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIF, MG7-Ag, MOV18, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, MUC13, MUC16, MUM-1/2, MUM-3, MYL-RAR, NB/70K, Nm23H1, NuMA, NCA66, NCA95, NCA90, NY-ESO-1, p15, p16, p185erbB2, p180erbB3, antígeno PAM4, mucina de câncer pancreático, receptor PD1 (P D-1), ligante 1 do receptor PD-1 (PD-L1), ligante 2 do receptor PD-1 (PD-L2), PI5, fator de crescimento da placenta, p53, PLAGL2, fosfatase ácida prostática Pmel17, PSA, PRAME, PSMA, PlGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RCAS1, RS5, RAGE, RANTES, Ras, T101, SAGE, S100, survivina, survivina-2B, SDDCAG16, proteína de ligação TA-90\Mac2, TAAL6, TAC, TAG-72, TLP, tenascina, receptores TRAIL, TRP-1, TRP-2, TSP-180, TNF- α , antígeno Tn, antígenos Thomson-Friedenreich, antígenos de necrose tumoral, tirosinase, VEGFR, fibronectina ED-B, WT-1, antígeno 17-1A, fatores de complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, um marcador de angiogênese, bcl-2, bcl-6 e K-ras, um marcador de oncogene e um produto oncogene (ver, por exemplo, Sensi et al., Clin Cancer Res 2006, 12: 5023-32; Parmiani et al., J Immunol 2007, 178: 1975-79; Novellino et al. Cancer Immunol Immunother 2005, 54: 187-207).

[0528] Em algumas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno viral derivado de um vírus associado a uma doença crônica humana ou câncer (como câncer cervical). Por exemplo, em algumas concretizações, o antígeno viral é derivado do vírus Epstein-Barr (EBV), antígenos HPV E6 e/ou E7, vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV) ou citomegalovírus (CMV).

[0529] Cânceres ou tumores exemplares e antígenos tumorais específicos associados a esses tumores (mas não exclusivamente), incluem leucemia linfoblástica aguda (etv6,

aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-caderina, α -catenina, β -catenina, γ -catenina, p120ctn), câncer de bexiga (p21ras), câncer biliar (p21ras), câncer de mama (família MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma cervical (p53, p21ras), carcinoma de cólon (p21ras, HER2/neu, c-erbB-2, família MUC), câncer colorretal (antígeno colorretal associado (CRC) -CO17-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), câncer de células epiteliais (ciclofilina b), gástrico câncer (HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), câncer hepatocelular (α -fetoproteína), linfoma de Hodgkins (Imp-1, EBNA-1), câncer de pulmão (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p5, gp75, antígeno oncofetal, gangliosídeos GM2 e GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gp100), micloma (família MUC, p21ras), carcinoma de pulmão de células não pequenas (HER2/neu, c-erbB-2), câncer de nasofaringe (Imp-1, EBNA-1), câncer de ovário (família MUC, HER2/neu, c-erbB-2), câncer de próstata (antígeno específico da próstata (PSA) e seu antígeno epítomos PSA-1, PSA-2 e PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), câncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cânceres de células escamosas do colo do útero e esôfago, câncer testicular (NY-ESO-1) e leucemia de células T (epítomos do HTLV-1) e produtos ou proteínas virais.

[0530] Em algumas concretizações, a célula imune efetora compreendendo uma molécula CAR (por exemplo, célula T CAR) útil nos métodos aqui divulgados expressa um CAR compreendendo um domínio de ligação de mesotelina (isto é, a célula CAR T reconhece especificamente mesotelina). A mesotelina é um antígeno tumoral superexpresso em uma

variedade de cânceres, incluindo câncer de ovário, pulmão e pâncreas.

[0531] Em algumas concretizações, a célula imune efetora compreendendo uma molécula CAR (por exemplo, célula CAR T) útil nos métodos aqui divulgados expressa um CAR compreendendo um domínio de ligação a CD19. Em algumas concretizações, a célula imune efetora compreendendo uma molécula CAR (por exemplo, célula T CAR) útil nos métodos aqui divulgados expressa um CAR compreendendo um domínio de ligação HER2. Em algumas concretizações, a célula imune efetora compreendendo uma molécula CAR (por exemplo, célula CAR T) útil nos métodos divulgados neste documento expressa um CAR compreendendo um domínio de ligação EGFR.

[0532] Em algumas concretizações, a célula efetora do CAR que expressa um CAR compreendendo um alvo CD19 ou domínio de ligação é Kymriah™ (tisagenlecleucel; Novartis; ver WO 2016109410, aqui incorporado por referência em sua totalidade) ou Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel; Kite; ver US 20160346326, aqui incorporado por referência em sua totalidade).

Linker

[0533] São fornecidos aqui os CARs que podem incluir opcionalmente um ligante (1) entre o domínio de ligação ao antígeno e o domínio transmembranar e/ou (2) entre o domínio transmembrana e o domínio de sinalização citoplasmática. Em algumas concretizações, o ligante pode ser um ligante polipeptídico. Por exemplo, o ligante pode ter um comprimento entre cerca de 1 aminoácido e cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90

aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 70
aminoácidos, cerca de 60 aminoácidos, cerca de 50
aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos, cerca de 35
aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos, cerca de 25
aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos, cerca de 18
aminoácidos, cerca de 16 aminoácidos, cerca de 14
aminoácidos, cerca de 12 aminoácidos, cerca de 10
aminoácidos, cerca de 8 aminoácidos, cerca de 6 aminoácidos,
cerca de 4 aminoácidos ou cerca de 2 aminoácidos; cerca de 2
aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400
aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200
aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90
aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 70
aminoácidos, cerca de 60 aminoácidos, cerca de 50
aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos, cerca de 35
aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos, cerca de 25
aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos, cerca de 18
aminoácidos, cerca de 16 aminoácidos, cerca de 14
aminoácidos, cerca de 12 aminoácidos, cerca de 10
aminoácidos, cerca de 8 aminoácidos, cerca de 6 aminoácidos
ou cerca de 4 aminoácidos; cerca de 4 aminoácidos a cerca de
500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40
aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30
aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos, cerca de 20
aminoácidos, cerca de 18 aminoácidos, cerca de 16
aminoácidos, cerca de 14 aminoácidos, cerca de 12

aminoácidos, cerca de 10 aminoácidos, cerca de 8 aminoácidos
 ou cerca de 6 aminoácidos; cerca de 6 aminoácidos a cerca de
 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
 aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
 aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
 aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
 aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40
 aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30
 aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos, cerca de 20
 aminoácidos, cerca de 18 aminoácidos, cerca de 16
 aminoácidos, cerca de 14 aminoácidos, cerca de 12
 aminoácidos, cerca de 10 aminoácidos ou cerca de 8
 aminoácidos; cerca de 8 aminoácidos a cerca de 500
 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
 aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
 aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
 aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
 aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40
 aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30
 aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos, cerca de 20
 aminoácidos, cerca de 18 aminoácidos, cerca de 16
 aminoácidos, cerca de 14 aminoácidos, cerca de 12
 aminoácidos, ou cerca de 10 aminoácidos; cerca de 10
 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400
 aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200
 aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90
 aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 70
 aminoácidos, cerca de 60 aminoácidos, cerca de 50
 aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos, cerca de 35
 aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos, cerca de 25

aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos, cerca de 18 aminoácidos, cerca de 16 aminoácidos, cerca de 14 aminoácidos ou cerca de 12 aminoácidos ; cerca de 12 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60 aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos, cerca de 18 aminoácidos, cerca de 16 aminoácidos ou cerca de 14 aminoácidos; cerca de 14 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60 aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos ou cerca de 18 aminoácidos; cerca de 18 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300

aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40
aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30
aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos ou cerca de 20
aminoácidos; cerca de 20 aminoácidos a cerca de 500
aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40
aminoácidos, cerca de 35 aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos
ou cerca de 25 aminoácidos; cerca de 25 aminoácidos a cerca
de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40
aminoácidos ou cerca de 30 aminoácidos a cerca de 500
aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos, cerca de 40 aminoácidos
ou cerca de 35 aminoácidos; cerca de 35 aminoácidos a cerca
de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80

aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, cerca de 50 aminoácidos ou cerca de 40
aminoácidos; cerca de 40 aminoácidos a cerca de 500
aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos, cerca de 80
aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos, cerca de 60
aminoácidos, ou cerca de 50 aminoácidos; cerca de 50
aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400
aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200
aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90
aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos, cerca de 70 aminoácidos
ou cerca de 60 aminoácidos ; cerca de 60 aminoácidos a cerca
de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 150
aminoácidos, cerca de 100 aminoácidos, cerca de 90
aminoácidos, cerca de 80 aminoácidos ou cerca de 70
aminoácidos; cerca de 70 aminoácidos a cerca de 500
aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos, cerca de 90 aminoácidos ou cerca de 80
aminoácidos; cerca de 80 aminoácidos a cerca de 500
aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos, cerca de 300
aminoácidos, cerca de 200 aminoácidos, cerca de 100
aminoácidos ou cerca de 90 aminoácidos; cerca de 90
aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400
aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos, cerca de 200
aminoácidos ou cerca de 100 aminoácidos; cerca de 100
aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400
aminoácidos, cerca de 300 aminoácidos ou cerca de 200

aminoácidos; cerca de 200 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos, cerca de 400 aminoácidos ou cerca de 300 aminoácidos; cerca de 300 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos ou cerca de 400 aminoácidos; ou cerca de 400 aminoácidos a cerca de 500 aminoácidos.

[0534] Exemplos e aspectos adicionais de ligantes são descritos nas referências citadas neste documento e, portanto, são incorporados em sua totalidade neste documento.

Domínios Transmembrana

[0535] Em algumas concretizações, os CARs aqui descritos também incluem um domínio transmembranar. Em algumas concretizações, o domínio transmembranar está naturalmente associado a uma sequência no domínio citoplasmático. Em algumas concretizações, o domínio transmembranar pode ser modificado por uma ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez) substituições de aminoácidos para evitar a ligação do domínio a outros domínios transmembranares (por exemplo, os domínios transmembrana das mesmas ou diferentes proteínas da membrana de superfície) para minimizar as interações com outros membros do complexo receptor.

[0536] Em algumas concretizações, o domínio transmembranar pode ser derivado de uma fonte natural. Em algumas concretizações, o domínio transmembrana pode ser derivado de qualquer proteína ligada à membrana ou transmembrana. Exemplos não limitativos de domínios transmembranares que podem ser usados neste documento podem ser derivados (por exemplo, compreendem pelo menos a sequência transmembrana ou uma parte da sequência transmembrana) da cadeia alfa, beta ou zeta do receptor de células T, CD28 , CD3 epsilon, CD33,

CD37, CD64, CD80, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD86, CD134, CD137 ou CD154.

[0537] Em algumas concretizações, o domínio transmembranar pode ser sintético. Por exemplo, em algumas concretizações em que o domínio transmembranar é de uma fonte sintética, o domínio transmembrana pode incluir (por exemplo, incluir predominantemente) resíduos hidrofóbicos (por exemplo, leucina e valina). Em algumas concretizações, o domínio transmembranar sintético incluirá pelo menos um (por exemplo, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco ou pelo menos seis) triplete de fenilalanina, triptofano e valina no final de um domínio transmembranar sintético. Em algumas concretizações, o domínio transmembranar de um CAR pode incluir um domínio de dobradiça CD8.

[0538] Exemplos específicos adicionais de domínios transmembranares são descritos nas referências aqui citadas.

Domínios Citoplasmáticos

[0539] Também são fornecidas aqui moléculas de CAR que compreendem, por exemplo, um domínio de sinalização citoplasmático que inclui uma sequência citoplasmática de CD3ζ suficiente para estimular uma célula T quando o domínio de ligação ao antígeno se liga ao antígeno e, opcionalmente, uma sequência citoplasmática de um ou mais de co-proteínas estimuladoras (por exemplo, uma sequência citoplasmática de um ou mais dentre CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40L, CD40, PD-1, PD-L1, ICOS, LFA-1, CD2, CD7, CD160, LIGHT, BTLA, TIM3, CD244, CD80, LAG3, NKG2C, B7-H3, um ligante que se liga especificamente a CD83, e qualquer uma das sequências ITAM aqui descritas ou conhecidas na técnica) que fornece

coestimulação da célula T . A estimulação de uma célula imune efetora do CAR pode resultar na ativação de uma ou mais atividades anticâncer da célula imune efetora do CAR. Por exemplo, em algumas concretizações, a estimulação de uma célula imune efetora do CAR pode resultar em um aumento na atividade citolítica ou atividade auxiliar da célula imune efetora do CAR, incluindo a secreção de citocinas. Em algumas concretizações, todo o domínio de sinalização intracelular de uma proteína coestimuladora está incluído no domínio de sinalização citoplasmática. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização citoplasmático inclui uma porção truncada de um domínio de sinalização intracelular de uma proteína coestimuladora (por exemplo, uma porção truncada do domínio de sinalização intracelular que transduz um sinal de função efetora na célula efetora imune do CAR). Exemplos não limitativos de domínios de sinalização intracelular que podem ser incluídos em um domínio de sinalização citoplasmático incluem as sequências citoplasmáticas do receptor de células T (TCR) e co-receptores que atuam em conjunto para iniciar a transdução de sinal após o envolvimento do receptor de antígeno, bem como qualquer variante dessas sequências, incluindo pelo menos uma (por exemplo, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez) substituição e tem a mesma ou quase a mesma capacidade funcional.

[0540] Em algumas concretizações, um domínio de sinalização citoplasmático pode incluir duas classes distintas de sequências de sinalização citoplasmática: sequências de sinalização que iniciam a ativação dependente de antígeno através do TCR (sequências de sinalização citoplasmática primárias) (por exemplo, uma sequência de sinalização

citoplasmática CD3ζ) e uma sequência citoplasmática de um ou mais de proteínas co-estimuladoras que atuam de uma maneira independente do antígeno para fornecer um sinal secundário ou co-estimulador (sequências de sinalização citoplasmática secundárias).

[0541] Em algumas concretizações, o domínio citoplasmático de um CAR pode ser projetado para incluir o domínio de sinalização de CD3ζ por si só ou combinado com qualquer outra sequência (s) de sinalização citoplasmática desejada (s) útil (s) no contexto de um CAR. Em alguns exemplos, o domínio citoplasmático de um CAR pode incluir uma porção da cadeia CD3ζ e uma sequência de sinalização citoplasmática coestimuladora. A sequência de sinalização citoplasmática coestimulatória refere-se a uma porção de um CAR incluindo uma sequência de sinalização citoplasmática de uma proteína coestimuladora (por exemplo, CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, função linfocitária-antígeno associado-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 e um ligante que se liga especificamente ao CD83).

[0542] Em algumas concretizações, as sequências de sinalização citoplasmática dentro do domínio de sinalização citoplasmática de um CAR são posicionadas em uma ordem aleatória. Em algumas concretizações, as sequências de sinalização citoplasmática dentro do domínio de sinalização citoplasmática de um CAR estão ligadas umas às outras em uma ordem específica. Em algumas concretizações, um ligante (por exemplo, qualquer um dos ligantes aqui descritos) pode ser usado para formar uma ligação entre diferentes sequências de sinalização citoplasmática.

[0543] Em algumas concretizações, o domínio de sinalização

citoplasmática é projetado para incluir a sequência de sinalização citoplasmática de CD3ζ e a sequência de sinalização citoplasmática da proteína coestimuladora CD28. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização citoplasmática é projetado para incluir a sequência de sinalização citoplasmática de CD3ζ e a sequência de sinalização citoplasmática da proteína coestimuladora 4-1BB. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização citoplasmática é projetado para incluir a sequência de sinalização citoplasmática de CD3ζ e as sequências de sinalização citoplasmática de proteínas co-estimuladoras CD28 e 4-1BB. Em algumas concretizações, o domínio de sinalização citoplasmática não inclui as sequências de sinalização citoplasmática de 4-1BB.

Modificação adicional de células CAR T

[0544] Em outra concretização, a eficácia terapêutica das células efetoras do CAR (por exemplo, células T CAR) é aumentada pela interrupção de um gene da metilcitosina dioxigenase (por exemplo, Tet1, Tet2, Tet3), o que leva à diminuição dos níveis totais de 5-hidroximetilcitosina em associação com proliferação aumentada, regulação da produção e desgranulação de citocinas efetoras e, assim, aumenta a proliferação e/ou função da célula efetora CAR (por exemplo, célula T CAR), conforme descrito na Publicação PCT WO 2017/049166. Assim, uma célula efetora (por exemplo, célula T) pode ser projetada para expressar um CAR e em que a expressão e/ou função de Tet1, Tet2 e/ou Tet3 na referida célula efetora (por exemplo, célula T) foi reduzida ou eliminada.

[0545] Em outra concretização, a eficácia terapêutica das

células efetoras do CAR (por exemplo, células T CAR) é aprimorada usando uma célula efetora (por exemplo, célula T) que expressa constitutivamente um CAR (referido como CAR não condicional) e condicionalmente expressa outro agente útil para o tratamento de câncer, conforme descrito na Publicação PCT WO 2016/126608 e Publicação US No. 2018/0044424. Em tais concretizações, o agente expresso condicionalmente é expresso após a ativação da célula efetora (por exemplo, célula T), por exemplo, a ligação do CAR não condicional ao seu alvo. Em uma concretização, o agente expresso condicionalmente é um CAR (referido neste documento como um CAR condicional). Em outra concretização, o agente expresso condicionalmente inibe um inibidor de checkpoint da resposta imune. Em outra concretização, o agente expresso condicionalmente melhora ou aumenta a eficácia de um CAR e pode incluir uma citocina.

[0546] Em outra concretização, a eficácia terapêutica das células T CAR é aumentada pela modificação da célula T CAR com um ácido nucleico que é capaz de alterar (por exemplo, modulação negativa) a expressão de um gene endógeno selecionado a partir do grupo que consiste na cadeia TCR α , TCR β cadeia, microglobulina beta-2, uma molécula HLA, CTLA-4, PD1 e FAS, conforme descrito na Publicação PCT WO 2016/069282 e Publicação US N° 2017/0335331.

[0547] Em outra concretização, a eficácia terapêutica das células T CAR é aumentada pela coexpressão nas células T do CAR e um ou mais intensificadores da iniciação de células T ("ETPs"), conforme descrito na Publicação PCT WO 2015/112626 e Publicação US No. 2016/0340406. A adição de um componente ETP à célula CAR T confere uma função aprimorada de célula apresentadora de antígeno (APC) "profissional". Em uma

concretização, o CAR e um ou mais ETPs são co-expressos transitoriamente na célula T. Assim, as células T manipuladas são seguras (dada a natureza transitória da expressão CAR/ETP) e induzem imunidade prolongada por meio da função APC.

[0548] Em outra concretização, a eficácia terapêutica das células T CAR é aumentada pela coexpressão nas células T de um CAR e uma proteína de membrana inibitória (IMP) compreendendo um domínio de ligação (ou dimerização), conforme descrito na Publicação PCT WO 2016/055551 e Publicação dos EUA Nº 2017/0292118. O CAR e o IMP são reativos a um composto solúvel, especialmente por meio de um segundo domínio de ligação compreendido no CAR, permitindo assim a co-localização, por dimerização ou reconhecimento de ligante, do domínio de sinalização inibitório transportado pelo IMP e do domínio de transdução de sinal transportado pelo CAR, tendo o efeito de diminuir a ativação do CAR. O domínio de sinalização inibitório é de preferência a morte programada-1 (PD-1), que atenua a ativação mediada pelo receptor de células T (TCR) da produção de IL-2 e proliferação de células T.

[0549] Em outra concretização, a eficácia terapêutica das células T CAR é aprimorada usando um sistema em que variações controladas na conformação da porção extracelular de um CAR contendo o domínio de ligação ao antígeno são obtidas mediante adição de moléculas pequenas, conforme descrito na Publicação PCT WO 2017/032777. Este sistema integrado alterna a interação entre o antígeno e o domínio de ligação ao antígeno entre os estados on/off. Por ser capaz de controlar a conformação da porção extracelular de um CAR, as funções a

jusante da célula T do CAR, como a citotoxicidade, podem ser moduladas diretamente. Assim, um CAR pode ser caracterizado por compreender: a) pelo menos um ectodomínio que compreende: i) um domínio de ligação ao antígeno extracelular; e ii) um domínio de troca compreendendo pelo menos um primeiro domínio de ligação ao ligante de multimerização e um segundo domínio de ligação ao ligante de multimerização que são capazes de se ligar a um ligante multivalente predeterminado para formar um multímero compreendendo os referidos dois domínios de ligação e o ligante multivalente ao qual eles são capazes de se ligar; b) pelo menos um domínio transmembranar; e c) pelo menos um endodomínio compreendendo um domínio de transdução de sinal e, opcionalmente, um domínio coestimulador; em que o domínio de troca está localizado entre o domínio de ligação ao antígeno extracelular e o domínio transmembranar.

II. Anticorpos direcionadores de antígenos associados a tumor

[0550] Em alguns aspectos, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras a serem utilizadas ou realizadas em conjunto com anticorpos que têm como alvo antígenos tumorais.

[0551] Os anticorpos monoclonais terapêuticos foram concebidos como uma classe de agentes farmacologicamente ativos que devem permitir o tratamento seletivo de tumor, visando antígenos ou epítomos seletivos de tumor.

[0552] Os métodos de produção de anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno são bem conhecidos na técnica e são divulgados, por exemplo, nas Patentes US No. 7.247.301, No. 7.923.221 e no Pedido de Patente US 2008/0138336, todos aqui incorporados por referência na sua totalidade.

[0553] Os anticorpos terapêuticos que podem ser usados nos

métodos da presente divulgação incluem, mas não estão limitados a, qualquer um dos anticorpos anticâncer reconhecidos na técnica que são aprovados para uso, em ensaios clínicos ou em desenvolvimento para uso clínico. Em certas concretizações, mais de um anticorpo anticâncer pode ser incluído na terapia de combinação da presente divulgação.

[0554] Exemplos não limitativos de anticorpos anticâncer incluem o seguinte, sem limitação: trastuzumabe (HERCEPTIN™. Por Genentech, South San Francisco, Califórnia), que é usado para tratar câncer de mama HER-2/neu positivo ou câncer de mama metastático; bevacizumab (AVASTIN™ da Genentech), que são usados para tratar câncer colorretal, câncer colorretal metastático, câncer de mama, câncer de mama metastático, câncer de pulmão de células não pequenas ou carcinoma de células renais; rituximabe (RITUXAN™ da Genentech), que é usado para tratar linfoma não-Hodgkin ou leucemia linfocítica crônica; pertuzumab (OMNITARG™ da Genentech), que é usado para tratar câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão de células não pequenas ou câncer de ovário; cetuximabe (ERBITUX™ por ImClone Systems Incorporated, New York, NY), que pode ser usado para tratar câncer colorretal, câncer colorretal metastático, câncer de pulmão, câncer de cabeça e pescoço, câncer de cólon, câncer de mama, câncer de próstata, câncer gástrico, câncer de ovário, câncer cerebral, câncer pancreático, câncer esofágico, câncer de células renais, câncer de próstata, câncer cervical ou câncer de bexiga; IMC-1C11 (ImClone Systems Incorporated), que é usado para tratar câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, bem como outros alvos de câncer em potencial; tositumomab e tositumomab e iodo I 131 (BEXXAR XM por Corixa Corporation,

Seattle, Wash.), que é usado para tratar o linfoma não-Hodgkin, que pode ser CD20 positivo, folicular, linfoma não-Hodgkin, com e sem transformação, cuja doença é refratário a Rituximabe e apresentou recidiva após quimioterapia; In111 ibirtumomab tiuxetan; Y90 ibirtumomab tiuxetan; In111 ibirtumomab tiuxetano e Y90 ibirtumomab tiuxetano (ZEVALIN™ da Biogen Idec, Cambridge, Mass.), Que é usado para tratar linfoma ou linfoma não-Hodgkin, que pode incluir linfoma folicular recidivante; linfoma não-Hodgkin recidivante ou refratário, de baixo grau ou folicular; ou linfoma não-Hodgkin de células B transformadas; EMD 7200 (EMD Pharmaceuticals, Durham, N.C.), que é usado para tratar câncer de pulmão de células não pequenas ou câncer cervical; SGN-30 (um anticorpo monoclonal geneticamente modificado direcionado ao antígeno CD30 por Seattle Genetics, Bothell, Wash.), Que é usado para tratar linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin; SGN-15 (um anticorpo monoclonal geneticamente modificado direcionado a um antígeno relacionado a Lewisy que é conjugado à doxorubicina pela Seattle Genetics), que é usado para tratar câncer de pulmão de células não pequenas; SGN-33 (um anticorpo humanizado direcionado ao antígeno CD33 pela Seattle Genetics), que é usado para o tratamento de leucemia mieloide aguda (AML) e síndromes de mielodisplasia (MDS); SGN-40 (um anticorpo monoclonal humanizado direcionado ao antígeno CD40 pela Seattle Genetics), que é usado para tratar mieloma múltiplo ou linfoma não-Hodgkin; SGN-35 (um anticorpo monoclonal geneticamente modificado direcionado a um antígeno CD30 que é conjugado a auristatina E pela Seattle Genetics), que é usado para tratar linfoma não-Hodgkin; SGN-70 (um anticorpo humanizado direcionado ao

antígeno CD70 pela Seattle Genetics), que é usado para tratar câncer renal e carcinoma nasofaríngeo; SGN-75 (um conjugado constituído pelo anticorpo SGN70 e um derivado de Auristatina da Seattle Genetics); e SGN-17/19 (uma proteína de fusão contendo anticorpo e enzima conjugada com pró-fármaco de melfalano pela Seattle Genetics), que é usada para tratar melanoma ou melanoma metastático.

[0555] Deve ser entendido que os anticorpos terapêuticos a serem usados nos métodos da presente divulgação não estão limitados aos descritos supra. Por exemplo, os seguintes anticorpos terapêuticos aprovados também podem ser usados nos métodos da divulgação: brentuximabe vedotina (ADCETRIS™) para linfoma anaplásico de células grandes e linfoma de Hodgkin, ipilimumabe (MDX-101; YERVOY™) para melanoma, ofatumumabe (ARZERRA™) para leucemia linfocítica crônica, panitumumabe (VECTIBIX™) para câncer colorretal, alemtuzumabe (CAMPATH™) para leucemia linfocítica crônica, ofatumumabe (ARZERRA™) para leucemia linfocítica crônica, gemtuzumabe ozogamicina (MYLOTARG™) para leucemia mielóide aguda.

[0556] Os anticorpos adequados para uso nos métodos aqui divulgados também podem ter como alvo moléculas expressas por células imunes, tais como, mas não se limitando a, OX86 que tem como alvo OX40 e aumenta as células T CD8+ específicas do antígeno em locais de tumor e aumenta a rejeição de tumor; BMS-663513 que visa CD137 e causa regressão de tumores estabelecidos, bem como a expansão e manutenção de células T CD8+, e daclizumab (ZENAPAX™) que tem como alvo CD25 e causa depleção transitória de CD4 + CD25 + FOXP3 + Tregs e aumenta a regressão do tumor e aumenta o número de células T efetoras. Uma discussão mais detalhada destes anticorpos pode

ser encontrada em, por exemplo, Weiner et al., Nature Rev. Immunol 2010; 10: 317-27.

[0557] Outros anticorpos terapêuticos podem ser identificados que têm como alvo antígenos tumorais (por exemplo, antígenos tumorais associados a diferentes tipos de câncer, tais como carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas e combinações dos mesmos). Por exemplo, os seguintes antígenos tumorais podem ser direcionados por anticorpos terapêuticos nos métodos aqui divulgados.

[0558] O antígeno tumoral pode ser um antígeno de câncer epitelial (por exemplo, mama, gastrointestinal, pulmão), um antígeno de câncer específico da próstata (PSA) ou antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), um antígeno do câncer de bexiga, um pulmão (por exemplo, pulmão de pequenas células) antígeno de câncer, um antígeno de câncer de cólon, um antígeno de câncer de ovário, um antígeno de câncer de cérebro, um antígeno de câncer gástrico, um antígeno de carcinoma de células renais, um antígeno de câncer pancreático, um antígeno de câncer de fígado, um antígeno de câncer de esôfago, um câncer de cabeça e pescoço antígeno, ou um antígeno de câncer colorretal. Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno de linfoma (por exemplo, linfoma não-Hodgkin ou linfoma de Hodgkin), um antígeno de câncer de linfoma de células B, um antígeno de leucemia, um antígeno de mieloma (por exemplo, mieloma múltiplo ou mieloma de células plasmáticas), um antígeno de leucemia linfoblástica aguda, um antígeno de leucemia mielóide crônica ou um antígeno de leucemia mielóide aguda. Deve ser entendido que os antígenos tumorais descritos são apenas exemplificativos e que qualquer antígeno tumoral pode ser

direcionado para uso nos métodos aqui divulgados.

[0559] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é uma proteína ou peptídeo mucina-1 (MUC-1) que é encontrado na maioria ou em todos os adenocarcinomas humanos: pâncreas, cólon, mama, ovário, pulmão, próstata, cabeça e pescoço, incluindo mielomas múltiplos e alguns linfomas de células B. Pacientes com doença inflamatória intestinal, seja doença de Crohn ou colite ulcerosa, apresentam risco aumentado de desenvolver carcinoma colorretal. MUC-1 é uma glicoproteína transmembranar tipo I. A porção extracelular principal de MUC-1 tem um grande número de repetições em tandem consistindo em 20 aminoácidos que compreendem epítomos imunogênicos. Em alguns cânceros, é exposto numa forma não glicosilada que é reconhecida pelo sistema imunitário (Gendler et al., J Biol Chem 1990; 265: 15286-15293).

[0560] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno B-Raf mutado, que está associado ao melanoma e ao câncer de cólon. A grande maioria dessas mutações representa uma única alteração de nucleotídeo de T-A no nucleotídeo 1796, resultando em uma alteração de valina para ácido glutâmico no resíduo 599 dentro do segmento de ativação de B-Raf. As proteínas Raf também estão indiretamente associadas ao câncer como efetoras das proteínas Ras ativadas, formas oncogênicas das quais estão presentes em aproximadamente um terço de todos os cânceres humanos. O B-Raf normal não mutado está envolvido na sinalização celular, retransmitindo sinais da membrana celular para o núcleo. A proteína normalmente só está ativa quando necessária para transmitir sinais. Em contraste, foi relatado que o mutante B-Raf está constantemente ativo, interrompendo o relé de sinalização

(Mercer e Pritchard, *Biochim Biophys Acta* (2003) 1653 (1): 25-40; Sharkey et al., *Cancer Res.* (2004) 64 (5): 1595-1599).

[0561] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2/neu). Os cânceres que têm células que superexpressam HER-2/neu são chamados de cânceres HER-2/neu+. Cânceres HER-2/neu+ exemplares incluem câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de pele, câncer de fígado (por exemplo, adenocarcinoma hepatocelular), câncer intestinal e câncer de bexiga.

[0562] HER-2/neu tem um domínio de ligação extracelular (ECD) de aproximadamente 645 aa, com 40% de homologia com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um domínio âncora transmembrana altamente hidrofóbico (TMD) e um domínio intracelular carboxiterminal (ICD) de aproximadamente 580 aa com 80% de homologia com EGFR. A sequência de nucleotídeos de HER-2/neu está disponível em GENBANKTM. N° de Acesso AH002823 (gene HER-2 humano, região promotora e exão 1); M16792 (gene HER-2 humano, exão 4); M16791 (gene HER-2 humano, exão 3); M16790 (gene HER-2 humano, exão 2); e M16789 (gene HER-2 humano, região promotora e exão 1). A sequência de aminoácidos para a proteína HER-2/neu está disponível em GENBANKTM. N° de Acesso AAA58637. Com base nessas sequências, um especialista na técnica poderia desenvolver antígenos HER-2/neu usando ensaios conhecidos para encontrar epítomos apropriados que geram uma resposta imune eficaz. Antígenos HER-2/neu exemplares incluem p369-377 (um peptídeo HLA-A2 derivado de HER-2/neu); dHER2 (Corixa Corporation); híbrido de epítopo li-Key MHC classe II (Generex Biotechnology Corporation); peptídeo P4 (aminoácidos 378-398); peptídeo P7

(aminoácidos 610-623); mistura de peptídeos P6 (aminoácidos 544-560) e P7; mistura de peptídeos P4, P6 e P7; HER2 [9754]; e similar.

[0563] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). O antígeno EGFR pode ser um antígeno EGFR variante 1, um antígeno EGFR variante 2, um antígeno EGFR variante 3 e/ou um antígeno EGFR variante 4. Os cânceres com células que superexpressam o EGFR são chamados de cânceres EGFR +. Cânceres EGFR+ exemplares incluem câncer de pulmão, câncer de cabeça e pescoço, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de mama, câncer de próstata, câncer gástrico, câncer de ovário, câncer de cérebro e câncer de bexiga.

[0564] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR). O VEGFR é considerado um regulador da angiogênese induzida pelo câncer. Os cânceres com células que superexpressam VEGFR são chamados de cânceres VEGFR+. Cânceres VEGFR+ exemplares incluem câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células pequenas, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer renal, leucemia e leucemia linfocítica.

[0565] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é o antígeno específico da próstata (PSA) e/ou o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) que são prevalentemente expressos em cânceres de próstata independentes de andrógeno.

[0566] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é a glicoproteína 100 (gp 100), um antígeno tumoral específico associado ao melanoma.

[0567] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um

antígeno carcinoembrionário (CEA). Os cânceres com células que superexpressam o CEA são chamados de cânceres CEA+. Os cânceres CEA+ exemplares incluem câncer colorretal, câncer gástrico e câncer pancreático. Antígenos CEA exemplares incluem CAP-1 (isto é, CEA aa 571-579), CAP1-6D, CAP-2 (isto é, CEA aa 555-579), CAP-3 (isto é, CEA aa 87-89), CAP-4 (CEA aa 1-11), CAP-5 (isto é, CEA aa 345-354), CAP-6 (isto é, CEA aa 19-28) e CAP-7.

[0568] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é o antígeno carboidrato 10.9 (CA 19.9). CA 19.9 é um oligossacarídeo relacionado à substância do grupo sanguíneo Lewis A e está associado a cânceres colorretais.

[0569] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um antígeno de câncer de melanoma. Os antígenos do câncer de melanoma são úteis para o tratamento do melanoma. Antígenos de câncer de melanoma exemplares incluem MART-1 (por exemplo, peptídeo MART-1 26-35, peptídeo MART-1 27-35); MART-1/Melan A; pMel17; pMel17/gp100; gp100 (por exemplo, gp 100 ptido 280-288, gp 100 ptido 154-162, gp 100 ptido 457-467); TRP-1; TRP-2; NY-ESO-1; p16; beta-catenina; mãe-1; e similar.

[0570] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um peptídeo ras mutante ou selvagem. O peptídeo ras mutante pode ser um peptídeo K-ras mutante, um peptídeo N-ras mutante e/ou um peptídeo H-ras mutante. Mutações na proteína ras ocorrem tipicamente nas posições 12 (por exemplo, arginina ou valina substituída por glicina), 13 (por exemplo, asparagina por glicina), 61 (por exemplo, glutamina em leucina) e/ou 59. Os peptídeos ras mutantes podem ser úteis como antígenos de câncer de pulmão, antígenos de câncer gastrointestinal, antígenos de hepatoma, antígenos de câncer mieloide (por

exemplo, leucemia aguda, mielodisplasia), antígenos de câncer de pele (por exemplo, melanoma, célula basal, célula escamosa), antígenos de câncer de bexiga, antígenos de câncer de cólon, antígenos de câncer colorretal, e antígenos de câncer de células renais.

[0571] Em certas concretizações, o antígeno tumoral é um peptídeo p53 mutante e/ou de tipo selvagem. O peptídeo p53 pode ser usado como antígenos de câncer de cólon, antígenos de câncer de pulmão, antígenos de câncer de mama, antígenos de câncer de carcinoma hepatocelular, antígenos de câncer de linfoma, antígenos de câncer de próstata, antígenos de câncer de tireoide, antígenos de câncer de bexiga, antígenos de câncer pancreático e antígenos de câncer de ovário.

[0572] Outros antígenos tumorais são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, um antígeno associado a glioma, antígeno carcinoembrionário (CEA), gonadotrofina coriônica humana β , alfafetoproteína (AFP), AFP reativo à lectina, tiroglobulino, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptase reversa da telomerase humana, RU1, RU2 (AS), carboxiesterase intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, próstase, antígeno específico da próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, tirosinase, prosteína, PSMA, ras, Her2/neu, TRP-1, TRP-2, TAG-72, KSA, CA-125, PSA, BRCI, BRC-II, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, survivina e telomerase, antígeno-1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, GAGE, GP-100, MUC-1, MUC-2, ELF2M, elastase de neutrófilos, ephrinB2, CD22, fator de crescimento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor IGF-I e mesotelina,

[0573] Em certas concretizações, o antígeno tumoral compreende um ou mais epítomos antigênicos de câncer associados a um tumor maligno. Os tumores malignos expressam

várias proteínas que podem servir como antígenos alvo para um ataque imunológico. Estas moléculas incluem, mas não estão limitadas a antígenos específicos de tecido, como MART-1, tirosinase e GP 100 no melanoma e fosfatase ácida da próstata (PAP) e antígeno específico da próstata (PSA) no câncer de próstata. Outras moléculas alvo pertencem ao grupo de moléculas relacionadas à transformação, como o oncogene HER-2/Neu ErbB-2. Ainda outro grupo de antígenos-alvo são antígenos onco-fetais, como antígeno carcinoembrionário (CEA). No linfoma de células B, a imunoglobulina idiótipo específica do tumor constitui um antígeno de imunoglobulina verdadeiramente específico do tumor que é único para o tumor individual. Antígenos de diferenciação de células B, como CD19, CD20 e CD37, são outros candidatos a antígenos alvo no linfoma de células B. Alguns desses antígenos (CEA, HER-2, CD19, CD20, idiótipo) têm sido usados como alvos para imunoterapia passiva com anticorpos monoclonais com sucesso limitado.

[0574] O antígeno tumoral também pode ser um antígeno tumor-específico (TSA) ou um antígeno tumor-associado (TAA). Um TSA é exclusivo para células tumorais e não ocorre em outras células do corpo. Um antígeno associado ao TAA não é exclusivo de uma célula tumoral e, em vez disso, também é expresso em uma célula normal sob condições que não induzem um estado de tolerância imunológica ao antígeno. A expressão do antígeno no tumor pode ocorrer em condições que permitem ao sistema imunológico responder ao antígeno. Os TAAs podem ser antígenos que são expressos em células normais durante o desenvolvimento fetal quando o sistema imunológico é imaturo e incapaz de responder ou podem ser antígenos que estão

normalmente presentes em níveis extremamente baixos em células normais, mas que são expressos em níveis muito mais elevados em células tumorais.

[0575] Exemplos não limitativos de antígenos TSA ou TAA incluem os seguintes: Antígenos de diferenciação, como MART-1/MelanA (MART-1), Pmel 17, tirosinase, TRP-1, TRP-2 e antígenos de multilinhagem específicos de tumor, como MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, pi 5; antígenos embrionários superexpressos, como CEA; oncogenes superexpressos e genes supressores de tumor mutados, tais como p53, Ras, HER-2/neu; antígenos tumorais únicos resultantes de translocações cromossômicas, como BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, 1GH-IGK, MYL-RAR; e antígenos virais, tais como os antígenos do vírus Epstein Barr EBVA e os antígenos do papilomavírus humano (HPV) E6 e E7. Outros grandes antígenos baseados em proteínas incluem TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE- 6, RAGE, NY-ESO, pl85erbB2, pl 80erbB-3, c-met, nm-23H 1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4 (791Tgp72} alfa-fetoproteína, beta -HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\I, CO-029, FGF-5, G250, Ga733VEpCAM, HTgp- 175, M344, MA-50, MG7- Ag, MOV 18, NB/70K, NY-CO- 1, RCAS 1, SDCCAG16, proteína de ligação TA-90\Mac-2, proteína associada a aciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP e TPS.

[0576] Em certas concretizações, o antígeno associado ao tumor é determinado por sequenciamento de células tumorais de um paciente e identificação de proteínas mutadas encontradas apenas no tumor. Esses antígenos são chamados de "neoantígenos". Uma vez que um neoantígeno foi identificado, anticorpos terapêuticos podem ser produzidos contra ele e

usados nos métodos aqui descritos.

[0577] O anticorpo terapêutico pode ser um fragmento de um anticorpo; um complexo compreendendo um anticorpo; ou um conjugado compreendendo um anticorpo. O anticorpo pode ser opcionalmente quimérico ou humanizado ou totalmente humano.

III. Bloqueio de ponto de verificação imunológico

[0578] Em alguns aspectos, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras a serem usadas ou realizadas em conjunto com inibidores de checkpoint imunológico ou bloqueadores de checkpoint imunológico.

[0579] A ativação das células T e as funções efetoras são equilibradas por sinais coestimuladores e inibitórios, denominados "pontos de controle imunológicos". Ligantes e receptores inibitórios que regulam as funções efetoras das células T são superexpressos nas células tumorais. Subsequentemente, agonistas de receptores coestimuladores ou antagonistas de sinais inibitórios resultam na amplificação de respostas de células T específicas para antígenos. Em contraste com os anticorpos terapêuticos que têm como alvo as células tumorais diretamente, o bloqueador do ponto de controle imunológico aumenta a atividade antitumoral endógena. Em certas concretizações, o bloqueador de ponto de verificação imunológico adequado para uso nos métodos aqui divulgados é um antagonista de sinais inibidores, por exemplo, um anticorpo que tem como alvo, por exemplo, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, B7- H3, B7-H4 ou TIM3. Estes ligandos e receptores são revistos em Pardoll, D., Nature. 12: 252-264, 2012.

[0580] Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de verificação imunológico é um anticorpo ou uma porção de

ligação ao antígeno do mesmo, que interrompe ou inibe a sinalização de um imunorregulador inibitório. Em certas concretizações, o bloqueador do ponto de verificação imunológico é uma pequena molécula que interrompe ou inibe a sinalização de um imunorregulador inibitório.

[0581] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório (bloqueador de ponto de verificação imunológico) é um componente da via de sinalização PD-1/PD-L1. Consequentemente, certas concretizações da divulgação fornecem métodos para imunoterapia de um sujeito que sofre de câncer, métodos esses que compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que interrompe a interação entre o receptor PD-1 e seu ligante, PD-L1. Os anticorpos conhecidos na técnica que se ligam a PD-1 e interrompem a interação entre o PD-1 e seu ligante, PD-L1, e estimulam uma resposta imune antitumoral, são adequados para uso nos métodos aqui divulgados. Em certas concretizações, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente a PD-1. Por exemplo, os anticorpos que têm como alvo PD-1 e estão em ensaios clínicos incluem, por exemplo, nivolumabe (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb) e pembrolizumabe (lambrolizumabe, MK03475, Merck). Outros anticorpos adequados para uso nos métodos aqui divulgados são os anticorpos anti-PD-1 divulgados na Patente U.S. nº 8.008.449, aqui incorporada por referência. Em certas concretizações, o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo se liga especificamente a PD-L1 e inibe sua interação com PD-1, aumentando assim a atividade imunológica. Os anticorpos conhecidos na técnica que se ligam a PD-L1 e

interrompem a interação entre PD-1 e PD-L1, e estimulam uma resposta imune antitumoral, são adequados para uso nos métodos aqui divulgados. Por exemplo, os anticorpos que têm como alvo PD-L1 e estão em ensaios clínicos, incluem BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) e MPDL3280A (Genetech). Outros anticorpos adequados que têm como alvo PD-L1 são divulgados na Patente U.S. No. 7.943.743. Será entendido por um versado comum que qualquer anticorpo que se liga a PD-1 ou PD-L1, interrompe a interação PD-1/PD-L1 e estimula uma resposta imune antitumoral, é adequado para uso nos métodos divulgado aqui.

[0582] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização CTLA-4. Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem métodos para imunoterapia de um sujeito que sofre de câncer, métodos esses que compreendem administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo CTLA-4 e interrompe sua interação com CD80 e CD86. Anticorpos exemplares que têm como alvo CTLA-4 incluem ipilimumabe (MDX-010, MDX-101, Bristol-Myers Squibb), que é aprovado pela FDA, e tremelimumabe (ticilimumabe, CP-675, 206, Pfizer), atualmente em testes em humanos. Outros anticorpos adequados que têm como alvo CTLA-4 são divulgados em WO 2012/120125, Patentes US No. 6,984,720, No. 6,682,7368 e Pedidos de Patente US 2002/0039581, 2002/0086014 e 2005/0201994, aqui incorporados por referência. Será entendido por um versado na técnica que qualquer anticorpo que se liga a CTLA-4, interrompe sua interação com CD80 e CD86 e estimula uma resposta imune antitumoral, é adequado para uso nos métodos

aqui divulgados.

[0583] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização LAG3 (gene 3 de ativação de linfócitos). Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem métodos para imunoterapia de um sujeito que sofre de câncer, métodos esses que compreendem administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo LAG3 e interrompe sua interação com MHC de classe II moléculas. Um anticorpo exemplar que tem como alvo LAG3 é IMP321 (Immutep), atualmente em testes em humanos. Outros anticorpos adequados que têm como alvo LAG3 são divulgados no Pedido de Patente U.S. 2011/0150892, aqui incorporado por referência. Será entendido por um versado comum que qualquer anticorpo que se liga a LAG3, interrompe sua interação com moléculas de MHC de classe II e estimula uma resposta imune antitumoral, é adequado para uso nos métodos aqui divulgados.

[0584] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização da família B7. Em certas concretizações, os membros da família B7 são B7-H3 e B7-H4. Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem métodos para imunoterapia de um sujeito que sofre de câncer, métodos esses que compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo B7-H3 ou H4. A família B7 não tem nenhum receptor definido, mas esses ligantes são regulados positivamente em células tumorais ou células infiltrantes de tumor. Modelos de camundongos pré-clínicos demonstraram que o

bloqueio desses ligantes pode aumentar a imunidade antitumoral. Um anticorpo exemplar que tem como alvo B7-H3 é MGA271 (Macrogenics), atualmente em fase de testes em humanos. Outros anticorpos adequados que têm como alvo LAG3 são divulgados no Pedido de Patente U.S. 2013/0149236, aqui incorporado por referência. Será entendido por um versado na técnica que qualquer anticorpo que se liga a B7-H3 ou H4, e estimula uma resposta imune antitumoral, é adequado para uso nos métodos aqui divulgados.

[0585] Em certas concretizações, o imunorregulador inibitório é um componente da via de sinalização TIM3 (proteína 3 da membrana da célula T). Por conseguinte, certas concretizações da divulgação fornecem métodos para imunoterapia de um sujeito que sofre de câncer, métodos esses que compreendem a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo que tem como alvo LAG3 e interrompe sua interação com a galectina 9. Os anticorpos adequados que têm como alvo TIM3 são divulgados no Pedido de Patente US 2013/0022623, aqui incorporado por referência. Será entendido por um versado comum que qualquer anticorpo que se liga a TIM3, interrompe sua interação com a galectina 9 e estimula uma resposta imune antitumoral, é adequado para uso nos métodos aqui divulgados.

[0586] Deve ser entendido que os anticorpos direcionados a pontos de controle imunológicos adequados para uso nos métodos divulgados neste documento não estão limitados aos descritos supra. Além disso, será entendido por aqueles versados na técnica que outros alvos de ponto de verificação imune também podem ser direcionados por antagonistas ou

anticorpos nos métodos descritos neste documento, desde que o direcionamento resulte na estimulação de uma resposta imune antitumoral conforme refletido em, por exemplo, um aumento na proliferação de células T, ativação de células T aumentada e/ou produção aumentada de citocinas (por exemplo, IFN- γ , IL-2).

IV. Vacina contra câncer

[0587] Em alguns aspectos, a divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras a serem utilizadas ou realizadas em conjunto com uma vacina contra o câncer. Em certas concretizações, a vacina contra o câncer estimula uma resposta imune específica contra um alvo específico, como um antígeno associado a tumor.

[0588] Em certas concretizações, a vacina contra o câncer inclui vetores virais, bacterianos ou de levedura para entregar genes recombinantes a células apresentadoras de antígeno (APCs).

[0589] Em certas concretizações, a vacina contra o câncer usa células tumorais autólogas ou alogênicas. Em certas concretizações, essas células tumorais podem ser modificadas para a expressão de MHC, moléculas coestimulatórias ou citocinas.

[0590] Em certas concretizações, o antígeno associado ao tumor é determinado por sequenciamento de células tumorais de um paciente e identificação de proteínas mutadas encontradas apenas no tumor. Esses antígenos são chamados de "neoantígenos". Uma vez que um neoantígeno foi identificado, ele pode ser usado como o antígeno para uma vacina ou para desenvolver anticorpos monoclonais especificamente reativos com o neoantígeno.

[0591] Em certas concretizações, a vacina inclui células tumorais irradiadas transduzidas com citocinas, como GM-CSF ou carregadas com compostos adjuvantes, como a vacina de células tumorais secretoras de GM-CSF GVAX (Immunological Reviews, 222 (1): 287-298, 2008) Em certas concretizações, a vacina inclui um ou mais antígenos associados a tumor na forma de uma composição imunogênica, opcionalmente em combinação com um adjuvante. Por exemplo, a vacinação contra as oncoproteínas HPV-16 resultou em resultados clínicos positivos para neoplasia intraepitelial vulvar (The New England Journal of Medicine, 361 (19), 1838-1847, 2012). Além disso, a resposta imune multipeptídica à vacina contra o câncer IMA901 após a ciclofosfamida em dose única se associa a uma sobrevida mais longa do paciente (Nature Medicine, 18 (8): 1254-61, 2012). Alternativamente, uma abordagem baseada em DNA pode ser usada para imunizar um paciente com um ou mais antígenos associados a tumor. A imunidade tumoral melhorada é observada usando uma vacina de DNA em combinação com um anticorpo monoclonal anti-tirosinase relacionado à proteína-1 em melanoma murino (Cancer Research, 68 (23), 9884-9891, 2008).

[0592] Outras abordagens de vacina utilizam células imunes do paciente, como células dendríticas que podem ser cultivadas com um antígeno associado a tumor para produzir células apresentadoras de antígeno que irão estimular o sistema imunológico e direcionar o antígeno de interesse. Uma vacina atual para o tratamento do câncer aprovada pela FDA usando esta abordagem é Provenge® (Dendreon), aprovada para uso em alguns homens com câncer de próstata metastático. Esta vacina estimula uma resposta imune à fosfatase ácida

prostática (PAP), um antígeno encontrado na maioria das células cancerosas da próstata. A vacina é criada isolando células imunológicas de um paciente específico e cultivando células dendríticas com PAP para produzir células apresentadoras de antígenos que irão estimular o sistema imunológico e direcionar PAP. Estas e outras vacinas contra o câncer podem ser usadas em combinação com outros tratamentos, conforme descrito neste documento.

A. Vacinas anfifílicas

[0593] Em algumas concretizações, a vacina contra o câncer adequada para uso com as proteínas de fusão imunomoduladoras aqui descritas é uma vacina anfifílica, conforme descrito em US 2013/0295129, aqui incorporado por referência. Uma vacina anfifila combina um lipídio de ligação à albumina e um antígeno peptídico ou adjuvante molecular para direcionar o peptídeo ou adjuvante aos nódulos linfáticos in vivo. Os conjugados lipídicos se ligam à albumina endógena, que os direciona para os linfáticos e linfonodos de drenagem, onde se acumulam devido à filtração da albumina pelas células apresentadoras de antígenos. Quando o conjugado lipídico inclui um peptídeo antigênico ou adjuvante molecular, os conjugados induzem ou aumentam uma resposta imune robusta.

[0594] Conjugados direcionados a linfonodos tipicamente incluem três domínios: um domínio de ligação de albumina altamente lipofílico (por exemplo, um lipídio de ligação de albumina), uma carga como um adjuvante molecular ou um antígeno de peptídeo e um ligante de bloco polar, que promove a solubilidade de o conjugado e reduz a capacidade do lípido de se inserir nas membranas plasmáticas celulares. Por conseguinte, em certas concretizações, a estrutura geral do

conjugado é L-P-C, onde "L" é um lipídio de ligação à albumina, "P" é um bloco polar e "C" é uma carga, como um adjuvante molecular ou um polipeptídeo. Em algumas concretizações, a própria carga também pode servir como domínio de bloco polar e um domínio de bloco polar separado não é necessário. Portanto, em certas concretizações, o conjugado tem apenas dois domínios: um lipídio de ligação à albumina e uma carga.

[0595] A carga dos conjugados adequados para uso nos métodos aqui divulgados é tipicamente um adjuvante molecular, tal como um oligonucleotídeo imunoestimulador ou um antígeno peptídico. No entanto, a carga também pode ser outros oligonucleotídeos, peptídeos, agonistas do receptor Toll-like ou outros compostos imunomoduladores, corantes, agentes de contraste de MRI, fluoróforos ou drogas de moléculas pequenas que requerem tráfego eficiente para os nódulos linfáticos.

[0596] Em certas concretizações, os conjugados lipídeo-oligonucleotídeo incluem um oligonucleotídeo imunoestimulador que é conjugado diretamente a um lipídeo ou está ligado a um ligante que é conjugado a um lipídeo. Outras concretizações são direcionadas a conjugados lipídeo-peptídeo que incluem um peptídeo antigênico conjugado diretamente a um lipídeo, ou está ligado a um ligante que é conjugado a um lipídeo.

Lipídios

[0597] Os conjugados de lipídios incluem tipicamente um lipídio hidrofóbico. O lipídio pode ser linear, ramificado ou cíclico. O lípido tem de preferência pelo menos 17 a 18 carbonos de comprimento, mas pode ser mais curto se mostrar boa ligação à albumina e direcionamento adequado para os nódulos linfáticos. Conjugados direcionados a linfonodos

incluem conjugados lipídio-oligonucleotídeo e conjugados lipídio-peptídeo que podem ser transportados do local de entrega através da linfa para o linfonodo. Em certas concretizações, a atividade depende, em parte, da capacidade do conjugado de se associar à albumina no sangue do sujeito. Portanto, os conjugados direcionados aos linfonodos normalmente incluem um lipídio que pode se ligar à albumina em condições fisiológicas. Os lipídios adequados para direcionar o linfonodo podem ser selecionados com base na capacidade do lipídio ou de um conjugado de lipídio incluindo o lipídio para se ligar à albumina. Métodos adequados para testar a capacidade do lípido ou conjugado de lípido para se ligar à albumina são conhecidos na técnica.

[0598] Por exemplo, em certas concretizações, uma pluralidade de conjugados de lipídios pode formar micelas espontaneamente em solução aquosa. As micelas são incubadas com albumina, ou uma solução incluindo albumina, como Fetal Bovine Serum (FBS). As amostras podem ser analisadas, por exemplo, por ELISA, cromatografia de exclusão de tamanho ou outros métodos para determinar se a ligação ocorreu. Conjugados lipídicos podem ser selecionados como conjugados de direcionamento a linfonodos se na presença de albumina, ou uma solução incluindo albumina, tal como Soro Bovino Fetal (FBS), as micelas se dissociam e os conjugados lipídicos se ligam à albumina como discutido acima.

[0599] Exemplos de lipídios preferidos para uso em conjugados de lipídios direcionados a linfonodos incluem, mas não estão limitados a, ácidos graxos com caudas alifáticas de 8-30 carbonos, incluindo, mas não se limitando a, ácidos graxos lineares insaturados e saturados, ácidos graxos

ramificados saturados e insaturados e derivados de ácidos graxos, tais como ésteres de ácidos graxos, amidas de ácidos graxos e tioésteres de ácidos graxos, diacil-lipídeos, colesterol, derivados de colesterol e ácidos esteróides, tais como ácidos biliares, lipídeo A ou combinações dos mesmos.

[0600] Em certas concretizações, o lipídio é um diacil-lipídio ou lipídio de duas caudas. Em algumas concretizações, as caudas no diacil-lipídio contêm cerca de 8 a cerca de 30 carbonos e podem ser saturadas, insaturadas ou combinações dos mesmos. As caudas podem ser acopladas ao grupo principal por meio de ligações de ligação éster, ligações de ligação amida, ligações de ligação tioéster ou combinações das mesmas. Em uma concretização particular, os diacil-lipídios são fosfato de lipídios, glicolipídios, esfingolipídios ou combinações dos mesmos.

[0601] De preferência, os conjugados direcionados a linfonodos incluem um lipídio que tem 8 ou mais unidades de carbono de comprimento. Acredita-se que o aumento do número de unidades lipídicas pode reduzir a inserção do lipídeo na membrana plasmática das células, permitindo que o conjugado lipídico permaneça livre para se ligar à albumina e trafegar para o linfonodo.

[0602] Por exemplo, o lípido pode ser um diacil-lípido composto por duas caudas de hidrocarboneto C18.

Em certas concretizações, o lipídio para uso na preparação de conjugados de lipídios direcionados a linfonodos não é um hidrocarboneto de cadeia única (por exemplo, C18) ou colesterol. A conjugação de colesterol foi explorada para aumentar a imunomodulação de adjuvantes moleculares, como CpG e imunogenicidade de peptídeos, mas os conjugados de

colesterol, que se associam bem com lipoproteínas, mas fracamente com albumina, mostram direcionamento de linfonodo pobre e baixa imunogenicidade em vacinas em comparação com a ligação ideal de albumina conjugados.

Adjuvantes Moleculares

[0603] Em certas concretizações, os conjugados lipídio-oligonucleotídeos são usados na vacina. Os conjugados de oligonucleotídeos normalmente contêm um oligonucleotídeo imunoestimulador.

[0604] Em certas concretizações, o oligonucleotídeo imunoestimulador pode servir como um ligante para receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Exemplos de PRRs incluem a família Toll-like de moléculas de sinalização que desempenham um papel na iniciação de respostas imunes inatas e também influenciam as respostas imunes adaptativas mais tardias e específicas do antígeno. Portanto, o oligonucleotídeo pode servir como um ligante para uma molécula de sinalização da família do tipo Toll, como o receptor 9 do tipo Toll (TLR9).

[0605] Por exemplo, locais CpG não metilados podem ser detectados por TLR9 em células dendríticas plasmocitoides e células B em humanos (Zaida, et al., Infection and Immunity, 76 (5): 2123-2129, (2008)). Portanto, a sequência de oligonucleotídeo pode incluir um ou mais motivos dinucleotídicos de citosina-guanina não metilada (CG ou CpG, usados de forma intercambiável). O 'p' refere-se à estrutura fosfodiéster do DNA, conforme discutido em mais detalhes abaixo, alguns oligonucleotídeos incluindo CG podem ter uma estrutura modificada, por exemplo, uma estrutura fosforotioato (PS). Em certas concretizações, um

oligonucleotídeo imunoestimulador pode conter mais de um dinucleotídeo CG, organizado de forma contígua ou separado por nucleotídeo (s) interveniente (s). O (s) motivo (s) CpG podem estar no interior da sequência de oligonucleotídeo. Numerosas sequências de nucleotídeos estimulam TLR9 com variações no número e localização de dinucleotídeo (s) CG, bem como as sequências de base precisas que flanqueiam os dímeros de CG.

[0606] Tipicamente, os ODNs CG são classificados com base na sua sequência, estruturas secundárias e efeito nas células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs). As cinco classes são Classe A (Tipo D), Classe B (Tipo K), Classe C, Classe P e Classe S (Vollmer, J & Krieg, AM, revisões de entrega avançada de drogas 61 (3): 195-204 (2009), aqui incorporado por referência). CG ODNs podem estimular a produção de interferons Tipo I (por exemplo, IFN α) e induzir a maturação de células dendríticas (DCs). Algumas classes de ODNs também são ativadores fortes de células assassinas naturais (NK) por meio da sinalização indireta de citocinas. Algumas classes são fortes estimuladores de células B humanas e maturação de monócitos (Weiner, GL, PNAS USA 94 (20): 10833-7 (1997); Dalpke, AH, Immunology 106 (1): 102-12 (2002); Hartmann, G, J of Immun. 164 (3): 1617-2 (2000), cada um dos quais é aqui incorporado por referência).

[0607] De acordo com algumas concretizações, um conjugado de oligonucleotídeo lipofílico-CpG é usado para aumentar uma resposta imune a um antígeno peptídico. O oligonucleotídeo CpG lipofílico é representado pelo seguinte, em que "L" é um composto lipofílico, tal como diacil-lipídeo, "Gn" é um ligante de repetição de guanina e "n" representa 1, 2, 3, 4

ou 5.

5'-L-GnTCCATGACGTTCTGACGTT-3'

[0608] Outros receptores PRR Toll-like incluem TLR3 e TLR7 que podem reconhecer RNA de fita dupla, RNAs de fita simples e de fita dupla curta, respectivamente, e receptores do tipo I (RIG-I) indutíveis por ácido retinóico, a saber, RIG- I e o gene 5 associado à diferenciação do melanoma (MDA5), que são mais conhecidos como receptores de detecção de RNA no citosol. Portanto, em certas concretizações, o oligonucleotídeo contém um ligante funcional para receptores TLR3, TLR7 ou semelhantes a RIG-I, ou combinações dos mesmos.

[0609] Exemplos de oligonucleótidos imunoestimuladores e métodos para os preparar são conhecidos na arte, ver, por exemplo, Boder, P. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 5 (1): 87-93 (2011), aqui incorporado por referência.

[0610] Em certas concretizações, a carga de oligonucleotídeo inclui duas ou mais sequências imunoestimuladoras.

[0611] O oligonucleotídeo pode ter entre 2-100 bases de nucleotídeo de comprimento, incluindo, por exemplo, 5 bases de nucleotídeo de comprimento, 10 bases de nucleotídeo de comprimento, 15 bases de nucleotídeo de comprimento, 20 bases de nucleotídeo de comprimento, 25 bases de nucleotídeo de comprimento, 30 bases de nucleotídeo de comprimento, 35 bases de nucleotídeos de comprimento, 40 bases de nucleotídeos de comprimento, 45 bases de nucleotídeos de comprimento, 50 bases de nucleotídeos de comprimento, 60 bases de nucleotídeos de comprimento, 70 bases de nucleotídeos de comprimento, 80 bases de nucleotídeos de comprimento, 90 bases de nucleotídeos de comprimento, 95 bases de

nucleotídeos de comprimento, 98 bases de nucleotídeos de comprimento, 100 bases de nucleotídeos de comprimento ou mais.

[0612] A extremidade 3 'ou a extremidade 5' dos oligonucleotídeos podem ser conjugadas ao bloco polar ou ao lipídeo. Em certas concretizações, a extremidade 5' do oligonucleotídeo está ligada ao bloco polar ou ao lipídeo.

[0613] Os oligonucleotídeos podem ser nucleotídeos de DNA ou RNA que tipicamente incluem uma base heterocíclica (base de ácido nucleico), uma porção de açúcar ligada à base heterocíclica e uma porção de fosfato que esterifica uma função hidroxila da porção de açúcar. Os principais nucleotídeos de ocorrência natural compreendem uracila, timina, citosina, adenina e guanina como as bases heterocíclicas, e ribose ou açúcar desoxirribose ligados por ligações fosfodiéster. Em certas concretizações, os oligonucleotídeos são compostos de análogos de nucleotídeos que foram quimicamente modificados para melhorar a estabilidade, meia-vida ou especificidade ou afinidade para um receptor alvo, em relação a uma contraparte de DNA ou RNA. As modificações químicas incluem modificação química de nucleobases, frações de açúcar, ligações de nucleotídeos ou combinações dos mesmos. Tal como aqui utilizado, "nucleotídeo modificado" ou "nucleotídeo modificado quimicamente" define um nucleotídeo que tem uma modificação química de um ou mais dos constituintes da base heterocíclica, fração de açúcar ou fração fosfato. Em certas concretizações, a carga do nucleotídeo modificado é reduzida em comparação com os oligonucleotídeos de DNA ou RNA da mesma sequência de nucleobase. Por exemplo, o oligonucleotídeo pode ter carga

negativa baixa, nenhuma carga ou carga positiva.

[0614] Normalmente, os análogos de nucleosídeos suportam bases capazes de ligação de hidrogênio por emparelhamento de bases de Watson-Crick com bases de polinucleotídeo padrão, onde a estrutura analógica apresenta as bases de maneira a permitir tal ligação de hidrogênio de uma forma específica de sequência entre a molécula de análogo de oligonucleotídeo e bases em um polinucleotídeo padrão (por exemplo, RNA de fita simples ou DNA de fita simples). Em certas concretizações, os análogos têm um esqueleto contendo fósforo substancialmente descarregado.

Antígenos Peptídicos

[0615] Os conjugados de peptídeos adequados para uso nos métodos aqui divulgados incluem tipicamente uma proteína ou polipeptídeo antigênico, tal como um antígeno associado a tumor ou porção do mesmo.

[0616] O peptídeo pode ter 2-100 aminoácidos, incluindo, por exemplo, 5 aminoácidos, 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, 25 aminoácidos, 30 aminoácidos, 35 aminoácidos, 40 aminoácidos, 45 aminoácidos, ou 50 aminoácidos. Em algumas concretizações, um peptídeo pode ter mais de 50 aminoácidos. Em algumas concretizações, o peptídeo pode ter >100 aminoácidos. Uma proteína/peptídeo pode ser linear, ramificada ou cíclica. O peptídeo pode incluir aminoácidos D, aminoácidos L ou uma combinação dos mesmos. O peptídeo ou proteína pode ser conjugado com o bloco polar ou lipídeo no terminal N ou no terminal C do peptídeo ou proteína.

[0617] A proteína ou polipeptídeo pode ser qualquer proteína ou peptídeo que pode induzir ou aumentar a

capacidade do sistema imunológico de desenvolver anticorpos e respostas de células T à proteína ou peptídeo. Um antígeno de câncer é um antígeno que é tipicamente expresso preferencialmente por células cancerosas (isto é, é expresso em níveis mais elevados em células cancerosas do que em células não cancerosas) e, em alguns casos, é expresso apenas por células cancerosas. O antígeno de câncer pode ser expresso dentro de uma célula cancerosa ou na superfície da célula cancerosa. O antígeno de câncer pode ser, mas não está limitado a, TRP-1, TRP-2, MART-1/Melan-A, gp100, proteína de ligação à adenosina desaminase (ADAbp), FAP, ciclofilina b, antígeno colorretal associado (CRC) -C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionário (CEA), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, antígeno específico da próstata (PSA), PSA-1, PSA-2, PSA-3, antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), receptor de células T/cadeia CD3-zeta e CD20. O antígeno de câncer pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-05), GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9, BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinase, p53, família MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-caderina, α -catenina, β -catenina, γ -catenina, p120ctn, gp100Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína adenomatosa polipose coli (APC), fodrin, Connexin 37, Ig-idiotipo, p15, gp75, gangliósido GM2, gangliósido GD2, proteínas do vírus do papiloma humano, família Smad de antígenos tumorais lmp-1, PlA, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glicogênio

fosforilase cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 e CT-7, CD20 ou c-erbB-2. Os antígenos cancerígenos adicionais incluem os antígenos tumorais aqui descritos.

[0618] Os antígenos adequados são conhecidos na técnica e estão disponíveis em fontes governamentais e científicas comerciais. Em certas concretizações, os antígenos são células tumorais inteiras inativadas ou irradiadas. Os antígenos podem ser polipeptídeos purificados ou parcialmente purificados derivados de tumores. Os antígenos podem ser polipeptídeos recombinantes produzidos pela expressão de DNA que codifica o antígeno polipeptídico em um sistema de expressão heterólogo. Os antígenos podem ser DNA que codifica a totalidade ou parte de uma proteína antigênica. O DNA pode estar na forma de DNA de vetor, tal como DNA de plasmídeo.

[0619] Em certas concretizações, os antígenos podem ser fornecidos como antígenos únicos ou podem ser fornecidos em combinação. Os antígenos também podem ser fornecidos como misturas complexas de polipeptídeos ou ácidos nucleicos.

Bloco Polar/Ligante ("Linker")

[0620] Para que o conjugado seja transportado de forma eficiente para o linfonodo, o conjugado deve permanecer solúvel. Portanto, um ligante de bloco polar pode ser incluído entre a carga e o lipídeo para aumentar a solubilidade do conjugado. O bloqueio polar reduz ou impede a capacidade do lipídio de se inserir na membrana plasmática das células, como as células no tecido adjacente ao local da injeção. O bloco polar também pode reduzir ou prevenir a capacidade de carga, tal como oligonucleotídeos sintéticos contendo uma estrutura de PS, de se associar não

especificamente com proteínas da matriz extracelular no local de administração. O bloco polar aumenta a solubilidade do conjugado sem impedir sua capacidade de se ligar à albumina. Acredita-se que essa combinação de características permite que o conjugado se ligue à albumina presente no soro ou fluido intersticial e permaneça em circulação até que a albumina seja transportada e retida em um linfonodo. O comprimento e a composição do bloco polar podem ser ajustados com base no lipídio e na carga selecionados. Por exemplo, para conjugados de oligonucleotídeo, o próprio oligonucleotídeo pode ser polar o suficiente para assegurar a solubilidade do conjugado, por exemplo, oligonucleotídeos que têm 10, 15, 20 ou mais nucleotídeos de comprimento. Portanto, em certas concretizações, nenhum ligante de bloco polar adicional é necessário. No entanto, dependendo da sequência de aminoácidos, alguns peptídeos lipidados podem ser essencialmente insolúveis. Nestes casos, pode ser desejável incluir um bloco polar que imita o efeito de um oligonucleotídeo polar.

[0621] Um bloco polar pode ser usado como parte de qualquer um dos conjugados lipídicos adequados para uso nos métodos aqui divulgados, por exemplo, conjugados lipídeo-oligonucleotídeo e conjugados lipídeo-peptídeo, que reduzem a inserção da membrana celular/porcionamento preferencial na albumina. Os blocos polares adequados incluem, mas não estão limitados a, oligonucleotídeos, tais como aqueles discutidos acima, um polímero hidrofílico incluindo, mas não limitado a poli (etilenoglicol) (MW: 500 Da a 20.000 Da), poliacrilamida (MW: 500 Da a 20.000 Da), ácido poliacrílico; uma cadeia de aminoácidos hidrofílicos, como serina, treonina, cisteína,

tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina, histidina ou combinações dos mesmos polissacarídeos, incluindo, mas não se limitando a, dextrano (MW: 1.000 Da a 2.000.000 Da), ou combinações dos mesmos.

[0622] O lipídio hidrofóbico e o ligante/carga estão covalentemente ligados. A ligação covalente pode ser uma ligação não clivável ou uma ligação clivável. A ligação não clivável pode incluir uma ligação amida ou ligação fosfato, e a ligação clivável pode incluir uma ligação dissulfeto, ligação clivável por ácido, ligação éster, ligação anidrido, ligação biodegradável ou ligação clivável por enzima.

a. Ligantes de etilenoglicol

[0623] Em certas concretizações, o bloco polar é uma ou mais unidades de etilenoglicol (EG), mais preferencialmente duas ou mais unidades de EG (isto é, polietilenoglicol (PEG)). Por exemplo, em certas concretizações, um conjugado de peptídeo inclui uma proteína ou peptídeo (por exemplo, antígeno de peptídeo) e um lipídio hidrofóbico ligado por uma molécula de polietilenoglicol (PEG) ou um derivado ou análogo deste.

[0624] Em certas concretizações, os conjugados de proteína adequados para uso nos métodos aqui divulgados contêm antígeno de proteína ligado a PEG que por sua vez está ligado a um lipídio hidrofóbico, ou conjugados de lipídio-Gn-ON, covalentemente ou via formação de conjugados de proteína-oligo que hibridizam para oligo micelas. O número preciso de unidades EG depende do lipídio e da carga, no entanto, normalmente, um bloco polar pode ter entre cerca de 1 e cerca de 100, entre cerca de 20 e cerca de 80, entre cerca de 30 e

cerca de 70, ou entre cerca de 40 e cerca de 60 unidades EG. Em certas concretizações, o bloco polar tem entre cerca de 45 e 55 unidades EG. Por exemplo, em certas concretizações, o bloco polar tem 48 unidades EG.

b. Ligantes de oligonucleotídeo

[0625] Conforme discutido acima, em certas concretizações, o bloco polar é um oligonucleotídeo. O ligante de bloco polar pode ter qualquer sequência, por exemplo, a sequência do oligonucleotídeo pode ser uma sequência aleatória ou uma sequência escolhida especificamente por suas propriedades moleculares ou bioquímicas (por exemplo, altamente polar). Em certas concretizações, o ligante de bloco polar inclui uma ou mais séries consecutivas de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracila (U) ou um análogo dos mesmos. Em certas concretizações, o ligante de bloco polar consiste em uma série de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), uracila (U) ou um análogo consecutivo dos mesmos.

[0626] Em certas concretizações, o ligante é uma ou mais guaninas, por exemplo, entre 1-10 guaninas. Foi descoberto que alterar o número de guaninas entre uma carga, como um oligonucleotídeo CpG, e uma cauda lipídica controla a estabilidade da micela na presença de proteínas séricas. Portanto, o número de guaninas no ligante pode ser selecionado com base na afinidade desejada do conjugado para proteínas do soro, como a albumina. Quando a carga é um oligonucleotídeo imunoestimulador CpG e a cauda lipídica é um diacil-lipídeo, o número de guaninas afeta a capacidade das micelas formadas em solução aquosa de se dissociar na presença de soro: 20% das micelas não estabilizadas (lipo-

G0T10 -CG) estavam intactos, enquanto os 80% restantes estavam rompidos e ligados com componentes FBS. Na presença de guaninas, o percentual de micelas intactas aumentou de 36% (lipo-G2T8-CG) para 73% (lipo-G4T6-CG) e, por fim, atingiu 90% (lipo-G6T4-CG). Aumentar o número de guaninas para oito (lipo-G8T2-CG) e dez (lipo-G10T0-CG) não aumentou ainda mais a estabilidade da micela.

[0627] Portanto, em certas concretizações, o ligante em um conjugado de direcionamento a linfonodo adequado para uso nos métodos aqui divulgados pode incluir 0, 1 ou 2 guaninas. Conforme discutido em mais detalhes abaixo, os ligantes que incluem 3 ou mais guaninas consecutivas podem ser usados para formar conjugados de estabilização de micela com propriedades que são adequadas para uso nos métodos aqui divulgados.

B. Composições Imunogênicas

[0628] Os conjugados adequados para uso nos métodos divulgados neste documento podem ser usados em composições imunogênicas ou como componentes em vacinas. Normalmente, as composições imunogênicas divulgadas neste documento incluem um adjuvante, um antígeno ou uma combinação dos mesmos. A combinação de um adjuvante e um antígeno pode ser referida como uma vacina. Quando administrados a um sujeito em combinação, o adjuvante e o antígeno podem ser administrados em composições farmacêuticas separadas ou podem ser administrados juntos na mesma composição farmacêutica. Quando administrado em combinação, o adjuvante pode ser um conjugado lipídico, o antígeno pode ser um conjugado lipídico, ou o adjuvante e o antígeno podem ser ambos conjugados lipídicos.

[0629] Uma composição imunogênica adequada para uso nos métodos aqui divulgados pode incluir um conjugado lipídico

que é um antígeno, tal como um conjugado polipeptídeo-lipídeo antigênico, administrado sozinho ou em combinação com um adjuvante. O adjuvante pode ser, sem limitação, alúmen (por exemplo, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio); saponinas purificadas a partir da casca da árvore Q. saponaria tal como QS21 (um glicolípido que elui no 21º pico com fracionamento por HPLC; Antigenics, Inc., Worcester, Mass.); poli [di (carboxilatofenoxi) fosfazeno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EUA), ligante Flt3, fator de alongamento de Leishmania (uma proteína de Leishmania purificada; Corixa Corporation, Seattle, Wash.), ISCOMS (complexos imunoestimulantes que contêm saponinas, lipídios e formar partículas do tamanho de vírus com poros que podem conter antígeno; CSL, Melbourne, Austrália), Pam3Cys, SB-AS4 (sistema adjuvante SmithKline Beecham # 4 que contém alúmen e MPL; SBB, Bélgica), copolímeros em bloco não iônicos que formam micelas como CRL 1005 (estes contêm uma cadeia linear de polioxipropileno hidrofóbico flanqueada por cadeias de polioxietileno, Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.) e Montanide IMS (por exemplo, IMS 1312, nanopartículas à base de água combinadas com um imunoestimulante solúvel, Seppic).

[0630] Os adjuvantes podem ser ligantes de TLR, como aqueles discutidos acima. Os adjuvantes que agem por meio de TLR3 incluem, sem limitação, RNA de fita dupla. Os adjuvantes que agem através do TLR4 incluem, sem limitação, derivados de lipopolissacarídeos, como monofosforil lipídeo A (MPLA; Ribí ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.) E muramil dipeptídeo (MDP; Ribí) e treonil-muramil dipeptídeo (t-MDP; Ribí); OM-174 (um dissacarídeo de glucosamina relacionado ao lipídeo A; OM Pharma SA, Meyrin, Suíça). Os adjuvantes que

agem por meio de TLR5 incluem, sem limitação, flagelina. Os adjuvantes que atuam através de TLR7 e/ou TLR8 incluem RNA de fita simples, oligoribonucleotídeos (ORN), compostos sintéticos de baixo peso molecular, tais como imidazoquinolinaminas (por exemplo, imiquimod (R-837), resiquimod (R-848)). Os adjuvantes que atuam através de TLR9 incluem DNA de origem viral ou bacteriana, ou oligodesoxinucleotídeos sintéticos (ODN), como CpG ODN. Outra classe de adjuvantes são moléculas contendo fosforotioato, tais como análogos de nucleotídeos de fosforotioato e ácidos nucleicos contendo ligações de estrutura de fosforotioato.

[0631] O adjuvante também pode ser emulsões de óleo (por exemplo, adjuvante de Freund); formulações de saponinas; virossomas e partículas semelhantes a vírus; derivados bacterianos e microbianos; oligonucleotídeos imunoestimuladores; Toxinas ribosilantes de ADP e derivados desintoxicados; alúmen; BCG; composições contendo minerais (por exemplo, sais minerais, tais como sais de alumínio e sais de cálcio, hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc.); bioadesivos e/ou mucoadesivos; micropartículas; lipossomas; formulações de éter de polioxietileno e éster de polioxietileno; polifosfazeno; peptídeos de muramilo; compostos de imidazoquinolona; e substâncias tensoativas (por exemplo, lisolecitina, polióis plurônicos, polianions, peptídeos, emulsões de óleo, hemocianina de lapa e dinitrofenol).

[0632] Os adjuvantes também podem incluir imunomoduladores, tais como citocinas, interleucinas (por exemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferons (por exemplo, interferon-gamma), fator estimulador de colônias de

macrófagos e fator de necrose tumoral.

Kits

[0633] Em alguns aspectos, a divulgação fornece kits que compreendem pelo menos uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita e instruções de uso. Em algumas concretizações, os kits compreendem, em um recipiente adequado, uma proteína de fusão imunomoduladora, um ou mais controles e vários tampões, reagentes, enzimas e outros ingredientes padrão bem conhecidos na técnica. Em algumas concretizações, os kits compreendem ainda instruções para uso em combinação com uma imunoterapia.

[0634] Em algumas concretizações, o recipiente é pelo menos um frasco, poço, tubo de ensaio, frasco, garrafa, seringa ou outro meio de recipiente, no qual uma proteína de fusão imunomoduladora pode ser colocada e, em alguns casos, adequadamente aliquotada. Quando um componente adicional é fornecido, o kit pode conter recipientes adicionais nos quais este composto pode ser colocado. Os kits também podem incluir um meio para conter uma proteína de fusão imunomoduladora e quaisquer outros recipientes de reagente em confinamento fechado para venda comercial. Esses recipientes podem incluir recipientes de plástico moldado por injeção ou por sopro nos quais os frascos desejados são retidos. Os recipientes e/ou kits podem incluir rotulagem com instruções de uso e/ou advertências.

[0635] Em algumas concretizações, a divulgação fornece um kit que compreende um recipiente que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita, um transportador farmacologicamente aceitável opcional e uma bula que compreende instruções para a administração da composição para

tratar ou retardar a progressão do câncer em um indivíduo que recebe uma imunoterapia (por exemplo, células CAR-T, vacina contra o câncer, anticorpo antígeno associado a antitumorais e/ou bloqueio do ponto de verificação imunológico).

[0636] Em algumas concretizações, a divulgação fornece um kit que compreende um medicamento que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora aqui descrita, um transportador farmacologicamente aceitável opcional e uma bula que compreende instruções para a administração do medicamento sozinho ou em combinação com uma imunoterapia (por exemplo, CAR-T células, vacina contra o câncer, anticorpo antígeno associado a antitumoral e/ou bloqueio do ponto de verificação imunológico), para tratar ou retardar a progressão do câncer em um indivíduo que recebe terapia com células CAR-T.

Outras concretizações - Proteínas de fusão de ligação a IgG de ligação a colágeno

[0637] Em outro aspecto, a divulgação fornece proteínas de fusão de ligação a colágeno de ligação a IgG compreendendo um domínio de ligação a Ig e um domínio de ligação a colágeno. As proteínas de fusão de ligação a colágeno de ligação a IgG fornecidas pela divulgação se ligam a uma IgG (por exemplo, uma IgG imunomoduladora) e ao colágeno, localizando ou sequestrando assim a IgG dentro de um tumor quando administrada.

[0638] Em algumas concretizações, o domínio de ligação ao colágeno é um domínio de ligação ao colágeno conforme descrito supra. Os domínios de ligação de IgG exemplares incluem um domínio Z dimerizado (um dos cinco domínios de ligação de IgG da proteína A, aqui referido como "ZZ") (Jendeborg et al., (1995) J Mol Recognit 8: 270-278), um

domínio de ligação de IgG dimerizado da proteína G (aqui referido como "SpG2") (Jung et al., (2009) Anal Chem 81: 936-942), um ligante IgG isolado de uma biblioteca de exibição de levedura Sso7d (Gera et al., (2011) J Mol Biol 409: 601-616), um ligante IgG isolado de uma biblioteca de exibição de levedura de domínio Fibronectina tipo III (Fn3) (Hackel et al., (2010) J Mol Biol 401: 84-96), e dois pequenos peptídeos concebidos para ligar regiões Fc de IgG (aqui referidas como "Fc-III-4C" e "RRGW") (Gong et al., (2015) Bioconjug Chem 27: 1569-1573; Tsai et al., (2014) Anal Chem 86: 2931-2938).

[0639] Em algumas concretizações, a proteína de fusão de ligação ao colágeno de ligação a IgG é adequada para uso em qualquer um dos métodos aqui descritos. Em algumas concretizações, a proteína de fusão de ligação a colágeno de ligação a IgG é usada em combinação com um anticorpo terapêutico (por exemplo, um anticorpo imunomodulador). Em algumas concretizações, a proteína de fusão de ligação a colágeno de ligação a IgG é administrada em combinação com um anticorpo terapêutico para o tratamento de câncer.

EXEMPLOS

[0640] Embora a presente divulgação tenha sido descrita com referência às concretizações específicas da mesma, deve ser entendido por aqueles versados na técnica que várias alterações podem ser feitas e equivalentes podem ser substituídos sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo da divulgação. Além disso, muitas modificações podem ser feitas para adaptar uma situação, material, composição de matéria, processo, etapa ou etapas de processo em particular ao objetivo, espírito e escopo da presente divulgação. Todas essas modificações devem estar dentro do escopo da

divulgação.

Exemplo 1: Expressão Recombinante de Proteínas de Fusão de Ligação ao Colágeno em Células de Mamíferos

[0641] Para avaliar a capacidade de expressar moléculas imunomoduladoras de ligação a colágeno em células de mamíferos, cinco polipeptídeos de ligação a colágeno marcados com His fundidos a Gaussia Luciferase (Gluc) (sonda de imagem de colágeno (CNA35-Gluc), domínios ColG de collagenase bacteriana s3a/s3b (ColG s3a/s3b-Gluc), o domínio de ligação à heparina do fator de crescimento da placenta murina-2 (PLGF2HBD-Gluc), o domínio ColH da collagenase bacteriana s3 (ColH s3-Gluc) e a proteína murina lumican (Lumican-Gluc)) foram expressos transitoriamente em embriões humanos células de rim 293 (HEK293). As sequências de aminoácidos para estes constructos são apresentadas em SEQ ID NOs: 128-132. Resumidamente, células HEK293 (a 1 milhão de células/mL de densidade) foram transfectadas com DNA de plasmídeo filtrado estéril (1 mg por litro de cultura de células) usando polietilenimina (2 mg por litro de cultura de células) em meio OptiPro sem soro (20 mL por litro cultura de células) (Thermo Fisher). TA99 foi purificado usando resina rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) conforme descrito anteriormente (Zhu et al. 2015). Proteínas marcadas com His foram isoladas do sobrenadante HEK293 usando TALON Metal Affinity Resin (Takara Bio Inc.). As proteínas de fusão de citocina foram então ainda purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho usando uma coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg em um sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare) que foi pré-tratado por 4 horas com NaOH 1 M para remover a endotoxina e posteriormente equilibrado em estéril PBS (Corning). Após a

purificação, todas as proteínas foram trocadas por tampão em PBS estéril (Corning), filtrado estéril de 0,2 micron (Pall Corporation) e confirmado para conter níveis mínimos de endotoxina (<0,1 EU por injeção) usando um ensaio LAL cromogênico (Lonza). Para confirmar seus pesos moleculares, as proteínas foram executadas ao lado de uma Escada de Proteína Sharp Prestained Novex em um gel de proteína NuPAGE Bis-Tris 4-12% (Life Technologies) com tampão de corrida MES a 1%. Todas as proteínas foram armazenadas a 4 ° C, mas, antes da injeção terapêutica, as proteínas de fusão de citocinas foram aquecidas à temperatura ambiente para resgatar lumican que demonstra desnaturação reversível a frio. Os níveis de expressão relativa das proteínas de fusão de ligação ao colágeno marcadas com His nos eluentes resultantes foram avaliados por SDS-PAGE e por espectrofotometria de absorção após cromatografia de exclusão de tamanho de eluentes de purificação de TALON.

[0642] Expressão transitória de Gluc (19,8 kDa) sozinho, bem como polipeptídeos de ligação ao colágeno fundido com Gluc ColG s3a/s3b-Gluc (46,1 kDa), ColH s3-Gluc (32,8 kDa) e Lumican-Gluc (56,6 kDa) em células HEK293 foi alcançado, conforme determinado por análise SDS-PAGE de proteínas marcadas com His purificadas a partir de lisados de células HEK. A coloração da proteína em ou perto do respectivo peso molecular esperado de cada proteína de fusão foi observada (dados não mostrados). No entanto, nenhuma expressão foi observada para CNA35-Gluc (54,4 kDa) ou PLGF2HBD-Gluc (22,8 kDa) conforme medido por SDS-PAGE de proteína purificada a partir de lisados de células HEK (dados não mostrados).

[0643] A expressão transitória de Gluc, ColG s3a/s3b-Gluc,

ColH s3-Gluc e Lumican-Gluc em células HEK293 foi alcançada, conforme determinado por espectrofotometria de absorção durante cromatografia de exclusão de tamanho de proteínas marcadas com His expressas de forma recombinante e purificadas. Um pico monomérico de absorção de radiação UV a 280 nm (A280) foi observado para cada proteína de fusão (dados não mostrados). Não foram detectados picos de absorvância para CNA35-Gluc ou PLGF2HBD-Gluc.

[0644] Além de lumican, outros polipeptídeos de ligação ao colágeno de mamíferos podem ser expressos como proteínas de fusão de ligação ao colágeno. O domínio extracelular da proteína do receptor 1 do tipo imunoglobulina associada a leucócitos de mamífero (LAIR-1) é conhecido por se ligar ao colágeno (Lebbink et al., (2006) J Exp Med 203 (6):1419-1425). A expressão transitória do domínio extracelular de LAIR-1 murino marcado com His (sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 181) em HEK293 como descrito acima foi alcançada, conforme determinado por espectrofotometria de absorção durante cromatografia de exclusão por tamanho de proteína expressa de forma recombinante. LAIR-1 eluiu como um pico monomérico medido pela absorção de radiação UV a 280 nm (A280) (dados não mostrados).

[0645] Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão de ligação ao colágeno compreendendo polipeptídeos de ligação ao colágeno procarióticos ou de mamífero expressam em células de mamífero. A expressão das proteínas de fusão de ligação ao colágeno marcadas com His ColG s3a/s3b-Gluc, ColH s3-Gluc e Lumican-Gluc, bem como Gluc sozinha em células HEK293 foi alcançada, enquanto a expressão de CNA35-Gluc ou PLGF2HBD-Gluc não foi observado. Além disso, o domínio

extracelular de LAIR-1 marcado com His em células HEK293 foi expresso e purificado. Estes resultados sugerem que as moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno compreendendo um polipeptídeo de ligação ao colágeno procariótico ou de mamífero (por exemplo, ColG s3a/s3b, ColH s3, Lumican ou LAIR) se expressarão em células de mamífero.

Exemplo 2: Proteínas de Fusão de Ligação ao Colágeno Recombinante Ligam o Colágeno *In Vitro*

[0646] Para avaliar a capacidade das moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno para se ligar ao colágeno, as proteínas de fusão de ligação ao colágeno expressas e purificadas conforme descrito no Exemplo 1 foram testadas quanto à sua capacidade de se ligar a placas revestidas com colágeno I e colágeno IV por ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços revestidas com colágeno I (Gibco) e colágeno IV (Corning) foram bloqueadas à temperatura ambiente por 1 hora com PBS +0,1% p/vol de albumina de soro bovino (BSA) + 0,05% p/vol de Tween-20 (PBSTA) e depois incubado com várias concentrações de lumican em PBSTA por 3 horas à temperatura ambiente. O lumican foi pré-aquecido por 10 minutos a 37 °C para reverter sua desnaturação mediada por baixas temperaturas. Os poços foram lavados com PBSTA e depois incubados com um anti-6xHis policlonal conjugado com peroxidase de rábano (ab1187, Abcam) a uma diluição de 1:4000 em PBSTA durante 1 hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente com PBSTA e, em seguida, a solução de substrato Ultra TMB-ELISA de 1 etapa (Thermo Fisher Scientific) foi adicionada por 10 minutos seguido por ácido sulfúrico 1 M para interromper a reação cromogênica. Absorbância a 450 nm (corrigida com uma

absorbância de referência a 570 nm) medida usando um leitor de microplacas Infinite M1000 (Tecan). Os poços com titulações de MSA serviram como controle negativo.

[0647] As proteínas de fusão de ligação ao colágeno marcadas com His purificadas Lumican-Gluc, ColG s3a/s3b-Gluc e ColH s3-Gluc foram avaliadas por ELISA em uma placa revestida com colágeno I. Como mostrado na FIG. 1A, apenas Lumican-Gluc e ColG s3a/s3b-Gluc se ligaram ao colágeno I com um KD de 130 nM e 139 nM, respectivamente. ColH s3-Gluc não se ligou ao colágeno I especificamente sobre a ligação de fundo de Gluc.

[0648] As proteínas de fusão de ligação ao colágeno marcadas com His purificadas Lumican-Gluc, ColG s3a/s3b-Gluc e ColH s3-Gluc foram avaliadas por ELISA em uma placa revestida com colágeno IV. Como mostrado na FIG. 1B, Lumican-Gluc ligado ao colágeno IV com um KD de 600 nM. ColG s3a/s3b-Gluc ou ColH s3-Gluc não se ligou ao colágeno IV especificamente sobre a ligação de fundo de Gluc.

[0649] LAIR-1 murino marcado com His purificado (deobservado como mLAIR1-His) e lumican biotinilado marcado com His (deobservado Lwt-His-b) foram avaliados quanto à ligação ao colágeno tipo I por ELISA em função da concentração. A ligação foi determinada por ELISA usando um anticorpo anti-His conjugado com peroxidase de rábano (HRP). Como mostrado na FIG. 1C, LAIR-1 e lumican tiveram afinidade de ligação semelhante ao colágeno tipo I. A ligação a uma placa bloqueada com albumina de soro bovino também foi avaliada por ELISA. Nenhuma ligação foi observada para nenhuma das proteínas, indicando que a ligação medida ao colágeno tipo I era específica.

[0650] Para demonstrar ainda a atividade de ligação ao colágeno dos polipeptídeos de ligação ao colágeno de mamíferos descritos acima, foi testada a capacidade do LAIR-1 marcado com His purificado e polipeptídeos de ligação ao colágeno lumican descritos no Exemplo 1 para se ligarem competitivamente ao colágeno. Resumidamente, placas de 96 poços de colágeno I (Gibco) foram bloqueadas à temperatura ambiente por 1 hora com PBS + 0,1% p/vol de albumina de soro bovino (BSA) + 0,05% p/vol de Tween-20 (PBSTA) e depois incubadas com várias concentrações de LAIR na presença de 50 nM de lumican biotinilado em PBSTA por 3 horas em temperatura ambiente. O lumican e o LAIR foram pré-aquecidos por 10 minutos a 37 °C para reverter sua desnaturação mediada por baixas temperaturas. Os poços foram lavados com PBSTA e depois incubados com estreptavidina-HRP policlonal conjugado com peroxidase de rábano a uma diluição de 1: 400 em PBSTA durante 1 hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente com PBSTA e, em seguida, a solução de substrato Ultra TMB-ELISA de 1 etapa (Thermo Fisher Scientific) foi adicionada por 10 minutos seguido por ácido sulfúrico 1 M para interromper a reação cromogênica. Absorbância a 450 nm (corrigida com uma absorbância de referência a 570 nm) medida usando um leitor de microplacas Infinite M1000 (Tecan). Os poços com titulações de MSA serviram como controle negativo. Os resultados de um ELISA de competição que detecta a ligação lumican na presença de concentração variável de LAIR em uma placa revestida com colágeno são mostrados na FIG. 1D.

[0651] Para avaliar a estabilidade de um polipeptídeo de ligação ao colágeno após a purificação, a atividade de ligação ao colágeno do lumican após descongelar de um estado

congelado em solução foi testada. Resumidamente, afinidade de colágeno I (KD) de lumican incubado com vários excipientes (trealose (T), BSA (B), colágeno (C), proteína sozinha (P)) em diferentes condições após o descongelamento do congelado: 37 C por 3 semanas (azul), 4 C por 3 semanas (cinza), 4 C por 2 semanas seguido de 37 por 1 semana (vermelho). A afinidade de ligação de lumican, na presença de excipiente (trealose, albumina de soro bovino e colágeno), ao colágeno I após o descongelamento do congelado foi determinada por ELISA como descrito anteriormente. A ligação de afinidade (KD) permaneceu semelhante, independentemente de qual excipiente foi usado. No entanto, a afinidade de ligação foi reduzida em aproximadamente 50 vezes se lumican não foi aquecido a 37°C antes da medição (dados não mostrados).

[0652] Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão de ligação ao colágeno compreendendo polipeptídeos de ligação ao colágeno procariótico (por exemplo, ColG s3a/s3b) ou de mamíferos (por exemplo, lumican) se ligam ao colágeno I (FIG. 1A). Estes resultados também demonstram que uma proteína de fusão de ligação ao colágeno compreendendo um polipeptídeo de ligação ao colágeno de mamífero (por exemplo, Lumican) se liga ao colágeno I e IV (FIG. 1B). Além disso, estes resultados demonstram que o domínio extracelular de LAIR-1 e lumican compete pela ligação ao colágeno I (FIG. 1C, 1D). Estes resultados sugerem que as moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno compreendendo polipeptídeos de ligação ao colágeno procariótico ou de mamíferos (por exemplo, ColG s3a/ s3b, lumican e LAIR-1) se ligarão ao colágeno.

Exemplo 3: Proteínas de fusão de ligação ao colágeno

recombinante são retidas após injeção intratumoral

[0653] Os colágenos do tipo I e IV são componentes da cápsula fibrótica espessa ao redor dos tumores e da membrana basal perivascular, respectivamente. Para avaliar a expressão dos tipos de colágeno I e IV em tumores de camundongos, os camundongos foram inoculados com 1 milhão de células tumorais 4T1, MC38 ou B16F10 no dia 0. Os tumores foram excisados no dia 10 e fixados em formalina tamponada neutra a 10% durante a noite, em seguida, incluídos em parafina e seção para 5 microns de espessura (CryoStar NX70). Os cortes transversais do tumor foram avaliados quanto à presença de colágeno tipo I e IV por imunohistoquímica. Resumidamente, as seções foram coradas com anticorpos de coelho contra colágeno tipo I (ab34710, Abcam) e colágeno tipo IV (ab6586, Abcam) a uma diluição de 1:500 em solução salina tamponada com Tris com 0,1% vol/vol Tween-20, seguido por uma coloração secundária usando anticorpo anti-coelho conjugado com HRP de cabra (ab6721, Abcam). As seções transversais dos tumores 4T1 (esquerda), MC38 (meio) e B16F10 (direita) mostraram coloração positiva para colágeno tipo I (parte superior) e colágeno tipo IV (parte inferior) (dados não mostrados). Assim, os tipos de colágeno I e IV são abundantemente expressos em vários modelos de tumor murino singênico.

[0654] Para avaliar a retenção intratumoral de moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno, as proteínas de fusão de ligação ao colágeno que se ligaram ao colágeno I no Exemplo 2 (Lumican-Gluc e ColG s3a/s3b-Gluc) foram testadas quanto à sua capacidade de permanecerem associadas no local da injeção intratumoral por imagem de fluorescência *in vivo*. Resumidamente, 5×10^5 células 4T1 (células de carcinoma

mamário murino) foram injetadas na almofada de gordura mamária de camundongos BALB/c seguido por injeção intratumoral de Gluc sozinho, ColG s3a/s3b-Gluc ou Lumican-Gluc no dia 7 pós-tumor injeção de células. Imediatamente após a injeção intratumoral, cada camundongo foi monitorado por imagem de bioluminescência in vivo (epi-iluminação, configurações de autoexposição).

[0655] O sinal bioluminescente do rato injetado Gluc sozinho diminuiu para um nível de fundo de aproximadamente 36 horas. pós-injeção (dados não mostrados). O sinal do mouse injetado com ColG s3a/s3b-Gluc diminuiu para um nível de fundo de aproximadamente 8,5 dias e após a injeção (dados não mostrados). O sinal do rato injetado com Lumican-Gluc não diminuiu abaixo do nível de fundo durante o experimento (aproximadamente 16,5 dias após a injeção, dados não mostrados).

[0656] Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão de ligação ao colágeno ColG s3a/s3b-Gluc e Lumican-Gluc são fisicamente retidas no local da injeção intratumoral ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que as moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno compreendendo um polipeptídeo de ligação ao colágeno procariótico ou de mamífero (por exemplo, ColG s3a/s3b ou Lumican) exibirão retenção intratumoral e disseminação sistêmica limitada.

Exemplo 4: Retenção intratumoral de proteínas de fusão de ligação ao colágeno dependem do peso molecular e da atividade de ligação do colágeno

[0657] Vários fatores podem ditar a retenção intratumoral de uma proteína de fusão de ligação ao colágeno: afinidade para o colágeno, concentração de colágeno, escape dependente

do tamanho por difusão ou convecção e renovação da proteína. Como uma proteína abaixo de 60 kDa, lumican (37 kDa) enfrenta alta permeabilidade através do endotélio vascular e é vulnerável à absorção na circulação, o que pode contribuir para a distribuição longe do local de injeção e uma diminuição na retenção intratumoral (McLennan et al., (2005) Drug Discov Today Technol 2: 89-96; Egawa et al., (2013) Sci Rep 3:1932).

[0658] Para avaliar o efeito do peso molecular na retenção intratumoral e distribuição sistêmica de moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno, a retenção do polipeptídeo lumican de ligação ao colágeno fundido à proteína de albumina de soro de camundongo 67 kDa (MSA) após injeção intratumoral foi determinada por in vivo imagem de fluorescência. Resumidamente, para a inoculação de tumor de B16F10-Trp2KO, 106 células ressuspensas em 50 uL de PBS estéril foram injetadas por via subcutânea nos flancos direitos de camundongos C57BL/6 fêmeas. As proteínas de fusão foram marcadas com excesso de cinco molar de Alexa Fluor 647 NHS Ester (Life Technologies) por 30 minutos em PBS ajustado para pH 8. O excesso de corante foi removido usando uma coluna de dessalinização PD10 (GE Healthcare) e grau de marcação (DOL) para cada proteína calculada. As proteínas comparadas em estudos de retenção continham quantidade equimolar de corante. Para Lumican-MSA (SEQ ID NO: 126) e MSA (SEQ ID NO: 183), 0,11 nmol de cada construção (110 µg de Lumican-MSA e 71,7 µg de MSA foram administrados) foi injetado por via intratumoral em camundongos portadores de B16F10-Trp2KO tumores cinco dias após a inoculação.

[0659] Para avaliar a retenção da proteína de fusão, os

camundongos foram fotografados com um Xenogen IVIS Imaging System 100 (Xenogen) em pontos de tempo indicados sob configurações de fluorescência de epi-iluminação de auto-exposição. Durante este tempo, os ratos foram mantidos em ração de caseína sem alfafa (Dieta de Teste) para minimizar a fluorescência de fundo gastrointestinal. A análise de imagem para determinar a eficiência radiante total foi realizada usando Living Image (Caliper Life Sciences). Células B16F10 sem a proteína-2 relacionada à tirosinase, B16F10-Trp2KO, foram usadas para inocular tumores sem pigmentação a fim de maximizar a fluorescência sinal-ruído.

[0660] Lumican, Lumican-MSA ou MSA marcado com fluorescência foram injetados por via intratumoral e os camundongos foram monitorados quanto à eficiência radiante total ao longo do tempo. O sinal fluorescente do lumican (37 kDa) foi retido em maior extensão do que o sinal fluorescente do MSA (67 kDa) durante as primeiras 5 horas após a injeção (dados não mostrados), apesar do menor peso molecular do lumican. Esses dados sugerem que a retenção intratumoral de lumican é dependente, pelo menos em parte, de sua atividade de ligação ao colágeno. O sinal fluorescente de lumican-MSA também foi retido em maior extensão do que o sinal fluorescente de MSA (FIG. 2A). Lumican-MSA (104 kDa) é significativamente maior do que lumican (37 kDa) e, embora cada um possua um local de ligação de colágeno idêntico, lumican-MSA é retido em maior extensão do que lumican sozinho (FIG. 2A), presumivelmente devido a mais eliminação rápida da construção lumican menor.

[0661] Para avaliar ainda mais o efeito do peso molecular na distribuição sistêmica, foi determinada a quantidade de

fluorescência do soro de camundongos injetados com lumican marcado fluorescentemente fundido com MSA ao longo do tempo. MSA marcado com fluorescência foi usado como um comparador. Para avaliar a fluorescência do soro após a injeção, um pequeno volume de sangue (<10 uL) foi retirado por ação capilar em tubos de vidro revestidos com heparina com micro-hematócrito (VWR) da ponta da cauda nos pontos de tempo indicados. Os tubos foram selados em uma extremidade com parafilme e armazenados em posição vertical protegidos da luz a 4 ° C para permitir a separação do soro do sangue coagulado por gravidade. Os tubos foram digitalizados usando um Typhoon Trio Variable Mode Imager (GE Healthcare) (laser de excitação: 633 nm; filtro de emissão: 670 BP; PMT: 450 - 500 V) e fluorescência sérica quantificada usando software de análise de imagem Fiji.

[0662] Como mostrado na FIG. 2B, o sinal de fluorescência do soro de camundongos injetados com lumican-MSA foi menor ao longo do tempo em comparação com o sinal de fluorescência do soro de camundongos injetados com MSA como uma% da dose injetada. Esses resultados demonstram que o lumican-MSA exibe menos distribuição sistêmica do que o MSA sozinho.

[0663] A co-localização lumican com os tipos de colágeno I e IV foi avaliada após a administração intratumoral por imagem de imunofluorescência. Resumidamente, os tumores B16F10 foram excisados após injeção intratumoral de lumican marcado com fluorescência. Os tumores foram preservados durante a noite em periodato-lisina-paraformaldeído a 4°C, em seguida, crioprotetidos com sacarose 30% em PBS por 8 horas a 4°C e, em seguida, congelados lentamente em um criomoldado contendo 100% de composto OCT (Sakura Finetek USA Inc.) em

gelo seco. Moldes tumorais congelados foram seccionados com espessura de 50 microns (CryStar NX70), e os cortes foram secos em temperatura ambiente por uma hora antes da recuperação do antígeno. Para a recuperação do antígeno, as seções de tecido foram aquecidas a 60°C em citrato de sódio 10 mM com Tween20 a 0,05% por 1 hora, lavadas em PBS e depois tratadas com 2 mg/mL de hialuronidase por 30 minutos em temperatura ambiente. As seções foram lavadas em imunomix (PBS contendo 0,2% p/vol de albumina de soro bovino, 0,05% p/vol de azida de sódio, 0,3% vol/vol de Triton X-10, 10% vol/vol de soro de burro), depois permeabilizado com acetona fria para 10 minutos a -20°C e então bloqueado em Immunomix por 1 hora em temperatura ambiente. A coloração foi realizada com anticorpos de coelho contra colágeno tipo I (ab34710, Abcam) e colágeno tipo IV (ab6586, Abcam) em uma diluição de 1: 200 em Immunomix durante a noite em temperatura ambiente em uma câmara de umidificação. Após várias lavagens com PBS, as seções foram coradas com anticorpo anti-coelho de cabra conjugado com AF488 secundário a uma diluição de 1:500 em Immunomix durante a noite em temperatura ambiente em uma câmara de umidificação. Após várias lavagens, as seções foram fixadas em formalina tamponada neutra a 1% em PBS e montadas em meio de montagem anti-desbotamento VECTASHIELD. As seções foram fotografadas por microscopia confocal. Sobrepondo o sinal fluorescente de colágeno tipo I ou tipo IV com sinal fluorescente de lumican, foi determinado que lumican co-localizado com colágeno tipo I e tipo IV em tumores B16F10 em grande extensão (dados não mostrados).

[0664] Estes resultados demonstram que tanto a afinidade para o colágeno quanto o aumento do peso molecular contribuem

para a retenção intratumoral e distribuição sistêmica das proteínas de fusão de ligação ao colágeno. Esses resultados sugerem que o aumento da afinidade ao colágeno e do peso molecular de uma molécula imunomoduladora de ligação ao colágeno aumentará a retenção intratumoral e diminuirá a distribuição sistêmica, aumentando assim o efeito terapêutico.

Exemplo 5: Proximidade com o colágeno ligado diminui a atividade de carga útil das proteínas de fusão de ligação ao colágeno

[0665] Para avaliar o efeito da ligação ao colágeno na atividade de carga útil, a bioluminescência intratumoral de Lumican-Gluc em comparação com ColG-Gluc foi comparada in vivo. Resumidamente, quantidades equimolares (0,3 nmol) de Lumican-Gluc ou ColG-Gluc foram injetadas intratumoralmente em camundongos com tumor de melanoma B16F10. Foi observada menos bioluminescência intratumoral com Lumican-Gluc em comparação com ColG-Gluc, apesar de uma injeção equimolar (0,3 nmol). Especificamente, 4/5 camundongos injetados com ColG-Gluc tiveram bioluminescência detectável sobre o fundo, enquanto apenas 1/5 dos camundongos injetados com Lumican-Gluc teve bioluminescência detectável sobre o fundo (dados não mostrados). Curiosamente, o sinal de bioluminescência só foi detectado fora do tumor, presumivelmente do construto que estava vazando para fora do tumor. A falta de bioluminescência intratumoral de constructos ligados ao colágeno sugere que a enzima não é funcional de forma otimizada quando forçada em estreita proximidade com o colágeno. Esse resultado informa a necessidade de uma proteína espaçadora, como a MSA, para ajudar a separar melhor

o colágeno de qualquer carga útil futura.

[0666] Uma vez que o colágeno é uma proteína insolúvel e, portanto, suscetível ao comportamento de fase sólida como a adsorção de superfície de proteínas solúveis proximais, o MSA atua como uma grande proteína espaçadora hidrofílica entre a carga útil e lumican para proteger a carga útil de adsorção e desnaturação funcional. Para nossa abordagem de localização, qualquer carga útil solúvel é forçada na interface sólido-líquido por lumican e pode ser adsorvida em uma fibra de colágeno, tornando-a funcionalmente inerte (como visto com Gluc). Para evitar a adsorção de nossa carga útil no colágeno, ligamos operacionalmente a albumina de soro de camundongo (MSA) ao lumican como uma grande proteína espaçadora entre a carga útil e o colágeno.

Exemplo 6: Efeito sinérgico de moléculas de ligação a colágeno imunomoduladoras e anticorpo antígeno antitumoral em modelo de tumor de melanoma de camundongo

[0667] A sinergia entre o anticorpo antígeno antitumoral e a interleucina-2 (IL-2) é bem caracterizada (Zhu et al., (2015) Cancer Cell 27:489-501). O efeito da fusão de IL-2 a moléculas de ligação ao colágeno foi avaliado pela preparação de IL-2 fundida ao terminal-C de Lumican-MSA. O MSA foi incorporado para garantir o acesso estérico dos receptores à IL-2 quando ligado às fibrilas de colágeno e também para aumentar o peso molecular do construto e, assim, reduzir o fluxo difusivo do tumor. Como um comparador bioativo de forma equivalente, IL-2 foi expressa como uma fusão com MSA (MSA-IL2), permitindo que os efeitos da ligação do colágeno sejam amplamente separados das melhorias baseadas no tamanho na retenção tumoral de pequenas citocinas como IL-2 de tipo

selvagem. Assim, IL-2 foi expressa como uma fusão com MSA sozinha ou como uma fusão com o terminal C de Lumican-MSA usando os métodos descritos no Exemplo 1. Proteínas de fusão de citocinas marcadas com His foram purificadas por resina de afinidade de metal TALON conforme descrito no Exemplo 1. As proteínas de fusão de citocinas foram ainda purificadas por FPLC (AKTA, GE Healthcare) usando uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg) que foi pré-tratada por 4 horas com NaOH 1 M para remover a endotoxina, então, subsequentemente, equilibrado em PBS estéril. Após a purificação, as proteínas foram trocadas por tampão em PBS estéril, filtrado por um filtro de membrana de 0,2 micra (Pall Corporation) e confirmado que continham endotoxina mínima ($<0,1$ EU por dose) usando um ensaio LAL cromogênico (Lonza).

[0668] As proteínas demonstraram expressão monomérica $> 90\%$ quando avaliadas por absorbância a 280 nm durante a cromatografia de exclusão de tamanho (dados não mostrados). Além disso, foi avaliada a capacidade das proteínas de induzir a proliferação celular. As células CTLL-2 foram semeadas em placas de cultura de tecidos não revestidas ou revestidas com colágeno tipo IV a uma densidade de 5000 células/poço. As células foram estimuladas com várias concentrações de MSA-IL2, Lumican-MSA-IL2 ou Lumican por 48 horas. A proliferação celular foi determinada por ensaio colorimétrico baseado em WST-1 (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Enquanto o Lumican não resultou em proliferação, o tratamento com MSA-IL2 e Lumican-MSA-IL2 resultou em níveis semelhantes de proliferação celular, independentemente da presença ou ausência de colágeno tipo IV

(dados não mostrados). Assim, MSA-IL2 e Lumican-MSA-IL2 têm bioatividade equivalente.

[0669] Além disso, os níveis séricos das fusões de IL-2 após injeção intratumoral foram quantificados conforme descrito no Exemplo 4. Lumican-MSA-IL2 e MSA-IL2 marcados com fluorescência foram injetados em tumores B16F10-Trp2KO, e os níveis de fluorescência sérica foram quantificados após injeção em diferentes pontos no tempo. O sinal de fluorescência do soro de camundongos injetados com lumican-MSA-IL2 foi menor ao longo do tempo em comparação com o sinal de fluorescência do soro de camundongos injetados com MSA-IL2 quando medido como uma% da dose injetada (dados não mostrados). Esses resultados demonstram que lumican-MSA-IL2 se liga ao colágeno intratumoral in vivo e, como resultado, exibe menos distribuição sistêmica do que MSA-IL2 sozinho.

[0670] Para caracterizar a eficácia antitumoral de combinações de moléculas de ligação ao colágeno imunomoduladoras com anticorpos direcionados ao antígeno tumoral, proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo de ligação ao colágeno fundido à citocina IL-2 foram avaliadas quanto à sinergia com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-TYRP1 (TY99) em um modelo de melanoma B16-F10.

[0671] Resumidamente, camundongos C57BL/6 com idades entre 6-8 semanas foram injetados por via subcutânea nos flancos direitos com 1×10^6 células de melanoma de camundongo B16-F10 (ATCC) em 50 μ L de PBS estéril. Camundongos com tumores de melanoma B16-F10 estabelecidos foram tratados sistemicamente com 100 μ g/dose de anticorpo anti-TYRP-1 (TA99) via injeção intraperitoneal (ip) e com 13 μ g/dose da proteína de fusão IL-2 de ligação ao colágeno lumican-MSA-IL2 via

injeção intratumoral (i.tu.). Camundongos injetados com MSA-IL2 (SEQ ID NO: 121) (9 µg/dose) ou lumican (SEQ ID NO: 182) (4 µg/dose) foram usados como comparadores. Os camundongos injetados com proteínas de fusão IL-2 (lumican-MSA-IL2 (SEQ ID NO: 120) ou MSA-IL2) receberam o equivalente a 0,11 nmol/dose de IL-2. Os animais foram sacrificados em um ponto final de eutanásia, que foi de 20% de perda de peso corporal total ou área de tumor superior a 100 mm² (comprimento x largura).

[0672] A porcentagem de sobrevivência de camundongos com tumores tratados com MSA-IL2, lumican-MSA-IL2, lumican sozinho ou em combinação com TA99 é mostrada na FIG. 3A-3B. A monoterapia de camundongos administrados com lumican-MSA-IL2 ou MSA-IL2 por si só conferiu um benefício de sobrevivência limitado (FIG. 3A). A combinação de TA99 e lumican não forneceu nenhum benefício de sobrevivência (FIG. 3B), no entanto, a administração de uma combinação de TA99 e MSA-IL-2 ou lumican-MSA-IL2 mostrou um benefício de sobrevivência sinérgico para camundongos (Fig. 3B). A combinação com lumican-MSA-IL2 conferiu um maior benefício de sobrevivência em comparação com a combinação com MSA-IL2 (FIG. 3B).

[0673] Após a cessação do tratamento, vários camundongos desenvolveram despigmentação cutânea localizada ou vitiligo, que é indicativo de uma resposta de células T específica para melanócitos. Quase todos os camundongos injetados com lumican-MSA-IL2 e TA99 desenvolveram um patch de vitiligo localizado no local da injeção (16 de 17 camundongos), enquanto apenas um de 17 camundongos tratados com MSA-IL2 e TA99 apresentou este efeito colateral. Juntas, essas observações indicam que lumincan-MSA-IL2 ancora IL-2

intratumoralmente e aumenta a sinergia de IL-2 com TA99, aumentando as respostas de células T antitumorais e a sobrevida geral.

[0674] Para determinar se a injeção intratumoral de lumican-MSA-IL-2 era necessária para os melhores resultados quando usado em combinação com TA99, avaliamos a eficácia desta combinação quando lumican-MSA-IL2 foi injetado em outros locais corporais. Quando lumican-MSA-IL2 foi administrado peritumoralmente (peri.tu) (isto é, adjacente à lesão) (FIG. 3C) ou intranodalmente (isto é, no tumor que drena o linfonodo inguinal) (FIG. 3D), a eficácia foi atenuada. Todo o benefício de sobrevivência da combinação diminuiu quando lumican-MSA-IL2 foi administrado por via subcutânea na base da cauda, 2 cm distal ao local do tumor (FIG. 3C).

[0675] Estes resultados mostram que o tratamento de camundongos com tumor com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 fornece um efeito antitumoral sinérgico e que a localização intratumoral de IL-2 é necessária para a eficácia máxima desta terapia de combinação.

Exemplo 7: Efeito sinérgico de moléculas de ligação a colágeno imunomoduladoras e o anticorpo antígeno antitumoral é dependente de células T CD8+, células dendríticas e IFN γ

[0676] A dose elevada de IL-2 suporta a proliferação e funções efetoras de células T e células NK, mas também promove neutrofilia e eosinofilia (Macdonald et al., (1990) Br J Haematol 76 (2): 168-173; Li et al., (1996) Inflammation 20 (4): 361-372). Dados os diversos efeitos conhecidos da IL-2 nas células do sistema imunológico, a contribuição de tipos distintos de leucócitos para a eficácia terapêutica de

lumican-MSA-IL2 foi determinada por depleções celulares mediadas por anticorpos. Subconjuntos de células imunológicas ou IFN γ foram esgotados por administração intraperitoneal (i.p.) de anticorpos de depleção começando um dia antes do primeiro tratamento até uma semana após o último tratamento. TA99 e lumican-MSA-IL2 foram administrados conforme descrito para a FIG. 3B. Células T CD8 +, células NK ou neutrófilos foram esgotados usando 400 μ g de anticorpo anti-CD8 α (2,43, BioXCell), anti-NK1.1 (PK136, BioXCell) ou anti-Ly6G (1A8, BioXCell) a cada quatro dias, respectivamente. Macrófagos ou IFN γ solúvel foram esgotados usando 300 μ g de anti-CSF1R (AFS98, BioXCell) ou 200 μ g de anti-IFN γ (XMG1.2, BioXCell) em dias alternados, respectivamente. Os eosinófilos foram eliminados usando 1 mg de anti-IL-5 (TRFK5, BioXCell).

[0677] Para avaliar a contribuição de subconjuntos de células imunes, C57BL/6 de 6-8 semanas de tipo selvagem (WT) ou camundongos BatF3 -/- (B6.129S (C) -Batf3tm1Kmm/J; Jackson Laboratory), que são deficientes em dendríticos de apresentação cruzada células (DCs), foram injetadas por via subcutânea nos flancos direitos com 1×10^6 células de melanoma de camundongo B16-F10 (ATCC) em 50 μ L de PBS estéril. O esgotamento do assassino natural (NK) em camundongos WT não alterou a eficácia de lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 (FIG. 4). A depleção de neutrófilos, eosinófilos ou macrófagos em camundongos do tipo selvagem também não alterou a eficácia de lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 (dados não mostrados), indicando que nenhuma população de células inatas foi exclusivamente responsável pelo controle do tumor. No entanto, a depleção de células T CD8 + (anti-CD8 α), DCs de apresentação cruzada (BatF3 -/-) e IFN γ (anti-IFN γ) alterou a

eficácia do tratamento, indicando que eles eram indispensáveis para a rejeição do tumor (FIG. 4). As estatísticas de sobrevivência foram determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank.

[0678] Estes resultados mostram que o tratamento de camundongos com tumor com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 fornece um efeito antitumoral sinérgico que é dependente de células T CD8+, células dendríticas e IFN γ .

Exemplo 8: Combinação de moléculas de ligação a colágeno imunomoduladoras e anticorpo antígeno antitumoral estabelece memória protetora e induz imunidade celular específica ao tumor sistêmica

[0679] A sobrevida livre de doença durável e a confiança nos componentes da imunidade adaptativa observada após o tratamento com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99, como mostrado acima, sugeriu que camundongos curados sem tumor podem ser resistentes ao novo desafio do tumor. Para determinar se camundongos livres de tumor curados tratados com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99, camundongos C57BL/6 curados do experimento mostrado na FIG. 3B foram desafiados novamente no dia 100 com 1×10^6 células B16-F10 inoculadas no flanco contralateral. A maioria dos sobreviventes de longo prazo tratados com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 rejeitou uma nova exposição com B16-F10 inoculado no flanco contralateral (9/15 camundongos).

[0680] Embora a erradicação do tumor por imunidade mediada por células exija ativação imune sistêmica (Spitzer et al., (2017) Cell 168: 487-502), a mancha estritamente localizada de vitiligo observada após o tratamento com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 (ver Exemplo 6) levou a uma avaliação

das respostas de células T específicas do tumor fora da lesão tumoral tratada. Para determinar se o tratamento com lumican-MSA-IL2 em combinação com TA99 induz uma resposta sistêmica de células T antitumoral, um IFN γ ELISPOT foi realizado usando esplenócitos colhidos quatro dias após o tratamento de camundongos, conforme descrito na FIG. 3B. O tratamento com TA99 em combinação com MSA-IL2 ou Lumican foram usados como comparadores. O número de unidades formadoras de manchas de IFN γ (SFUs) em resposta à estimulação com células alvo B16F10 foi quantificado. O tratamento com TA99 em combinação com lumican-MSA-IL2 produziu mais esplenócitos periféricos que expressam IFN γ do que em combinação com MSA-IL2. Especificamente, o tratamento com TA99+ Lumican-MSA-IL2 resultou em aproximadamente 20 SFUs por 1 milhão de esplenócitos, enquanto o tratamento com TA99+ MSA-IL2, com TA99+ lumican ou nenhum tratamento resultou em menos de aproximadamente 7 SFUs por 1 milhão de esplenócitos.

[0681] Para confirmar que a coloração de IFN γ intracelular em esplenócitos foi gerada por células T CD8+ específicas de tumor, os esplenócitos foram colhidos quatro dias após o tratamento de camundongos como descrito na FIG. 3B. Os esplenócitos colhidos foram simulados com B16-F10 ou 4T1 irradiado por 12 horas na presença de brefeldina A e, subsequentemente, corados para marcadores de superfície (CD4, CD3 e CD8) e IFN γ intracelular (n = 5 camundongos/grupo). FIGO. 5A mostra a quantificação de células IFN γ + entre células T CD45+, CD3+, CD8+ vivas conforme determinado por citometria de fluxo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com o teste de comparação múltipla de Tukey.

[0682] Os resultados mostrados na figura 5A demonstra que a estimulação com células tumorais B16-F10 irradiadas, mas não células tumorais 4T1, induziu a expressão de IFN γ em esplenócitos, confirmando que as respostas de células T CD8+ específicas de B16F10 periféricas no baço foram induzidas pelo tratamento de camundongos com tumor com lumican- MSA-IL2 em combinação com TA99. Estes resultados também mostram que o tratamento de camundongos portadores de tumor com TA99 em combinação com lumican-MSA-IL2 ancorado em colágeno tumoral induziu uma maior resposta sistêmica específica de tumor do que em combinação com MSA-IL2 não ancorado.

[0683] Para determinar a capacidade dos efetores periféricos (por exemplo, células T específicas do tumor periférico) induzidos pelo tratamento com TA99 em combinação com lumican-MSA-IL2 para controlar uma lesão tumoral distante não tratada onde o suporte de citocinas exógenas é limitado, os camundongos foram inoculados 1×10^6 Células B16-F10 por via subcutânea para estabelecer tumores em ambos os flancos e administradas TA99 sistemicamente (ip) e IL-2 (como lumican-MSA-IL2 ou MSA-IL2) por via intratumoral (i.tu) apenas no tumor direito ou ipsilateral. FIG. 5B mostra as áreas tumorais médias para tumores contralaterais não injetados e para tumores ipsilaterais injetados intratumoralmente ao longo do tempo. Os resultados mostrados na figura 5B demonstra que a combinação de TA99 com MSA-IL2, que pode vazar para fora do tumor ipsilateral e para a lesão contralateral após a injeção, conferiu algum controle do tumor contralateral, mas a maioria dos camundongos sucumbiu à carga do tumor. Em contraste, a combinação de TA99 com lumican-MSA-IL2, que é isolado no tumor ipsilateral,

interrompeu o crescimento do tumor ipsilateral e contralateral levando a curas duráveis em vários camundongos. Estes resultados mostram que a resposta sistêmica antitumoral induzida pela ancoragem de IL-2 via ligação ao colágeno tumoral é superior à estimulação difusa de IL-2 no controle e erradicação de doenças disseminadas.

Exemplo 9: Tratamento de camundongos com tumor com uma proteína de fusão de IL-12 de ligação a colágeno não induz perda de peso relacionada a IL-12

[0684] Depois de observar a melhoria dos efeitos terapêuticos antitumorais por ancoragem de colágeno de IL-2, como mostrado nos Exemplos acima, o (s) efeito (s) de ancoragem de IL-12, outra citocina de dose limitada, foi avaliado. IL-12 atua como um regulador chave na imunidade mediada por células tipo 1, uma via conhecida por ser crítica para respostas antitumorais eficazes (Green et al., (2017) J Biol Chem 292: 13925-13933). Apesar do trabalho pré-clínico promissor, toxicidades graves e fatalidades interromperam um ensaio clínico inicial de administração de IL-12 sistêmica (Lasek et al., (2014) Cancer Immunol Immunother 63 (5): 419-435). O IFN γ , induzido pela estimulação de IL-12 de células NK e células T, foi implicado na toxicidade, no entanto, IL-12 também está inextricavelmente acoplado à sua eficácia (Leonard et al., (1997) Blood 90: 2541-2548).

[0685] Assim, IL-12 foi expressa e purificada como uma fusão com MSA sozinho ou como uma fusão com o terminal N de Lumican-MSA (IL12-MSA-Lumican) usando os métodos descritos nos Exemplos 1 e 6. Resumidamente, IL- murino 12 foi expresso em um formato de cadeia única com um ligante glicina-serina de 15 aminoácidos entre as subunidades p40 e p35 (scIL12).

Para gerar uma versão de ancoragem de colágeno de IL-12, scIL12 foi fundido ao N-terminal de lumican com um espaçador MSA, doravante referido como IL12-MSA-Lumican (SEQ ID NO: 123). IL12-MSA (SEQ ID NO: 122), uma versão sem ancoragem de IL-12, foi usada como um comparador. As proteínas IL12-MSA e IL12-MSA-Lumican demonstraram expressão monomérica >90% quando avaliadas por absorbância a 280 nm durante a cromatografia de exclusão de tamanho (dados não mostrados).

[0686] Além disso, os níveis séricos das fusões de IL-12 após a injeção intratumoral foram quantificados como descrito no Exemplo 4. IL12-MSA-lumican e IL12-MSA marcados com fluorescência foram injetados em tumores B16F10-Trp2KO, e os níveis de fluorescência sérica foram quantificados após a injeção em diferentes pontos no tempo. O sinal de fluorescência do soro de camundongos injetados com IL12-MSA-lumican foi menor ao longo do tempo em comparação com o sinal de fluorescência do soro de camundongos injetados com IL12-MSA quando medido como uma% da dose injetada (dados não mostrados). Estes resultados demonstram que IL12-MSA-lumican se liga ao colágeno intratumoral in vivo e, como resultado, exibe menos distribuição sistêmica do que IL12-MSA sozinho.

[0687] Para determinar se a retenção de IL-12 no tumor via ligação ao colágeno melhoraria as toxicidades mediadas por IL-12, a IL-12 fundida a lumican-MSA foi avaliada em um modelo de tumor de melanoma de camundongo. Camundongos C57BL/6, com idades entre 6-8 semanas, foram inoculados com 1×10^6 células de melanoma B16-F10 no dia 0. A mudança de peso da linha de base desses camundongos foi monitorada após o tratamento com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS (n = 6), 17,8 µg/dose de IL12-MSA (n=7), ou 23,1 µg/dose de IL12-MSA-

Lumican (n = 7), ou injeção intraperitoneal (ip) de 17,8 µg/dose de IL12-MSA (n=7) no dia 6 e no dia 12. Os camundongos injetados com proteínas de fusão IL-12 (IL12-MSA-lumican ou IL12-MSA) receberam o equivalente a 140 pmol/dose de IL-12.

[0688] Como mostrado na FIG. 6A, a administração intratumoral de IL12-MSA em camundongos com tumor B16-F10 leva a uma perda de peso significativa, uma leitura não invasiva para toxicidade de citocina sistêmica (por exemplo, IFN γ). A administração sistêmica de IL12-MSA por injeção intraperitoneal resultou em um perfil de perda de peso idêntico. Em contraste, uma injeção intratumoral equimolar de IL12-MSA-Lumican não causou perda de peso. Coletivamente, esses resultados demonstram que a administração local na ausência de um esforço para a retenção intratumoral via ligação de colágeno é insuficiente para aliviar a toxicidade mediada por IL-12 e que a ancoragem de colágeno forneceu confinamento intratumoral suficiente para conter toxicidades sistêmicas evidentes de IL-12, resultando em índice terapêutico melhorado.

[0689] A sobrevivência dos animais tratados como na FIG. 6A também foi avaliado. Os camundongos foram sacrificados de acordo com os critérios descritos no Exemplo 6. Como mostrado na FIG. 6B, o tratamento com uma fusão de IL12 melhorou a sobrevivência em relação a camundongos controle não tratados ou camundongos tratados com lumican. O tratamento com IL12-MSA-Lumican resultou em uma melhora modesta na sobrevida em comparação com IL12-MSA.

[0690] A dose de IL12 usada para tratar tumores B16F10 foi titulada para determinar os efeitos dependentes da dose na

toxicidade e eficácia antitumoral. Os camundongos inoculados com tumores B16F10 no dia 0, conforme descrito acima, foram tratados no dia 5 com uma injeção intratumoral de IL12-MSA ou IL12-MSA-Lumican em diferentes doses. Os camundongos de controle não tratados receberam uma injeção intratumoral de PBS. O efeito da dose foi avaliado na área do tumor (por exemplo, medida de eficácia) e de mudança de peso (por exemplo, medida de toxicidade). As doses de IL12-MSA e IL12-MSA-Lumican que foram avaliadas incluíram o equivalente em massa de 140 pmol IL12, 14 pmol IL12, 1,4 pmol IL12 ou 0,14 pmol IL12. IL12-MSA-Lumican não mostrou toxicidade em qualquer dose testada, mas demonstrou eficácia reduzida em uma dose de 1,4 ou 0,14 pmol de IL12 (dados não mostrados). Enquanto IL12-MSA demonstrou toxicidade reduzida e eficácia reduzida com dose reduzida (dados não mostrados). Assim, para avaliar as fusões de IL12 em combinação com outros agentes terapêuticos, uma dose de 14 pmol de IL12 foi identificada como tendo um índice de toxicidade tolerável, mantendo a eficácia terapêutica.

Exemplo 10: Efeito antitumor sinérgico de proteínas de fusão IL-2 e IL-12 de ligação a colágeno em um modelo de tumor de camundongo

[0691] Combinações para potencializar os efeitos antitumorais da IL-12 foram teorizadas, mas as preocupações com a segurança impediram amplamente sua atualização (Lasek et al., (2014) Cancer Immunol Immunother 63 (5): 419-435). O índice terapêutico melhorado de IL12-MSA-lumican, como indicado pela ausência de perda de peso relacionada ao tratamento no Exemplo 9, levou à avaliação desta citocina em combinação com outros agentes terapêuticos. IL-2 e IL-12 são

conhecidos por envolver vias de sinalização complementares para estimular células NK e células T (Wigginton & Wilttrout (2002) Expert Opin Biol Ther 2: 513-524) Além disso, IL-2 regula positivamente a expressão de uma IL- 12 subunidade beta 2 do receptor (Wang et al., (2000) Blood 95: 3183) e IL-12 sustentam a expressão de superfície do receptor CD25 de IL-2 de alta afinidade (Starbeck-Miller et al., (2013) J Exp Med 211 : 105-120). Por feedback positivo recíproco, IL-2 e IL-12 aumentam e prolongam o efeito uma da outra (Wigginton et al., (1996) J Natl Cancer Inst 88: 38-43). Apesar da eficácia promissora, vários ensaios clínicos em torno desta combinação foram encerrados (Wigginton & Wilttrout (2002) Expert Opin Biol Ther 2: 513-524; Gollob et al., (2003) J Clin Oncol 21: 2564-2573; Addison et al ., (1998) Gene Ther 5: 1400-1409; Wigginton et al., (2001) J Immunol 166: 1156-1168). Notavelmente, a combinação de IL-2 e IL-12 também aumenta significativamente a produção de IFN- γ por células T e células NK (Wigginton & Wilttrout (2002) Expert Opin Biol Ther 2: 513-524).

[0692] Para avaliar o (s) efeito (s) terapêutico (s) de uma combinação de moléculas de ligação ao colágeno imunomoduladoras compreendendo IL-2 ou IL-12, lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-lumican foram testados em combinação em um modelo de tumor de melanoma de camundongo essencialmente como descrito no Exemplo 9. No entanto, dadas as toxicidades conhecidas decorrentes da administração de citocinas não ancoradas ao colágeno em combinação descrita acima, as dosagens de IL12-MSA-lumican e IL12-MSA-IL-12 foram reduzidas a 1/10 do que era previamente administrado no Exemplo 9 a 14 pmol/dose. Como no Exemplo 6, camundongos administrados com

lumican-MSA-IL2 receberam 13 µg/dose. Os camundongos administrados com MSA-IL2 receberam 9 µg/dose. Os camundongos injetados com proteínas de fusão IL-2 (lumican-MSA-IL2 ou MSA-IL2) receberam o equivalente a 0,11 nmol/dose de IL-2.

[0693] A administração intratumoral da dose reduzida (14 pmol/dose) de IL12-MSA sozinho ou MSA-IL2 sozinho não resultou em perda de peso ou atraso significativo no crescimento do tumor em camundongos com tumor B16-F10 (dados não mostrados). Em contraste, a administração de IL12-MSA em combinação com MSA-IL2 resultou em perda de peso e aumento da sobrevivência (FIG. 7). Em contraste, o tratamento de combinação usando as versões de ancoragem de colágeno, IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2, aumentou a sobrevivência em maior extensão do que a combinação de IL12-MSA e MSA-IL2 e não resultou em perda de peso concomitante (FIG. 7).

[0694] Estes resultados demonstram que o tratamento de camundongos portadores de tumor com uma combinação de IL12-MSA-lumican de ligação ao colágeno e lumican-MSA-IL2 resultou no aumento da sobrevivência de camundongos em uma extensão maior do que o tratamento com uma combinação de IL12 de ligação não colágeno-MSA e MSA-IL2. Além disso, esses resultados mostram que o tratamento de camundongos com uma combinação de IL12-MSA-lumican de ligação ao colágeno e lumican-MSA-IL2 preveniu a toxicidade relacionada ao tratamento associada à co-administração de IL-12 e IL-2, proporcionando assim um tratamento terapêutico concretização para esta combinação de citocinas.

Exemplo 11: Efeito sinérgico das proteínas de fusão IL-2 e IL-12 de ligação ao colágeno é dependente de células T CD8 + e células dendríticas

[0695] Os tipos de células imunes responsáveis pela eficácia da terapia de combinação intratumoral IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 foram determinados por depleções celulares mediadas por anticorpos essencialmente como descrito no Exemplo 7. Como mostrado na FIG. 8A, células T CD8 + e células dendríticas de apresentação cruzada são indispensáveis para a eficácia, pois a depleção desses tipos de células reduz a sobrevivência de camundongos com tumor tratados intratumoralmente com uma combinação de IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2. Em contraste, a depleção de células NK, neutrófilos, eosinófilos ou macrófagos não afetou significativamente o resultado de sobrevivência (FIG. 8B). A depleção mediada por anticorpos de IFN γ , uma citocina conhecida por ser amplificada por estimulação simultânea de IL-2 e IL-12 (Gollob et al., (1999) J Immunol 162 (8): 4472-4481), também não alterou significativamente a sobrevivência (FIG. 8A), no entanto, a falta de efeito pode ser atribuída à depleção insuficiente de IFN γ .

[0696] Para avaliar ainda mais a contribuição dos tipos de células imunes para a eficácia antitumoral fornecida pela combinação de IL12-MSA-lumican e lumican-MSA-IL2 em camundongos com tumor, foi realizada imunofenotipagem de células imunes infiltrantes de tumor. Os camundongos foram inoculados com 1 milhão de células tumorais B16F10 no dia 0 e tratados com injeção intratumoral de PBS, IL12-MSA e MSA-IL2 ou IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 no dia 5. Os tumores foram excisados no dia 5. 11. Infiltrados de células imunológicas de tumores foram analisados como descrito anteriormente. (Moynihan et al., (2016) Nat Med 22: 1402-1410); Zhu et al., (2015) Cancer Cell 27: 489-501).

Resumidamente, os tumores ressecados foram pesados, dissociados em pequenos pedaços, incubados em RPMI-1640 contendo 1 mg/mL de collagenase e dispase (Roche) e 25 µg/mL de DNase I (Roche) por 30 minutos a 37°C. Dissociação mecânica adicional foi usada para gerar uma suspensão de célula única para coloração. As células foram analisadas em BD FACS LSRFortessa™ e os dados foram analisados usando FlowJo® (FlowJo, Inc). As células foram coradas para marcadores de superfície e intracelulares para delinear os tipos de células da seguinte forma:

Células NK (CD45⁺ CD3⁻ NK1.1⁺, vivas)

Células Treg (CD45⁺ CD3⁺ NK1.1⁻ CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ FoxP3⁺, vivas)

Células CD4 (CD45⁺ CD3⁺ NK1.1⁻ CD4⁺ CD8⁻ CD25^{+/-} FoxP3⁻, vivas)

Células T CD8 (CD45⁺ CD3⁺ NK1.1⁻ CD4⁻ CD8⁺, vivas)

Monócitos/macrófagos (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ CD11c⁻ F4/80⁺, vivas)

CD11b⁺ DC (CD45⁺ CD11b⁺ MHCII⁺ CD11c⁺, vivas)

CD11b⁻ DC (CD45⁺ CD11b⁻ MHCII⁺ CD11c⁺, vivas)

Neutrófilo (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺, vivas)

[0697] Como mostrado na FIG. 8C, a alteração da dobra de células T CD8⁺ em infiltrados tumorais de camundongos tratados com uma combinação de IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 (versões Lumican) em relação ao tratamento com PBS é maior do que a alteração da dobra de camundongos tratados com IL12-MSA + MSA-IL2 (versões MSA) em relação ao tratamento com PBS. Além disso, os tumores tratados com as fusões de citocinas lumican-MSA tinham mais células T CD8⁺ infiltrantes em comparação com os tumores tratados com as fusões de citocinas MSA seis dias após o tratamento inicial (FIG. 8D) e tinham maior expressão de superfície de PD-1 (FIG. 8E).

[0698] A produção de células T específicas do tumor em

resposta ao tratamento foi ainda avaliada em esplenócitos isolados em seis dias após o tratamento por IFN γ ELISPOT. O número de unidades formadoras de manchas de IFN γ (SFU) em resposta à estimulação com células alvo B16F10 foi quantificado. O tratamento com fusões de citocinas lumican-MSA rendeu aproximadamente 20 SFU por 1 milhão de esplenócitos, em comparação com aproximadamente 15 SFU por 1 milhão de esplenócitos para fusões de citocinas MSA ou aproximadamente 2 SFU por 1 milhão de esplenócitos para animais não tratados. Assim, o tratamento com fusões de citocina lumican-MSA resultou em um aumento no número de células T específicas de tumor periférico em comparação com nenhum tratamento ou tratamento com fusões de citocina MSA.

[0699] Estes resultados demonstram que a eficácia antitumoral (por exemplo, sobrevivência aumentada) fornecida pela combinação de IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 é dependente de células T CD8⁺ e células dendríticas. Além disso, esses resultados demonstram que o tratamento intratumoral de camundongos com tumor com uma combinação de IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 fornece eficácia antitumoral, pelo menos em parte, induzindo a infiltração de células T CD8 + ativadas no tumor e induzindo a produção de células T específicas de tumor periféricas.

Exemplo 12: Efeito sinérgico de proteínas de fusão de IL-2 e IL-12 de ligação a colágeno e combinação de anticorpo anti-PD-1 em um modelo de tumor de melanoma de camundongo

[0700] A regulação positiva de PD-1 de superfície em células T CD8 de infiltração tumoral em resposta ao tratamento com citocina lumican, conforme descrito no Exemplo 11, solicitou uma avaliação da eficácia antitumoral de uma

combinação de um anticorpo anti-PD-1 (clone 29F.1A12, BioXCell), IL12-MSA-lumican e lumican-MSA-IL2 em um modelo de tumor de melanoma de camundongo. Resumidamente, camundongos C57BL/6 com idade de 6-8 semanas foram inoculados com 1×10^6 células tumorais B16-F10 subcutaneamente no flanco direito no dia 0. Camundongos portadores de tumor foram tratados com uma combinação de Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA- Lumican ou uma combinação de MSA-IL2 e IL12-MSA intratumoralmente em dosagens conforme descrito no Exemplo 10 e com anticorpo anti-PD-1 (200 µg/dose) intraperitonealmente no dia 5 e dia 11. Alteração percentual de peso da linha de base e percentual de sobrevivência foi monitorada e é mostrado na FIG. 9

[0701] Como mostrado na FIG. 9, a inclusão de anticorpo anti-PD-1 em combinação com IL12-MSA e MSA-IL2 ou com IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 não alterou as tendências de perda de peso observadas anteriormente (FIG. 7). No entanto, a adição de anticorpo anti-PD-1 melhorou os resultados de sobrevivência para camundongos tratados com a combinação IL12-MSA+MSA-IL2, mas não melhorou ainda mais a sobrevivência de camundongos tratados com a combinação IL12-MSA-Lumican + Lumican-MSA-IL2.

[0702] O vitiligo localizado ocorreu mais frequentemente em camundongos tratados com anticorpo anti-PD-1, IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 (4/5 camundongos com vitiligo no local da injeção) em comparação com camundongos tratados com anticorpo anti-PD-1, IL12-MSA e MSA-IL2 (1/5 camundongos com vitiligo no local da injeção). Além disso, mais sobreviventes de tratamento com citocina (IL12-MSA + MSA-IL2 ou IL12-MSA-Lumican + Lumican-MSA-IL2) e anti-PD-1 em comparação com

sobreviventes de tratamento com IL12-MSA-Lumican + Lumican-MSA-IL2 na ausência de tratamento anti-PD-1 foram protegidos contra um novo desafio tumoral subsequente com células tumorais B16-F10. Enquanto 4/4 camundongos tratados com citocinas Lumican-MSA + anti-PD-1 e camundongos 2/2 tratados com citocinas MSA + anti-PD-1 rejeitaram tumores de reintrodução, apenas 1/3 camundongos tratados com citocinas Lumican-MSA apenas rejeitou novo desafio.

[0703] Estes resultados demonstram que o tratamento de camundongos com tumor com uma combinação de anti-PD-1, IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 aumentou a ocorrência de vitiligo induzido por tratamento e memória imunológica eficaz, demonstrando, assim, um efeito sinérgico no aumento Respostas de células T geradas a partir de tratamento localizado com IL-2 e IL-12.

Exemplo 13: Efeito sinérgico de proteínas de fusão de IL-2 e IL-12 de ligação a colágeno e combinação de anticorpo anti-PD-1 em modelos de tumor mamário de camundongo e carcinoma do cólon

[0704] O(s) efeito (s) antitumoral de uma combinação de proteínas de fusão IL-2 e IL-12 de ligação ao colágeno com um anticorpo anti-PD-1 foram avaliados adicionalmente em um modelo de carcinoma mamário EMT6. Resumidamente, 1×10^6 células de carcinoma mamário de camundongo EMT6 (ATCC) ou 1×10^6 células de carcinoma de cólon de camundongo MC38 (National Cancer Institute, Bethesda, MD) foram ressuspensas em 50 μ L de PBS estéril foram injetados por via subcutânea nos flancos direitos de C57BL/6 camundongos fêmeas no dia 0. camundongos com tumor EMT6 foram tratados com Lumican-MSA-IL2 + IL12-MSA-Lumican (i.tu.), anticorpo anti-PD-1 sozinho (ip,

200 µg/dose) ou anti- Anticorpo PD-1 em combinação com Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican (i.tu) em dosagens conforme descrito no Exemplo 10 no dia 5, dia 11 e dia 17. Camundongos portadores de tumor MC38 foram tratados com uma combinação de Lumican-MSA-IL2 + IL12-MSA-Lumican (i.tu.), anticorpo anti-PD-1 sozinho (ip, 200 µg/dose) ou em combinação com Lumican-MSA-IL2 + IL12-MSA-Lumican (i.tu.) em dosagens conforme descrito no Exemplo 10 no dia 5, dia 11 e dia 17. Para cada modelo de tumor, a área do tumor (mm²) e a porcentagem de sobrevivência foram monitoradas ao longo do tempo e são mostradas na FIG. 10A-10B. Estatísticas de sobrevivência determinadas pelo teste de Mantel-Cox log-rank.

[0705] Como mostrado na FIG. 10A, o tratamento de camundongos com tumores de carcinoma mamário EMT6 com um anticorpo anti-PD-1 em combinação com Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican resultou na resolução de lesões tumorais (conforme indicado pela ausência de área tumoral mensurável) e aumento sobrevivência em maior extensão do que o tratamento de camundongos com tumor apenas com anticorpo anti-PD-1.

[0706] Como mostrado na FIG. 10B, o tratamento de camundongos com tumores de carcinoma do cólon MC38 com um anticorpo anti-PD-1 em combinação com Lumican-MSA-IL2 e IL12-MSA-Lumican resultou em uma diminuição na área do tumor e aumento da sobrevida em maior extensão do que o tratamento do tumor ratos portadores com anticorpo anti-PD-1 sozinho ou com a combinação IL12-MSA-Lumican + Lumican-MSA-IL2 sozinha.

[0707] Estes resultados mostram que o tratamento de camundongos com tumor com um anticorpo anti-PD-1 em combinação com IL12-MSA-Lumican + Lumican-MSA-IL2 resulta em um efeito antitumoral sinérgico em modelos de carcinoma

mamário EMT6 e carcinoma de cólon MC38.

Exemplo 14: Efeito sinérgico da proteína de fusão IL-12 de ligação ao colágeno e vacina contra o câncer em um modelo de tumor de melanoma de camundongo

[0708] Para avaliar ainda mais a capacidade de uma proteína de fusão IL-12 de ligação ao colágeno para potencializar sinergicamente tratamentos antitumorais, o(s) efeito(s) antitumoral da proteína de fusão IL-12 de ligação ao colágeno IL12-MSA-Lumican em combinação com um vacina contra o câncer foi avaliada em um modelo de melanoma de camundongo B16-F10. Resumidamente, 1×10^6 células B16-F10 (ATCC), ressuspensas em 50 μ L de PBS estéril, foram inoculadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6 fêmeas de 6-8 semanas de idade no dia 0. Uma vacina contra o câncer, compreendendo 90 μ g de uma fração de direcionamento de linfonodo fundido a peptídeos derivados de antígenos associados a B16-F10 TYRP-1 e um peptídeo gp100 modificado (EGP) e 50 μ g de adjuvantes de dinucleotídeos cíclicos (Invivogen), foi administrado por via subcutânea na base da cauda com uma dose inicial no dia 5 e dose de reforço no dia 11 e no dia 17. A administração subcutânea do adjuvante dinucleotídico cíclico e a vacina contra o câncer foi avaliada quanto à iniciação de uma resposta de células T CD8 específicas para o antígeno. Resumidamente, o sangue periférico foi coletado no dia 16 e estimulado por 6 horas com antígenos peptídicos Trp1 e EGP. Brefeldina A foi incluída nas 4 horas finais de incubação. As células do sangue periférico foram subsequentemente coradas para marcadores de superfície e IFN γ intracelular e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células IFN γ + entre

células T CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ vivas foi avaliada. A vacinação sozinha ou em combinação com IL12-MSA-Lumican melhorou a iniciação de células T CD8 específicas para o antígeno (dados não mostrados).

[0709] Alteração de peso na linha de base de cada camundongo, área tumoral e sobrevivência de camundongos tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS (n=12) ou IL-12 (n=10 para IL12-MSA; n=10 para IL12 -MSA-Lumican), ou vacina (n=7) sozinha, ou vacina e IL12 (n=7 para IL12-MSA; n=7 para IL12-MSA-Lumican) nos dias 5, 11 e 17 foram monitorados ao longo do tempo (FIG. 11, da esquerda para a direita).

[0710] Como mostrado na FIG. 11, a vacinação por si só não afetou o peso em relação aos camundongos tratados com PBS (painel esquerdo), crescimento do tumor B16F10 modestamente atrasado (painel do meio) e sobrevivência modestamente aumentada dos camundongos (painel direito). Em contraste, a co-administração da vacina contra o câncer com IL-12, usando IL12-MSA ou IL12-MSA-Lumican, resultou em uma redução sinérgica no crescimento do tumor (painel do meio) e aumento na sobrevida (painel direito). A vacina contra o câncer administrada em combinação com IL12-MSA-Lumican prolongou a sobrevida por mais tempo do que a combinação com IL12-MSA. Além disso, a vacina com IL12-MSA levou à perda de peso induzida pelo tratamento que não foi detectada com IL12-MSA-Lumican (painel direito).

[0711] Estes resultados demonstram que a administração de uma vacina contra o câncer em combinação com IL-12 ancorada em colágeno (IL12-MSA-lumican) em camundongos com tumor resulta em um efeito antitumoral sinérgico, diminuindo o

crescimento do tumor e aumentando a sobrevida percentual em maior extensão que administração da vacina contra o câncer ou IL12-MSA-lumican sozinho. Estes resultados mostram que a ancoragem de colágeno intratumoral de uma citocina (por exemplo, IL-12) melhora sinergicamente o controle do tumor de uma vacina contra o câncer.

Exemplo 15: Efeito sinérgico da proteína de fusão IL12 de ligação ao colágeno e células CAR-T em um modelo de tumor de melanoma de camundongo

[0712] Para avaliar ainda mais a capacidade de uma proteína de fusão IL-12 de ligação ao colágeno para potencializar sinergicamente tratamentos antitumorais, o(s) efeito(s) antitumoral da proteína de fusão IL-12 de ligação ao colágeno IL12-MSA-Lumican em combinação com CAR As células-T foram avaliadas em um modelo de melanoma de camundongo B16-F10. Resumidamente, $0,5 \times 10^6$ células B16-F10 (ATCC), ressuspensas em 50 µL de PBS estéril, foram inoculadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6 fêmeas de 6-8 semanas de idade no dia 0. Células CAR-T específicas de B16F10 foram gerados pela transdução de esplenócitos CD3⁺ para expressar um CAR composto de fragmento variável de cadeia única (scFv) de TA99 fundido a domínios de sinalização de CD28 e CD3ζ coestimuladores. Para garantir o enxerto de células CAR-T, todos os camundongos foram pré-condicionados com irradiação corporal total no dia anterior a uma injeção em bolus de 10 milhões de células CAR-T por via intravenosa (i.v.). Alteração de peso da linha de base, área tumoral e sobrevivência de camundongos tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de PBS (n=9) ou IL-12 (n=6 para IL12-MSA; n=5 para IL12-MSA- Lumican), ou CAR-T (n=12) sozinho, ou

CAR-T e IL12 (n=7 para IL12-MSA; n=5 para IL12-MSA-Lumican) nos dias 5 e 11 foram monitorados ao longo do tempo (FIG. 12, da esquerda para a direita).

[0713] Como mostrado na FIG. 12, o tratamento com células CAR-T ou IL12-MSA-Lumican (2,3 ug/dose) sozinho diminuiu a área do tumor (painel do meio) e aumentou a sobrevivência (painel da direita). No entanto, a administração de uma combinação de células CAR-T e IL12-MSA-Lumican a camundongos com tumor resultou na regressão do tumor durável, reduzindo a área do tumor e aumentando a sobrevivência em maior extensão do que o tratamento com células CAR-T ou IL12-MSA-Lumican sozinho. O tratamento com células CAR-T em combinação com IL12-MSA também resultou na regressão do tumor e melhora modesta na sobrevivência. No entanto, o tratamento de combinação demonstrou toxicidade significativa, conforme mostrado pela grande redução na perda de peso corporal do animal após o tratamento. Tal toxicidade não foi observada para a combinação de células CAR-T e IL-12-MSA-lumican.

[0714] Estes resultados demonstram que a administração de células CAR-T específicas do antígeno tumoral em combinação com IL-12 ancorada em colágeno (IL12-MSA-lumican) a camundongos portadores de tumor resulta em um efeito antitumoral sinérgico, diminuindo o crescimento do tumor e aumentando a sobrevida percentual em maior extensão que a administração das células CAR-T ou IL12-MSA-lumican sozinhas. Estes resultados mostram que a ancoragem de colágeno intratumoral de uma citocina (por exemplo, IL-12) melhora sinergicamente o controle do tumor de células CAR-T específicas do antígeno tumoral.

Exemplo 16: Administração neoadjuvante de uma proteína de

fusão IL-12 de ligação a colágeno em combinação com PD-1 O bloqueio do ponto de verificação evita a recorrência metastática em um modelo de ressecção de tumor de mama de camundongo

[0715] Para avaliar ainda mais a capacidade de uma proteína de fusão de IL-12 de ligação a colágeno para potencializar sinergicamente tratamentos antitumorais, o (s) efeito (s) antitumoral da proteína de fusão IL-12 de ligação a colágeno IL12-MSA-Lumican em combinação com um O anticorpo anti-PD-1 (clone 29F.1A12, BioXCell) foi avaliado em um modelo de ressecção de tumor de mama de camundongo 4T1 e comparado com scIL12 combinado com anti-PD-1. Resumidamente, $0,5 \times 10^6$ células 4T1-Luc que expressam luciferase (MIT, Cambridge, MA), ressuspensas em 100 μ L de PBS estéril, foram injetadas na almofada de gordura mamária de camundongos fêmeas BALB/c de 6-8 semanas de idade no dia 0. Antes da ressecção cirúrgica das lesões primárias, os camundongos foram tratados com IL12-MSA-Lumican ou scIL12 intratumoralmente e anti-PD-1 sistemicamente (terapia neoadjuvante). Terapia neoadjuvante (anti-PD-1, 200 μ g/dose, administrado ip+IL12-MSA-lumican, 4,6 μ g/dose (30 pmol IL12/dose) ou scIL12, 1,9 μ g/dose (30 pmol IL12/dose)), administrada i.tu.) foi administrado no dia 7 e 13 e os tumores primários foram excisados cirurgicamente no dia 16. Os camundongos pós-operação foram monitorados por imagem *in vivo* (IVIS) para metástases. FIG. 13 mostra a mudança de peso corporal total durante o tratamento neoadjuvante (painel esquerdo), crescimento do tumor primário e peso (painel do meio) e porcentagem de sobrevivência (painel direito) de camundongos tratados com injeções intratumorais (i.tu.) de IL-12 (n = 5 para scIL12; n = 5 para

IL12-MSA-Lumican) e injeção intraperitoneal (ip) de anti-PD-1 no dia 7 e 13. As setas indicam o tempo de tratamento e a cruz indica o tempo de cirurgia.

[0716] Como mostrado na FIG. 13, a combinação de qualquer versão de IL-12 (scIL12 ou IL12-MSA-Lumican) e anticorpo anti-PD-1 não era abertamente tóxica com base na ausência de perda de peso (painel esquerdo). No entanto, a terapia neoadjuvante com IL12-MSA-Lumican levou a uma maior redução do tumor primário do que a versão sem ancoragem scIL-12 (painel do meio). Após a cirurgia, os camundongos foram monitorados para metástases por imagem de bioluminescência *in vivo*. IL12-MSA-Lumican protegeu completamente os camundongos do crescimento metastático, enquanto vários camundongos tratados com scIL-12 tiveram recidiva.

[0717] Estes resultados demonstram que a administração de anticorpo anti-PD-1 em combinação com IL-12 ancorado em colágeno (IL12-MSA-lumican) a camundongos com tumor resulta em um efeito antitumoral sinérgico, diminuindo o crescimento do tumor primário e aumentando a sobrevida percentual após ressecção cirúrgica do tumor em uma extensão maior do que a administração de uma combinação de IL-12 (scIL12) e anticorpo anti-PD-1 de não ligação ao colágeno. Esses resultados demonstram que a IL-12 de ancoragem de colágeno em um ambiente neoadjuvante melhora os resultados pós-operatórios.

Exemplo 17: Proteínas de fusão de quimiocina de ligação de colágeno induzem migração de células imunes e infiltração de tumor

[0718] A infiltração de células T é crítica para a imunidade antitumoral durável. Existe uma correlação entre a infiltração de células T e a expressão derivada de células

tumorais de CCL3, CCL4 e CCL5. Spranger et al., (2015) *Nature* 523: 231-235 (2015); Spranger et al. (2016) *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E7759 – E7768 (2016). CCL3 (MIP-1 α) liga-se com alta afinidade ao CCR1 e baixa afinidade ao CCR5, mediando assim o recrutamento de células T, células B e monócitos. O CCL4 (MIP-1 β) se liga ao CCR5 mediando o recrutamento geral de linfócitos. CCL5 (RANTES) se liga a vários receptores de quimiocinas (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5) e, assim, atrai monócitos, células T, eosinófilos e outras células do sistema imunológico. As quimiocinas de recrutamento de células T também são mais prevalentes em tumores submetidos à regressão imunomediada produtiva. Liang et al., (2016) *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 5000-5005; Schlecker et al., (2012) *J Immunol* 189: 5602-5611; Brewitz et al., (2017) *Immunity* 46: 205-219; Kanegasaki et al., (2014) *Cancer Res* 74: 5070-5078; Wittrup (2017) *Trends Cancer Res* 3: 615-620.

[0719] Para avaliar a capacidade de expressar quimiocinas de ligação ao colágeno em células de mamíferos, três citocinas de ligação ao colágeno marcadas com His compreendendo lumican fundido a CCL3, CCL4 ou CCL5 foram expressas transitoriamente em células de rim embrionário humano 293 (HEK293). Resumidamente, células HEK293 (a 1 milhão de células/mL de densidade) foram transfectadas com DNA de plasmídeo filtrado estéril (1 mg por litro de cultura de células) usando polietilenimina (2 mg por litro de cultura de células) em meio OptiPro sem soro (20 mL por litro cultura de células) (Thermo Fisher). TA99 foi purificado usando resina rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) conforme descrito anteriormente (Zhu et al. 2015). Proteínas marcadas com His foram isoladas do sobrenadante HEK293 usando

TALON Metal Affinity Resin (Takara Bio Inc.). As proteínas de fusão de citocina foram então ainda purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho usando uma coluna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg em um sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare) que foi pré-tratado por 4 horas com NaOH 1 M para remover a endotoxina e posteriormente equilibrado em estéril PBS (Corning). Após a purificação, todas as proteínas foram trocadas por tampão em PBS estéril (Corning), filtrado estéril de 0,2 micra (Pall Corporation) e confirmado para conter níveis mínimos de endotoxina ($< 0,1$ EU por injeção) usando um ensaio LAL cromogênico (Lonza). Para confirmar seus pesos moleculares, as proteínas foram executadas ao lado de uma Escada de Proteína Sharp Prestained Novex em um gel de proteína NuPAGE Bis-Tris 4-12% (Life Technologies) com tampão de corrida MES a 1%. Os níveis de expressão relativos às proteínas de fusão de ligação ao colágeno, marcadas com His nos eluentes resultantes foram avaliados por SDS-PAGE (não mostrado).

[0720] Expressão transitória de Lumican, Lumican D213A (SEQ ID NO:125), Lumican-Gluc, Lumican-CCL3 (SEQ ID NO:153), Lumican-CCL4 (SEQ ID NO:156) e Lumican-CCL5 (SEQ ID NO:160) em células HEK293 foi alcançado, conforme determinado por análise SDS-PAGE mostrando pela presença de coloração de proteína em ou próximo ao respectivo peso molecular esperado de cada proteína de fusão.

[0721] Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão de ligação ao colágeno compreendendo quimiocinas são capazes de se expressar e ser purificadas a partir de células de mamíferos.

[0722] Para avaliar a capacidade das proteínas de fusão

lumican-quimiocina geradas como descrito acima para induzir inflamação (por exemplo, migração de células imunes), um ensaio de peritonite inflamatória in vivo foi realizado conforme descrito anteriormente (Proudfoot et al., (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100: 1885-1890. Resumidamente, a cavidade peritoneal é revestida por um mesotélio rico em colágeno e vasculatura. Quando injetados intraperitonealmente, os constructos de ligação à matriz (por exemplo, proteínas de fusão de quimiocina que se ligam ao colágeno) aderem a este revestimento. lumican-quimiocinas, a localização mesotelial pode criar um gradiente de concentração que medeia o extravasamento de células imunes para fora dos vasos sanguíneos próximos e para a cavidade peritoneal. Esses infiltrados são recuperados por lavagem intraperitoneal para imunofenotipagem ex vivo. Consequentemente, camundongos BALB/c foram injetados intraperitonealmente com 1 nmol equivalente em 200 uL de PBS estéril de Lumican-Gluc, Lumican-CCL3, Lumican-CCL4 ou Lumican-CCL5 e sacrificado 18 horas após a lesão ection. A cavidade peritoneal foi lavada três vezes massageando suavemente 5 mL de PBS gelado na cavidade e juntando as lavagens. As células coletadas foram enumeradas usando Accuri Flow Cytometer.

[0723] As proteínas de fusão Lumican-quimiocina compreendendo CCL3, CCL4 ou CCL5 foram capazes de mediar a infiltração celular total em comparação com uma injeção de Lumican-GLuc (dados não mostrados). Quando os infiltrados foram imunofenotipados por coloração com marcador de superfície, as lavagens de camundongos tratados com Lumican-CCL3, Lumican-CCL4 ou Lumican-CCL5 continham uma maior

abundância de macrófagos, seguidos por neutrófilos, células NK, DCs, células B e células T em relação às lavagens de camundongos tratados com PBS ou Lumican-Gluc (dados não mostrados).

[0724] Estes resultados demonstram que i.p. a administração de quimiocinas de ligação ao colágeno (por exemplo, Lumican-CCL3, Lumican-CCL4 ou Lumican-CCL5) induz a migração de células imunes, incluindo células T, para a cavidade peritoneal de camundongos. Estes resultados sugerem que a administração intratumoral de proteínas de fusão lumican-quimiocina irá induzir inflamação (por exemplo, infiltração de células imunes), imitando assim tumores de resposta imunológica.

[0725] Para avaliar o efeito terapêutico de induzir a inflamação usando quimiocinas lumican em um cenário de tumor, Lumican-CCL3 (Lum CCL3) e Lumican-CCL5 (Lum CCL5) foram testados em ambos os modelos de tumor de mama 4T1 e de melanoma B16F10, conforme descrito neste documento. Tratamento intratumoral de camundongos com tumor com Lumican-GLuc (20 ug/dose) ou uma combinação de Lumican-CCL3 (5,5 ug/dose), Lumican-CCL4 (5,4 ug/dose) e Lumican-CCL5 (5,5 ug/dose) na presença ou ausência de IFN α ocorreu no dia 7 e dia 13. A administração intraperitoneal de IFN α (50 ug/dose) ocorreu no dia 9 e dia 15.

[0726] Como mostrado na FIG. 14A, a injeção intratumoral de uma combinação de Lumican-CCL3, Lumican-CCL4 e Lumican-CCL5 na presença de IFN α sistêmico retardou ligeiramente o crescimento do tumor 4T1. O mesmo tratamento administrado em camundongos com tumor B16F10 mostrou conclusivamente que IFN α e quimiocinas lumican, administrados separadamente ou

em combinação, atrasam o crescimento de forma equivalente (FIG. 14B). Para determinar se lumican-quimiocinas têm impacto direto na viabilidade das células tumorais, concentrações crescentes de proteínas de fusão Lumican-GLuc (Lum GLuc), Lumican-CCL3 (Lum CCL3), Lumican-CCL5 (Lum CCL5) foram incubadas com células 4T1 ou B16F10 em cultura de células por 48 horas. Após uma incubação adicional de 4 horas com 10 µL do reagente de detecção de proliferação celular WST-1 (Sigma Aldrich), a proliferação foi medida por absorvância a 450 nm (referência 700 nm). Como mostrado na FIG. 14C e 14D, as citocinas lumican não tiveram efeito sobre a proliferação em células 4T1 ou células B16F10, indicando que qualquer atraso no crescimento tumoral observado in vivo surgiu de um efeito imunomediado e não de um efeito tumoricida direto.

Exemplo 18: Efeito sinérgico da proteína de fusão de quimiocina CCL11 de ligação ao colágeno e vacina contra o câncer em um modelo de tumor de melanoma de camundongo

[0727] Os eosinófilos são conhecidos por secretar quimioatraentes de células T e normalizar a vasculatura do tumor, facilitando assim a infiltração intratumoral. Carretero, et al., (2015) Nat Immunol 16: 609-617. A quimiocina CCL11 (eotaxina) é conhecida por recrutar eosinófilos (Menzies-Gow et al., (2002) J Immunol 169 (5): 2712-2718). Por conseguinte, uma proteína de fusão CCL11-lumican (SEQ ID NO: 172), em combinação com a vacina contra o câncer descrita no Exemplo 14 foi testada quanto à sua capacidade de recrutar eosinófilos para um tumor e, assim, mediar o controle subsequente do tumor na presença de TNF α sistêmico e IFN γ . Resumidamente, camundongos C57BL/6 foram

inoculados com 3×10^5 células B16F10 no flanco direito no dia 0. As vacinações foram administradas por via subcutânea (sc) na base da cauda com um primer no dia 5 e reforços no dia 11 e 17. A vacinação foi composta por 90 µg de TTR-Trp1-EGP e 50 µg de di-nucleotídeo cíclico para iniciar uma resposta de célula T CD8 + específica de tumor. Tratamentos intratumorais com CCL11-lumican (5 ug/dose/camundongo), $\text{TNF}\alpha$ (5,8 pmol/dose/camundongo) e $\text{IFN}\gamma$ (6,3 pmol/dose/camundongo) foram administrados nos dias 11, 17, 23 e 29. A área do tumor (média + DP) foi medida ao longo do tempo em dias alternados [0728] Como mostrado na FIG. 15, o tratamento de camundongos com tumor com CCL11-Lumican em combinação com uma vacina contra o câncer específica de B16F10, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, diminuiu a área do tumor em maior extensão do que a vacina contra o câncer sozinha ou em combinação com $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ sistêmicos.

Exemplo 19: Efeito sinérgico da proteína de fusão de quimiocina CCL11 de ligação ao colágeno e vacina contra o câncer em um modelo de tumor de melanoma de camundongo

[0729] Para avaliar ainda mais a capacidade de uma proteína de fusão de quimiocina de ligação ao colágeno para potencializar sinergicamente tratamentos antitumorais, os efeitos antitumorais da proteína de fusão de quimiocina de ligação ao colágeno CCL11-lumican em combinação com MSA-IL2 (30 µg/dose) e um anticorpo direcionado a tumor direcionado à classe Alpha-V de integrinas (2.5F-Fc; ver Kwan et al., (2017) J Exp Med 215 (9): 10.1084/jem.20160831) foi avaliado em um B16- Modelo de melanoma de camundongo F10. Resumidamente, $0,5 \times 10^6$ células B16-F10 (ATCC), ressuspensas em 50 µL de PBS estéril, foram inoculadas por via subcutânea

no flanco direito de camundongos C57BL/6 fêmeas de 6-8 semanas de idade no dia 0. Anticorpo de direcionamento de tumor 2.5F-Fc e MSA-IL2 foram administrados por via intraperitoneal (ip) nos dias 5, 11 e 17. Tratamentos intratumorais com CCL11-lumican (5 ug/dose/camundongo) foram administrados nos dias 5 e 11. O crescimento do tumor foi monitorado ao longo do tempo a cada dois dias e é mostrado como áreas tumorais individuais (mm²) na FIG. 16A.

[0730] Como mostrado na FIG. 16B, o tratamento de camundongos com tumor com CCL11-lumican em combinação com o anticorpo de direcionamento ao tumor 2.5F-Fc e MSA-IL-2 diminuiu a área do tumor em maior extensão do que o tratamento sem CCL11 (lumican sozinho).

[0731] Coletivamente, os resultados mostrados nos Exemplos 17, 18 e 19 mostram que lumican-quimiocinas induzem inflamação localizada, recrutando células imunes para o local de administração local e que lumican-quimiocinas podem ser usadas em combinação com outras concretizações terapêuticas antitumorais para potencializar seus efeitos e fornecem controle sinérgico do tumor.

Exemplo 20: Expressão recombinante de proteínas de fusão de anticorpo de ligação a colágeno

[0732] Para avaliar a capacidade de expressar proteínas de fusão de anticorpos de ligação ao colágeno em células de mamíferos, lumican fundido a 5 anticorpos diferentes foram gerados (4420-Lumican (SEQ ID NOs: 142 e 143; anti-fluoresceína), LOB12.3-Lumican (SEQ ID NOs: 146 e 147; anti-4-1BB), 3/23-Lumican (SEQ ID NOs: 184 e 185; anti-CD40), 2C11-Lumican (SEQ ID NOs: 150 e 151; anti-CD3), e OX86-Lumican (SEQ ID NOs: 148 e 149; anti-OX40) e expresso

transitoriamente em células de rim embrionário humano 293 (HEK293F). Todas as fusões IgG-Lumican foram codificadas em um único plasmídeo (dados não mostrados). Todos os IgG-lumican os constructos foram expressos como a cadeia leve primeiro (VL), com uma região constante kappa murina (mK), seguida por um peptídeo T2A (SEQ ID NO: 152; T2A) e finalmente a cadeia pesada (VH), com uma constante IgG2c murina região (mIgG2c), fundida a lumican (LUM) com um ligante curto ((G4S) 3). O peptídeo T2A faz com que o ribossomo pule a formação de ligação entre os dois últimos resíduos do peptídeo, permitindo a expressão de dois diferentes proteínas dentro de um único quadro de leitura aberto. Um local de clivagem de furina (F) foi incluído a montante do peptídeo T2A, permitindo que o peptídeo T2A fosse removido da extremidade da cadeia leve. Além disso, um ligante GSG (GSG) foi incluído a montante do peptídeo T2A, que foi mostrado para aumentar a eficiência de clivagem do peptídeo T2A (Chng et al., (2015) mAbs 7 (2): 403-412). Tanto a cadeia leve como a cadeia pesada compreendem uma sequência líder para garantir o tráfego adequado da proteína para a via secretora. Todos os constructos foram derivados com mutações de silenciamento da função efetora LALA-PG, que eliminam tanto a ligação a receptores Fc gama quanto a ligação de Clq (Lo et al., (2017) J Biol Chem 292: 3900-3908).

[0733] A expressão e purificação do anticorpo anti-fluoresceína (4420) sozinho ou fundido com lumican foi alcançada conforme indicado pela análise SDS-PAGE revelando bandas de proteínas localizadas no peso molecular previsto em condições redutoras (R) e não redutoras (NR) (dados não mostrados). Da mesma forma, a expressão de proteínas de fusão

agonista IgG-lumican LOB12.3-Lumican (anti-4-1BB), 3/23-Lumican (anti-CD40), 2C11-Lumican (anti-CD3) e OX86-Lumican (anti-OX40) foi alcançado como indicado pela análise SDS-PAGE revelando bandas de proteínas localizadas no peso molecular previsto em condições redutoras (R) e não redutoras (NR) (dados não mostrados). Todas as proteínas de fusão IgG-lumican foram purificadas usando resina de proteína A recombinante (rProtein Sepharose-A, resina Fast Flow (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

[0734] Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão do anticorpo de ligação ao colágeno (por exemplo, IgG-lumican) se expressam em células de mamíferos e que a fusão do polipeptídeo de ligação ao colágeno não afeta a purificação.

Exemplo 21: Proteínas de fusão de anticorpo de ligação a colágeno recombinante ligam o colágeno in vitro e são retidas intratumoralmente in vivo

[0735] Para avaliar a capacidade das proteínas de fusão do anticorpo de ligação ao colágeno para se ligarem ao colágeno, as proteínas de fusão IgG-lumican expressas e purificadas como descrito no Exemplo 20 foram testadas quanto à sua capacidade de se ligar a placas revestidas com colágeno I por ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços revestidas com colágeno I (Gibco) foram bloqueadas à temperatura ambiente por 1 hora com PBS + 1% p/vol de albumina de soro bovino (BSA) + 0,05% p/vol de Tween-20 (PBSTA) e depois incubadas com várias concentrações de lumican em PBSTA por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados com PBSTA e então incubados com uma cadeia pesada de IgG2c de cabra anti-camundongo conjugada com peroxidase de rábano (ab98722,

Abcam) a uma diluição de 1:1000 (concentração final de 0,5 µg/ml) em PBSTA por 1 hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente com PBSTA e, em seguida, a solução de substrato Ultra TMB-ELISA de 1 etapa (Thermo Fisher Scientific) foi adicionada por 10 minutos seguido por ácido sulfúrico 1 M para interromper a reação cromogênica. Absorbância a 450 nm (corrigida com uma absorbância de referência a 570 nm) medida usando um leitor de microplacas Infinite M1000 (Tecan). As proteínas de fusão do anticorpo de ligação ao colágeno purificadas LOB12.3-Lumican (anti-4-1BB), 3/23-Lumican (anti-CD40), 2C11-Lumican (anti-CD3) e OX86-Lumican (anti-OX40) foram avaliada por ELISA em uma placa revestida com colágeno I. Como mostrado na FIG. 17A, todas as proteínas de fusão IgG-lumican retêm a capacidade de se ligar ao colágeno com afinidades medidas semelhantes. Estes resultados demonstram que o lumican fundido à cadeia pesada de IgGs retém a capacidade de se ligar ao colágeno I.

[0736] A capacidade da proteína de fusão 4420-Lumican e do anticorpo 4420 de serem retidos intratumoralmente *in vivo* também foi avaliada. Ambas as proteínas foram purificadas usando cromatografia de exclusão de tamanho e então marcadas com NHS-AlexaFluor 647 (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Camundongos BALB/c fêmeas de seis a oito semanas de idade foram injetados com 1×10^6 células de carcinoma mamário 4T1 por via subcutânea no dia 0. No dia 7, quantidades equimolares de anticorpo 4420 marcado com fluorescência e 4420-Lumican foram injetadas por via intratumoral em três camundongos cada, junto com três ratos de controle PBS. A retenção no tumor foi avaliada através da medição da fluorescência em um instrumento IVIS Spectrum

(Perkin Elmer) em 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 100, 124 e 148 horas (FIG . 17B).

[0737] Como mostrado na FIG. 17B, o sinal fluorescente de camundongos injetados com o anticorpo 4420 marcado com fluorescência (4420 LALA-PG) diminuiu mais rápido e em maior extensão do que o sinal da proteína de fusão 4420-lumican (4420-LUM LALA-PG)

[0738] Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão do anticorpo de ligação ao colágeno (por exemplo, proteína de fusão 4420-lumican) são fisicamente retidas no local da injeção intratumoral ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que as moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno compreendendo um anticorpo terapêutico ou fragmento de ligação ao antígeno exibirão retenção intratumoral e disseminação sistêmica limitada.

Exemplo 22: Expressão recombinante de proteínas de fusão de ligação a colágeno-IgG

[0739] Como uma estratégia para localizar virtualmente qualquer IgG intra-tumoral sem a necessidade de regenerar o anticorpo como uma fusão lumican direta, várias proteínas de ligação de IgG diferentes foram fundidas com lumican. Tal como acontece com outras proteínas de fusão lumican aqui descritas, um espaçador de albumina de soro de camundongo (MSA) foi usado para garantir que a ligação lumican-colágeno não interferisse com a funcionalidade do domínio de ligação de IgG. Vários ligantes IgG diferentes foram selecionados para triagem, incluindo um domínio Z dimerizado (um dos cinco domínios de ligação de IgG da proteína A, aqui referido como "ZZ") (Jendeborg et al., (1995) J Mol Recognit 8: 270- 278), um domínio de ligação de IgG dimerizado da proteína G (aqui

referido como "SpG2") (Jung et al., (2009) Anal Chem 81: 936-942), um ligante IgG isolado de uma biblioteca de exibição de levedura Sso7d (Gera et al., (2011) J Mol Biol 409 "601-616), um ligante IgG isolado de uma biblioteca de exibição de levedura de domínio Fibronectina tipo III (Fn3) (Hackel et al., (2010) J Mol Biol 401: 84-96), e dois pequenos peptídeos projetados para ligar regiões Fc de IgG (aqui referidas como "Fc-III-4C" e "RRGW) (Gong et al., (2015) Bioconjug Chem 27: 1569-1573; Tsai et al., (2014) Anal Chem 86: 2931-2938). Além disso, uma fusão lumican-MSA a 4m5.3 também foi clonada e expressa. 4m5.3 é um scFv com afinidade de ligação femtomolar à fluoresceína (Midelfort et al., (2004) J Mol Biol 343: 685-701). A fluoresceína pode ser conjugada a anticorpos com uma ampla gama de estratégias de acoplamento emprestadas do campo de conjugados de anticorpo e droga (ADCs) (Carter & Lazar (2017) Nat Rev Drug Discov 17: 197-223. Usando 4m5.3-MSA-Lumican com anticorpos marcados com fluorescência servem como uma estratégia alternativa para localizar IgGs no tumor. Esta construção também serve como uma plataforma generalizada capaz de se ligar firmemente a e localizar qualquer proteína ou molécula pequena marcada com fluoresceína (ou FITC).

[0740] Para avaliar a capacidade de expressar proteínas de fusão de ligação a IgG de ligação a colágeno em células de mamíferos, lumican fundido a 8 polipeptídeos de ligação a IgG diferentes foram gerados (Lumican-MSA-Fc-III-4C (SEQ ID NO: 136; 105,7 kDa), Lumican-MSA-Fn3 (SEQ ID NO: 137; 113,7 kDa), Lumican-MSA-SpG2 (SEQ ID NO: 138; 117,7 kDa), ZZ-MSA-Lumican (SEQ ID NO: 135; 117,5 kDa), WGR-MSA-Lumican (SEQ ID NO: 140; 104,6 kDa), RRGW-MSA-Lumican (SEQ ID NO: 139; 104,6

kDa), Sso7d-MSA-Lumican (SEQ ID NO: 134; 111,5 kDa) e 4m5.3 - MSA-Lumican (SEQ ID NO: 133; 132,2 kDa)) e expresso transitoriamente em células de rim embrionário humano 293 (HEK293). Todas as proteínas de fusão de ligação lumican-IgG foram marcadas com His para facilitar a purificação de lisados HEK293 usando TALON Metal Affinity Resin (Takara Bio Inc.) de acordo com as instruções do fabricante.

[0741] A expressão e purificação de todas as 8 proteínas de fusão de ligação lumican-IgG foram alcançadas como indicado por análise SDS-PAGE revelando bandas de proteínas localizadas nos pesos moleculares previstos em condições redutoras e não redutoras (dados não mostrados).

[0742] Estes resultados demonstram que proteínas de fusão de ligação a colágeno marcadas com His (por exemplo, IgG-lumican) expressam em células de mamíferos e são capazes de ser purificadas.

Exemplo 23: Proteínas de fusão de ligação a colágeno recombinante de ligação a IgG ligam colágeno e IgG in vitro

[0743] Para avaliar a capacidade das proteínas de fusão de ligação de IgG de ligação a colágeno para se ligar ao colágeno, as proteínas de fusão de ligação lumican-IgG expressas e purificadas como descrito no Exemplo 22 foram testadas quanto à sua capacidade de se ligar a placas revestidas com colágeno I e colágeno IV por ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços de fundo plano Nunc MaxiSorp (ThermoFisher) foram revestidas durante a noite com anticorpos de controle de isotipo IgG2a de camundongo (100 µL, 2,5 µg/mL, BioXCell Cl.18.4) durante a noite a 4°C. As placas foram então bloqueadas à temperatura ambiente por 1 hora com PBS + 1% p/vol de albumina de soro bovino (BSA) +

0,05% p/vol de Tween-20 (PBSTA) e depois incubadas com várias concentrações de lumican em PBSTA por 2 horas em temperatura do quarto. Os poços foram lavados com PBSTA e depois incubados com um policlonal anti-6xHis conjugado com peroxidase de rábano (ab1187, Abcam) a uma diluição de 1:2000 (concentração final de 0,5 µg/ml) em PBSTA durante 1 hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente com PBSTA e, em seguida, a solução de substrato Ultra TMB-ELISA de 1 etapa (Thermo Fisher Scientific) foi adicionada por 10 minutos seguido por ácido sulfúrico 1 M para interromper a reação cromogênica. Absorbância a 450 nm (corrigida com uma absorbância de referência a 570 nm) medida usando um leitor de microplacas Infinite M1000 (Tecan).

[0744] As proteínas de fusão de ligação lumican-IgG purificadas Lumican-MSA-Fn3, Lumican-MSA-SpG2, ZZ-MSA-Lumican e 4m5.3-MSA-Lumican foram avaliadas por ELISA em uma placa revestida com colágeno I e um colágeno IC -praca revestida. Lumican foi usado como um comparador. Como mostrado na FIG. 18A, todas as proteínas de fusão de ligação lumican-IgG retêm a capacidade de se ligar ao colágeno com afinidades medidas semelhantes. Estes resultados demonstram que o lumican fundido a vários polipeptídeos de ligação a IgG retém a capacidade de se ligar ao colágeno I e ao colágeno IV.

[0745] As proteínas de fusão de ligação lumican-IgG purificadas do Exemplo 22 foram testadas quanto à sua capacidade de se ligar ao controle do isótipo IgG2a de camundongo (Clone C1.18.4), conforme medido por ELISA. Resumidamente, um anticorpo secundário anti-His (Abcam, ab1187) conjugado com HRP foi usado para detectar as fusões ligante de IgG-lumican, juntamente com Substrato Ultra TMB-

ELISA de 1 etapa (Thermo Fischer).

[0746] Como mostrado na FIG. 18B, todas as proteínas de fusão de ligação lumican-IgG testadas se ligam a IgG2a de camundongo, com uma gama de afinidades (KD).

[0747] Coletivamente, esses resultados demonstram que a proteína de fusão lumican-IgG se liga ao colágeno I e ao colágeno IV e se liga a IgGs. Estes resultados sugerem que as proteínas de fusão de ligação lumican-IgG usadas em combinação com IgG (por exemplo, anticorpos terapêuticos) se ligariam ao colágeno e IgG e reteriam a IgG no local da administração local.

Exemplo 24: Lumican de ligação ao colágeno é retido na cavidade peritoneal após injeção intraperitoneal

[0748] Os exemplos acima mencionados demonstraram a utilidade de lumican para ser retido intratumoralmente após administração intratumoral (i.tu.). A cavidade peritoneal também é revestida por um mesotélio rico em colágeno. Para avaliar a capacidade do lumican de ser retido na cavidade peritoneal após injeção intraperitoneal (ip), camundongos BALB/c foram injetados intraperitonealmente com Gaussia Luciferase (GLuc; 20 µg/ dose) sozinho ou fundido com Lumican (Lumican-GLuc; 40 µg/dose). Imediatamente após a injeção, os camundongos foram fotografados por fluorescência *in vivo* (epi-iluminação, auto-exposição). 24 horas após a injeção, os ratos foram fotografados novamente.

[0749] O Lumican-GLuc é retido na cavidade, no entanto, o GLuc sozinho se difunde rapidamente no peritônio imediatamente após a injeção, levando a um sinal inicial baixo (dados não mostrados). A retenção de Lumican foi observada na cavidade 24 horas após a injeção.

[0750] Os tumores incrustados neste revestimento ou no omento da cavidade peritoneal também são ricos em colágeno. Para determinar se i.p. a administração de lumican resultará no acúmulo em tumores semelhantes ao omento, lumican marcado por fluorescência com Alexa Fluor 647 foi administrado a camundongos com microcolônias de tumor ovariano no tecido omental de camundongo. Resumidamente, os camundongos foram injetados com células OVCA433 em uma linha de células de tumor de ovário humano por via intraperitoneal e deixados formar microcolônias no omento por três semanas. 20 ug de lumican marcado foram injetados intraperitonealmente. O tecido omento excisado foi fotografado por microscopia de fluorescência. Lumican marcado foi injetado intraperitonealmente em camundongos com tumor. Em 1 hora, 6 horas e 24 horas após a injeção, omentos de camundongos foram excisados para imagens.

[0751] Como mostrado na FIG. 19, quando o Lumican é injetado intraperitonealmente em camundongos com tumores ovarianos que revestem o omento, o lumican se acumula preferencialmente nessas microcolônias tumorais. Uma hora após a injeção (painel esquerdo), o sinal fluorescente do lumican (mostrado em amarelo) foi distribuído uniformemente. Após 6 horas após a injeção (meio), foi amplamente retido apenas em torno das microcolônias tumorais (mostradas em vermelho) no omento (painel do meio). A retenção do lúmen foi observada às 24 horas (painel direito) em torno de grandes tumores. Estes resultados demonstram que i.p. a administração de lumican pode se acumular em locais ricos em colágeno e esse lumican é passível de vários modos de administração, incluindo injeção intraperitoneal.

Exemplo 25: Expressão de proteínas de fusão de IL-12 de ligação a colágeno a partir de RNA de auto-replicação em células de mamífero

[0752] Para avaliar a expressão de moléculas imunomoduladoras de ligação ao colágeno usando RNA, moléculas de RNA autorreplicantes (replicons) que codificam IL12-MSA e IL12-MSA-Lumican sozinhas ou fundidas a uma proteína fluorescente (mCherry) foram testadas quanto à sua capacidade de se expressar em B16F10 células de melanoma de camundongo. O replicon usado neste exemplo foi derivado de um alfavírus. O replicon foi excluído das proteínas estruturais do capsídeo, mas retém as proteínas não estruturais. As proteínas não estruturais correspondem à replicação de RNA baseada em RNA e à transcrição de RNA. O Ablc1 é um replicon mutante que exibe uma expressão mais robusta in vitro e in vivo em comparação com o replicon de tipo selvagem. O replicon Ablc1 contém quatro mutações nos genes nsP2 e nsP3 que prolongam a existência do replicon nas células e a transcrição subgenômica.

[0753] Resumidamente, $0,5 \times 10^6$ células B16F10 cultivadas em DMEM + FBS a 10% foram transfectadas usando reagentes de transfecção NEOnN (eletroporação) e os replicões Ablc1. A eficiência de transfecção foi detectada pelo analisador FACS 24 horas depois, usando configurações ópticas para detectar mCherry. A expressão de IL-12 foi quantificada usando o sobrenadante celular 24 horas após a transfecção e um ELISA comercial de IL-12 (seguido de acordo com as instruções do fabricante). A expressão de replicons foi avaliada em células B16F10 por determinação de mCherry por citometria de fluxo (FIG. 20A). Um ELISA comercial de IL-12 foi usado para

quantificar IL-12 em células B16F10 (FIG. 20B).

[0754] Como mostrado na FIG. 20A, células mCherry + B16F10 transfectadas com IL12-MSA-mCherry ou IL12-MSA-Lumican-mCherry foram observadas por citometria de fluxo. A proteína fluorescente mCherry é codificada no terminal C nessas replicações, portanto, a detecção da expressão de mCherry é uma indicação da expressão de comprimento total da proteína codificada.

[0755] Como mostrado na FIG. 20B, os sobrenadantes celulares mostram a expressão desses constructos a partir de células B16F10 transfectadas com replicações que codificam IL-12, mas não o controle Ablc1-GIM

[0756] Estes resultados demonstram que a entrega de proteínas de fusão Lumican é alcançável usando modos de administração além da injeção, incluindo replicon como mostrado.

Exemplo 26: Efeito sinérgico de proteínas de fusão de citocinas de ligação a colágeno, anticorpo anti-PD-1 e TA99 no modelo de camundongo $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{\text{f1/f1}}$

[0757] Para avaliar a eficácia das citocinas lumican em combinação com o bloqueio anti-PD-1 em um modelo de melanoma de camundongo difícil de tratar, o modelo de camundongo geneticamente modificado $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{\text{f1/f1}}$ (GEMM) (Spranger et al., (2015) Nature 523: 231-235; Momin et al., (2019) Sci. Transl. Med. 11, eeaw2614). Os melanomas neste GEMM são induzidos pela expressão de Cre regulada por tamoxifeno em melanócitos, que conduz a ativação do $\text{Braf}^{\text{V600E}}$ oncogênico e a deleção bialélica do supressor de tumor Pten. Os melanomas $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{\text{f1/f1}}$ têm menos neoantígenos e mais heterogeneidade do que os tumores B16F10. Este modelo tem

infiltração modesta de células T, mas o crescimento do tumor é apenas ligeiramente retardado pelo bloqueio de ponto de verificação duplo de PD-1 e proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4). Eu iria.

[0758] Para determinar se o tratamento com IL-2 e IL-12 de ligação ao colágeno junto com o bloqueio do ponto de verificação anti-PD-1 poderia revigorar a resposta em curso e iniciar novas respostas de células T, como foi observado em tumores B16F10 (FIGS. 9, 10 e 13), e se a iniciação de células T de novo e quaisquer efeitos abscopais pudessem ser aumentados pela inclusão de um agente direcionador de morte celular imunogênica, como o anticorpo direcionado a tumor TA99, o melanoma foi induzido pela aplicação de 4-hidroxitamoxifeno no flanco direito de $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ camundongos no dia 0. Após a indução, lesões de pigmento preto achatado são formadas. As lesões irão progredir para grandes massas sem terapia (dados não mostrados). No dia 25, os camundongos com tumor são tratados com controle de PBS (i.tu), com Lumican-MSA-IL2 (i.tu) + IL12-MSA-Lumican (i.tu) + TA99 (ip) + anti-PD-1 (ip), com Lumican-MSA-IL2 (i.tu) + IL12-MSA-Lumican (i.tu) + anti-PD-1 (ip), com MSA-IL2 (i.tu) + IL12-MSA (i.tu) + TA99 (ip) + anti-PD-1 (ip), ou com MSA-IL2 (i.tu) + IL12-MSA (i.tu) + anti-PD-1 (ip) nos dias 25, 31, 37, 43, 49, 55 e 61.

[0759] Como mostrado na FIG. 21A, camundongos com tumor $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ tratados com MSA-IL2 (i.tu) + IL12-MSA (i.tu) + TA99 (i.p.) + anti-PD-1 (i.p.) exibem desenvolvimento de lesão inibido.

[0760] Como mostrado na FIG. 21B, a sobrevivência geral de camundongos com tumor $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{\text{fl/fl}}$ tratados com anti-PD-1

e IL-2 e IL-12 de ligação ao colágeno com ou sem TA99 é comparável. Assim, TA99 não foi um componente necessário para a eficácia. Estes resultados afirmam que IL-2, IL-12 e bloqueio de checkpoint podem ser um tratamento eficaz de combinação agnóstica de tumor (FIGS. 9, 10 e 13).

[0761] O controle do tumor neste modelo também pode ser alcançado usando citocinas não ancoradas em vez de citocinas de ancoragem de colágeno, mas ao custo de toxicidade importante e potencialmente letal. Um terço dos camundongos tratados com IL12-MSA e MSA-IL2 foram sacrificados por causa de >20% de perda de peso corporal, enquanto nenhum camundongo tratado com IL12-MSA-Lumican e Lumican-MSA-IL2 sucumbiu à toxicidade relacionada ao tratamento (FIG. 21B). Estes resultados demonstram que as proteínas de fusão de ligação ao colágeno podem melhorar com segurança a sobrevida global neste tratamento de combinação agnóstica de tumor potente (FIG. 21B).

Exemplo 27: Capacidade LAIR de ligação a tumores in vivo.

[0762] Neste exemplo, a capacidade de LAIR para se ligar a tumores B16F10 excisados é medida. Os tumores B16F10 possuem pouco colágeno detectável e, portanto, servem como uma estimativa mais baixa para a capacidade de ligação de LAIR a um tumor. Resumidamente, camundongos/C57 foram inoculados com 1×10^6 células B16F10 injetadas por via subcutânea no flanco esquerdo. Sete dias depois, os tumores foram cuidadosamente excisados e separados de toda a pele e gordura subcutânea remanescente. Os tumores excisados foram então incubados em um detergente suave (PBS + 0,1% v/v Tween20) por 2 horas a 37°C e depois desagregados/empurrados através de um filtro de 70 microns (FIG. 22A). Como mostrado na FIG. 22B, a matriz

compreende um terço da massa do tumor.

[0763] A fração filtrada estava desprovida de matriz extracelular (ou seja, fração celular), enquanto a fração que não passou no filtro (ou seja, fração da matriz) era rica em matriz, conforme confirmado por um ensaio de hidroxiprolina (MAK008-1KT, Millipore Sigma) realizado de acordo com as instruções do fabricante (FIG. 22C). A hidroxiprolina (4-hidroxiprolina) é um aminoácido não proteinogênico formado pela hidroxilação pós-tradução da prolina. A hidroxiprolina é o principal componente do colágeno, onde serve para estabilizar a estrutura helicoidal. Como a hidroxiprolina é amplamente restrita ao colágeno, a medição dos níveis de hidroxilprolina é usada como um indicador do conteúdo de colágeno. Neste ensaio, a concentração de hidroxiprolina é detectada pela reação da hidroxiprolina oxidada com 4-(dimetilamino) benzaldeído (DMAB), que resulta no desenvolvimento de um produto colorimétrico (560 nm), proporcional à hidroxiprolina presente.

[0764] Cada fração da matriz do tumor foi então incubada em uma concentração de excesso de antígeno (10 μ M) ou concentração de depleção de antígeno (10 μ M) de LAIR marcado com AF647 para quantificar os locais de ligação de LAIR na fração da matriz. A fluorescência da solução foi monitorada ao longo do tempo até o estado estacionário ser alcançado. Como mostrado na FIG. 22D, uma diminuição na fluorescência é observada com o LAIR marcado com 1 μ M, que corresponde à depleção do LAIR do banho após a ligação ao colágeno dentro da fração da matriz. Uma diminuição de 20% na concentração da solução indica absorção de 0,2 nmol na matriz do tumor. Assim, um tumor B16F10 no dia 7 de um inóculo de células de 1

$\times 10^6$ possui 0,2 nmol de locais de ligação LAIR (FIG. 22D). Este número se correlaciona com o conteúdo de colágeno do tumor, conforme medido pelo conteúdo de hidroxiprolina (FIG. 22E). Esta experiência mostra que LAIR é capaz de se ligar a B1610, uma vez que a matriz B1610 é rica em colágeno.

Exemplo 28: Proteínas de fusão de ligação ao colágeno usando LAIR proporcionam benefício semelhante em comparação com o uso de Lumican.

[0765] Como o Lumican, o LAIR pode se ligar ao colágeno tipo I. Uma proteína de fusão de citocina LAIR foi usada para determinar se a proteína de fusão de ligação ao colágeno poderia potencializar a eficácia de uma citocina fundida. Uma proteína de fusão LAIR-citocina, LAIR-MSA-IL2 (SEQ ID NO: 186), foi expressa e purificada como descrito para Lumican-MSA-IL2 (Exemplo 1). No modelo de camundongo com melanoma B16F10 conduzido conforme descrito no Exemplo 6, LAIR-MSA-IL2 é pelo menos tão eficaz quanto Lumican-MSA-IL2 na redução do tamanho do tumor (compare a FIG. 3B com a FIG. 23A). LAIR-MSA-IL2 também aumentou a sobrevivência de camundongos para níveis comparáveis à sobrevivência em camundongos tratados com uma combinação de Lumican-MSA-IL2 com TA99 intraperitoneal (compare as FIGS. 3B e 3C com a FIG. 23B). Estes resultados demonstram que a estratégia de ligação ao colágeno pode ser utilizada usando Lumican, LAIR ou outras proteínas de ligação ao colágeno em sua classe.

Exemplo 29: A engenharia LAIR produz ligantes de colágeno de maior e menor afinidade

[0766] Neste exemplo, uma plataforma de exibição de fermento é utilizada para projetar variantes de afinidade superior e inferior de LAIR. Resumidamente, o gene LAIR de

camundongo foi amplificado usando PCR propenso a erros para produzir uma biblioteca de mutantes LAIR. Levedura RJY200 (versão modificada internamente de EBY100, ATCC) são transformadas com vetor pCTCON2 linearizado (41843, Addgene) e o produto de PCR propenso a erros é coletado e submetido a um evento de recombinação homóloga in vivo para produzir o plasmídeo de exibição final. O plasmídeo pCTCON2 é formatado de modo que os mutantes LAIR sejam fundidos à proteína Aga2, que está ligada à superfície da levedura por meio de uma ligação dissulfeto à proteína Aga1 ligada à membrana. O gene LAIR também é seguido por uma tag c-myc, permitindo que se investigue a expressão completa da proteína LAIR mutante. Uma vez que a expressão é induzida na superfície, a levedura pode ser corada com antígeno marcado e um anticorpo contra o marcador c-myc (ACMYC, Exalpha). Os clones que expressam LAIR, conforme determinado pela intensidade de coloração de c-myc, podem então ser classificados para menor ou maior afinidade usando FACS. (Chao et al., (2006) Nat. Protoc. 1 (2): 755-768).

[0767] Um mimetizador de peptídeo de colágeno solúvel (CRP, peptídeo relacionado ao colágeno) foi usado como o antígeno para o ensaio FACS, pois o ligante natural LAIR, colágeno I, não é solúvel. A sequência de proteína para este mimetizador é GCO- (GPO) 10-GCOG-NH₂ em que O representa aminoácidos de hidroxiprolina. Semelhante ao colágeno I, esses peptídeos formam espontaneamente estruturas helicoidais em solução. Um reagente de reticulação (cat#, empresa) foi usado para travar essas estruturas helicoidais no lugar. Após a purificação, o peptídeo reticulado foi usado como nosso antígeno (CRP-XL). Observe que este peptídeo foi usado em um formato biotinilado

(CRP-XL-Biotina) e não biotinilado (CRP-XL). (Uma descrição detalhada sobre esses peptídeos e sua funcionalização em um formato de hélice tripla pode ser obtida na CambCollab Inc.)

[0768] Duas estratégias diferentes foram usadas para isolar mutantes de ligação ao colágeno de alta e baixa afinidade. Para selecionar mutantes de baixa afinidade, foi utilizada a classificação de equilíbrio. Nesta estratégia, a expressão de LAIR foi induzida na superfície da biblioteca de leveduras. A biblioteca foi incubada sequencialmente com CPP-XL-biotina e anti-c-myc de galinha (ACMYC, Exalpha), seguido por anticorpos secundários (estreptavidina-AF647 (S21374, Thermo Fisher) e anti-galinha de cabra AF488 (A-1139, Invitrogen) até que o equilíbrio fosse alcançado. Leveduras que exibiam sinal AF647 fraco ou nenhum, mas eram positivas para AF488, indicando que expressavam LAIR, mas não se ligavam ao imitador de colágeno, foram classificadas em uma máquina BD FACS Aria. Após várias rodadas de classificação, as leveduras foram minipreparadas para isolar os plasmídeos de exibição, transformadas em colônias de bactérias e enviadas para sequenciamento. Clones prevalentes (clones que apareceram no sequenciamento com maior frequência do que outros (pelo menos duas vezes)) e/ou clones que continham mutações na bolsa de ligação do colágeno foram selecionados para análise a jusante. (Brondijk et al., (2010) Blood 115: 1364-1373). Esses mutantes foram clonados em um vetor de expressão de mamífero, solubilmente expresso como fusões para albumina de soro de camundongo (MSA), e teste d por sua capacidade de ligar o colágeno I em um ensaio ELISA. Conforme mostrado nas FIGS. 24A-E e 25A-C, clones de ligação fraca (FIGS. 24F, 24D) contêm mutações no bolso de ligação LAIR. SEQ ID NOS: 187-

192.

[0769] Para isolar mutantes de maior afinidade, uma estratégia de classificação cinética foi empregada. Após induzir a expressão, a biblioteca de levedura foi marcada com CRP-XL-biotina como descrito acima. Depois de alcançado o equilíbrio, os clones de levedura foram lavados e depois incubados em CRP-XL em excesso de 300: 1 (não biotinilado) durante 3-5 dias. O CRP-XL não marcado irá deslocar a CRP-XL-biotina dissociada para ligação ao LAIR (FIGS. 26C-D). Apenas os clones com a taxa de eliminação mais lenta, isto é, os clones de maior afinidade, permanecerão marcados. Os clones de levedura com sinal AF647 mais alto foram então classificados usando FACS. Após várias rodadas de classificação, clones de alta afinidade foram selecionados para análise downstream em um ensaio de competição. Os clones de levedura isolados foram marcados com CRP-XL-biotina e depois incubados com CRP-XL não marcado. As amostras foram tiradas ao longo do tempo e analisadas quanto ao sinal AF647 (FIGS. 26E-F). Como mostrado na FIG. 26G, uma alta afinidade do mutante LAIR, LAIR30.2.K1.B, tem uma taxa de desativação mais lenta do que WT LAIR. As mutações vistas neste clone estão localizadas fora da bolsa de ligação LAIR (FIG. 26B, SEQ ID NO: 193). Estes resultados mostram que LAIRs mutantes com uma gama de afinidades de ligação ao colágeno podem ser isolados. Estas variantes LAIR1 fornecem uma oportunidade para projetar proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo agentes terapêuticos que têm diferentes afinidades de ligação para tumores ricos em colágeno.

Tabela de Sequência Resumida

SEQ ID NO	Descrição	Sequência
1	IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LINGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
2	Tipo selvagem IL12B sem sinal (IL12B) Aminoácidos	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLTITSTDLTFSVKSSR GSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESL PIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS
3	Tipo selvagem IL12A sem aminoácidos de peptídeo sinal	RNLPVATPDPMFPC LHH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMALCLSSYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNAS
4	IL-15Ra	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECV LNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAHVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESL SPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSPSTGTTEISSH ESSHGTPSQTTAKNWELETASASHQPPGVYPQGHSDTT
5	IL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL LQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEE EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
6	TNF-alfa	VRSSSRTPSDKPVAVVANPQAEGLQWLNRANALLANGVELRDN QLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVN LLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPYILGGVFQLEKGDRLSAEINR PDYLDFAESGQVYFGI IAL
7	IFN-gama	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQ SQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKKRDDF EKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRG
8	IFN-alfa	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQ FQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPC AWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
9	IL-21	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSA FSCFQKAQLKSANTGNNERI INVS IKKLKRKPPSTNAGRQKHRLT CPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
10	IL-6	LAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCTPGVEPEDNATVHWVLRKP AAGSHPSRWAGMGRRLRLRSVQLHDSGNYSYRAGRPA GTVHLLVD VPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSP AEDFQEPQCYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFS KTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFY RLRFELRYRAERSKTF TTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQ EEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALT TNKDDD NILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLR FKKTWKLRLALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVS

		PSSLGSDNTSSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR
11	IL-5	DLLPDEKISLPPVNFITIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQNRNVNLEYQ VKINAPKEDDYETRITESKCVTILHKGFSASVRTILQNDHSLASS WASAEHAPPGSPGTSIVNLTCTTNTTEDNYSRLRSYQVSLHCTWL VGTDAPEDTQYFLYYRYGSWTEECQEYSKDTLGRNIACWFPRTFIL SKGRDWLAVLVNGSSSKHSAIRPFDQLFALHAIDQINPPLNVTAIEIE GTRLSIQWEKPVSAFPIHCFDYEVKIHNRNRYGLQIEKLMTNAFIS IIDDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLWSEWSQPIYVGNDEHKPLREW FVIVIMATICFILLILSLICKICHWLKLFPPIPAPKSNIKDLFVT TNYEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDVSF
12	IL-8	AVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIV KLSDGRELCCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS
13	IL-7	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHI CDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNC TGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEI KTCWNKILMGTKHEH
14	IL-17A	GITIPRNPGPCNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNR STSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVP IQQEILVLRREPPHPCNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHA
15	IL-23alfa	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHLVGHMDLREEGDEETT NDVPHIQCGDGDPCQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTG EPSLLPDSPVGQLHASLLGLSOLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQ RLLLRFKILRSLQAFVAVAAARVFAHGAATLSP
16	IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTI FIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNI KDTKSDIIFQRSVPGHDKMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLIL KKEDELGDRSIMFTVQNE
17	IL-1alfa	SAPFSFLSNVKNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRANDQYLTAALH NLDEAVKFDMGAYKSSKDDAKITVILRISKTQLYVTAQDEDQPVLL KEMPEIPKTIITGSETNLLFFWETHGKKNYFTSVAHPNLFIA TKQDY WVCLAGGPPSITDFQILENQA
18	IL-1beta	APVRSINCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFMSF VQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPK KKMEKRFFVNKIEINNKLFEFSAQFPNWIISTSAENMPVFLGGTK GGQDITDFTMQFVSS
19	IL-4	HKCDITLQEI IKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFC RAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWG LAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
20	IL-3	APMTQTTPLKTSWVNCNMIDEIITHLKQPPLPLLDNFNNLNGEDQD ILMENNLRPNLEAFNRAVKSQNASAIESILKNLLPCLPLATAAP TRHP IHIKGDWNEFRRLTIFYLKTLENAQAQQTTLSLAIF
21	IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFQMKDQLDNL LLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVN SLGENLKTLLRLRRLRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYK AMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
22	IL-13	PVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAAL ESLINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQ FVKDLLLHLKFLFREGFRN
23	IL-17a	GITIPRNPGPCNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNR STSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVP IQQEILVLRREPPHPCNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHA

24	IL-9	QGCPTLAGILDINFLINKMQEDPASKCHCSANVTSCLC LGIPSDNC TRPCF SERLSQMTNTTMQTRYPLIFSRVKKSVEVLKNNKCPYFSCE QPCNQTTAGNALTF LKSLLEIFQKEKMRGMRGKI
25	IFN-gama	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGLILKNWKEESDRKIMQ SQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVEIKEDMNVKFFNSNKKKRDDF EKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRG
26	IFN-alfa	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQ FQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQ NDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPC AWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE
27	GM-CSF	APARSPSPSTQ PWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEM FDLQEP TCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTP ETSCATQIITFESFKENLKD FLLVIPFDCWEPVQE
28	FLT3L	TQDCSFQHSPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPVTVASNLDDEELCGG LWRLVLAQRWMERLKT VAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKCAFQPPPS CLRFVQTNISRLLOETSEQLVALKPWITRQNF SRCLELQCQPDSS LPPPWSRPLEATAPTAPQPPLLLLLLLLLPVGLLLAAWCLHWQRT RRRTPRPGEQVPPVPSPQDLLLLVEH
29	G-CSF	ATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATYKLC HPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSGLFYQGL LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQ GAMP AFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRLHLAQ
30	LIF	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQ LINGSANALF ILYYT AQGEFPFNLDKLCGPNVTDFFPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLG SLGNITRDQKILNPSALSLSHKL NATADILRGLLSNVLCRLCSKYH VGHVDVTYGPDTSGKDV FQKKKLG CQLLGKYKQIIAVLAQAF
31	M-CSF	EEVSEYCSHMIGSGHLQSLQRLIDSQMETSCQITFEFVDQEQ LKDP VCYLKKAFLLVQD IMEDTMRFRDNTPN AIAIVQLQELSLRLKSCFT KDYEEHDKACVRTFYETPLQLLEKVKNVFNETKNLLDKDWNIFSKN CNNSFAECSSQDVVTKPDCNCLYPKAIPSSDPASVSPHQPLAP SMA PVAGLTWEDSEGTEGSSLLPGEQP LHTVDPGSAKQRPPRSTCQSFE PPETPVVKDSTIGGSPQPRPSVGAFNPGMEDILDSAMGTNWVPEEA SGEASEIPVPGTELSPSRPGGSMQTEPARP SNFLSASSPLPASA KGQQPADVTGTALPRVGPVRPTGQDWNHTPQKTDHP SALLRDPPEP GSPRISSLRPQGLSNPSTLSAQPQLSRSHSSGSVLP LGELEGRST RDRRSPAEP EGGPASEGAARPLPRFNSVPLTDTGHERQSEGSFSPQ LQESVFHLLVPSVILVLLAVGGLLFYRWRRRSHQEPQRADSPLEQP EGSPLTQDDRQVELPV
32	MIP-2	APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKN GQKACLNPA SP MVKKIIEKMLKNGKSN
33	MIP-1-beta	APMGSDPPTACCF SYTARKLPRNFVVDY YETSSLCSQPAVVFQTKR SKQVCADPSES SWVQEYVYDLELN
34	KP (também conhecido como CXCL1)	ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKN GRKACLNPA SP I VKKIIEKMLNSDKSN
35	MIG (também conhecido como CXCL9)	TPVVRKGRCS CISTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPSCEKIEI IATLK NGVQTC LNPDSADV KELIKKWEKQVSQKKKQKNGKKHQQKKV LKVR KSQRSRQKKT
36	IP-10 (CXCL10)	VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEI IATMK KKGEKRCLNPESKA IKNLLKAVSKERSKRSP

37	MCP-1	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTI VAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT
38	Eotaxina	GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLA KDICADPKKKWVQDSMKYLDQKSPTPKP
39	RANTES	SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPVVFVTRKN RQVCANPEKKWVREYINSLEMS
40	LIX	AGPAAAVLRELRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVVA SLKNGKEICLDPEAPFLKKVIQKILDGGNKEN
41	MIP-1-alfa	SLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAFYFETSSQCSKPGVIFLTRS RQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA
42	Albumina de soro humano (sequência de aminoácidos)	MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCADAHKSEVAHREKDLGEENFKALV LIAFAQYLQQCPFEDHVKLNVNEVEFAKTCVADESAENCDKSLHTL FGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFHQKDDNPNLPR VRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTCECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKASLQKFG ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTQVHTECHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMP ADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQN CELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKC CKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVN RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKL VAASQAALGLGGGSAPTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYK NPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNF HLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF CQSIISTLTGGGS
43	HSA madura (sequência de aminoácidos)	DAHKSEVAHREKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLNVNEV TEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFHQKDDNPNLPRVVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY LYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTCECCQAADKAACLLPKLDE LRDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAE VSKLVTDLTQVHTECHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK ECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEA KDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LLRLAKTYETTLEKCCAAADPHE CYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKK VPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQL CVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAET FTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFA AFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSAPTSSTKK TQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKH LCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGS
44	PD-1	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDPWNPPFTFFPALLVTEG DNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDC RFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLGSLVLLV WVLAVICSRARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWR EKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFP SGMGTSSPARRGSADGPRSAQPL RPEDGHCSWPL
45	PD-L-1	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEK

		QLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEEDLKVOHSSYRQRARLLKDQL SLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKIN QRILVVDPTSEHELTCQAEQYPAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNS KREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELP LAHPPNERTHLVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVKKCGIQDTNSK KQSDTHLEET
46	CTLA-4	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVV LASS RGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYM MGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP PPYY LGIGNGTQIY VIDPEPCPDS DFLLWILAAVSSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLTGTVYVKMPTEPE CEKQFQPYFI PIN
47	LAG3	MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPVWVAQEGAPAQLPCSP TIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSW GPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRP AR RADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLR ASDWILNCFSRDPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHLAESFL FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYA GAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNDFTL RL EDVSQAQAGT YTCHIHLEQ QLNATVTLAI ITVTPKSFGS PGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLL SQPWQCQLYQGERLLGAAYFTEL SSPGAQSRGR APGALPAGHL LLFLILGVLS LLLLVGTAFG FHLWRRQWRPRRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL
48	TIM3	MFSLPFDCLVLLLLLLLLLTSSEVEYRAEVGNAYLPCFYTPAAPG NLVPVCWKGACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKG VSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKPAKVTPAP TR QRDFTAAPFR MLTTRGHGPA ETQTLGSLPD INLTQISTLA NELRDSRLANDLRDSGATIRGIYIGAGICAGLALALIFGALIFK SHSKEKIQNLISLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIEN VEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP
49	B7-H3	MLRRRGSPGMGVHGAALGALWFCLTGALVQVPEDPVVALVGTDA TLCC SFSPEPGFSLQNLIIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLLAQGNASRLQQRVVADEGSFCFVSIRDFGSAAVSLQ VAA PYSKPSMTLE PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPV LQQD AHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF SPEPGFSLAQNLIIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPD LLAQ GNASRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA AVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGGQGVPLTG NVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH GSVTITGQPMTFPEALWTVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSC EEEN AGAEDQDGEGEKSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA
50	B7-H4	MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALIIGFGISAFSMPEVNVNDYNAS SETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTM KVVSVLYN VTINNTYSCM IENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNS KASLCVSSFFAISWALLPLSPYMLK
51	Domínio	GPQREEFPRLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEQQL

	extracelular TNF-alfa	QWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPST HVLLTHTISRIASVYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP I YLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
52	Domínio extracelular LIGHT	LQLHWRLGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAHLTGANSS LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLG GVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPPEELELLVSQQSPCGRATSSSRV WWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLDERLVRRLDGRSYPFGAFMV
53	Domínio extracelular LT-alfa	LPGVGLTPSAAQTARQHPKMH LAHSTLKPA AHLIGDPSKQNSLLWR ANTDRAFLQDGFSLSNNSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYSPKATS SPLYLAHEVQLFSSQYPFHVPLLSSQKMVYPGLQEPWLHSMYHGAA FQLTQGDQLSTHTDGI PHLVLS PSTVFFGAFAL
54	Domínio extracelular LT-beta	QDQGGVLTETADPGAQAQQLGFGQLPEEEPETDLSPGLPAAHLIG APLKGQGLGWETTKEQAF LTSGTQFSDAEGALPQDGLYYLYCLVG YRGRAPPGGDPQGRSVTLRSSLYRAGGAYGPGTPELLLEGAETVT PVLDPARRQGYGPLWYTSVGFGLVQLRRGERVYVNISHPDMVDFA RGKTFFGAVMVG
55	Domínio extracelular BTLA	KESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNG TTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSN LIESHSTTLYVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYR
56	Domínio extracelular CD160	INITSSASQEGTRLNLICTVWHKKEEAEGFVFLCKDRSGDCSPET SLKQLRLKRDPGIDGVGEISSQLMFTISQVTP LHS GTYQCCARSQK SGIRLQGHFFSILFTETGNYTVTGLKQRQHLEF SHNEGTLS
57	Domínio extracelular de CD40L	MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLNG KQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERI LLRAANTHSSAKPCGQOSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSHG TGFTSFGLLKL
58	Domínio extracelular FasL	QIGHPSPPPEKKELRKVAHLTGKSNSRSMPLEWEDTYGIVLLSGVK YKKGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHKVYMRNSKYPQD LVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGA VFNLTSADHLYVNVS ELSLV NFEESQTFFGLYKL
59	Domínio extracelular de CD30L	FPQDRPFEDTCHGNPSHYDYDKAVRRCCYRCPMGLFPTQQCPQRPTD CRKQCEPDYYLDEADRCTACVTCSRDDLVEKTPCAWNSSRVCECRP GMFCSTSAVNSCARCFHSHVCPAGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGV SPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPATSSASTMPVRGGTRLAQ EAASKLTRAPDSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDY YLDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPGMICATSAT NSCARCVPYPICAAETVTKPQDMAEKD TTFEAPPLGTQPD CNPTPE NGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTLPIPT SAPVALSSTGKPVLDAGP VLFWVILVLVVVVGSSAFL LCHRRACRKRI RQKLHLCYPVQTSQPK LELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAA YLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADT VIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLG SCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
60	Domínio extracelular 4-1BBL	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVY YVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
61	Domínio extracelular de CD27L	ATPAPKSCPERHYWAQGLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPC IPGVSFSPDHHTRPHCESRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQ CRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTA

		GHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRS LCSSDFIR
62	Domínio extracelular OX40L	LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYND VVSSKPCPKCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYK PGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAIC EDRDPPATQPQETQGP PARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGG RA
63	Domínio extracelular TWEAK	SAPKGRKTRARRAIAAHYEVHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARIN SSSPLRYNRQIGEFIVTRAGLYLYLYCQVHFDEGKAVYLLKDLLVDG VLALRCLEEF SATAASSLGPQLRLCQVSGLLALRPGSSLRIRTLPW AHLKAAPFLTYFGLFQVH
64	Domínio extracelular APRIL	AVLTQKQKKQHSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQA QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR IRSMP SHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG TFLGFVKL
65	Domínio extracelular BAFF	AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EKENKILVKETGYFFIYQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGEELS LVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQIS LDGDVTFFGALKLL
66	Domínio extracelular RANKL	YFRAQMDPNRISEDGTHCIYRILRLHENADFQD TTLESQDTKLIPD SCRRIKQAFQGA VQKELQHIVGSQH IRAEKAMVDGSWLDLAKRSKL EAQPF AHLTINATDIPSGSHKVSLSWYHDRGWAKISNM TFSNGKL IVNQDGFYYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIPSS HTLMKGGSTKYWSGNSEFHFYSINVGGFFKLRS GEEISIEVSNPSL LDPDQDATYFGAFKVRDID
67	Domínio extracelular TRAIL	TNELKQM QDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQL RQLVRKMILRTSEETISTVQEKQQNISPLVRERGPQRVA AHITGTR GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVI HEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILL MKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDM DHEASFFGAFLVG
68	Domínio extracelular EDA1	ELRSELRRERGAESRLGGSGTPGTSGTLSSLGGLDPDSPITSHLGQ PSPKQQPLEPGEAALHSDSQDGHQ MALLNFFFFPDEKPYSEESRRV RRNKRSKSNEGADGPVKNKKKGKAGPPGPNP GPPGPPGPPGQPP GIPGIPGIPGTTVMGPPGPPGPPGPPGQPPGLQGPSGAADKAGTREN QPAVVHLQGQGS AIQVKNLDSGGVLNDWSRITMNPKVFKLHPRSGE LEVLVDGTYFIYSQVEVYYINFTDFASYEVVDEKPF LQCTRSIET GKTNYNTCYTAGVCLLKARQKIAVKMVHADISINMSKH TTFGAIR LGEAPAS
69	Domínio extracelular EDA2	ELRSELRRERGAESRLGGSGTPGTSGTLSSLGGLDPDSPITSHLGQ PSPKQQPLEPGEAALHSDSQDGHQGHQ
70	Domínio extracelular GITRL	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLY LIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYE LHVGD TIDLIFNSEHQVLKNNTYWGII LLANPQFIS
71	Domínio extracelular de CD80 (B7-1)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQT RIYWQKEKKMVLTMMSGD MNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAF KREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFE IPTSNIRRIICSTSGGFPEPH LSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNM TTNHSFMCLI KYGHLRVNQTFNWN TTKQEHFPDN
72	Domínio extracelular	APLKIQAYFNETADLPCQFANSQNQSLSELV VFWQDQENLVLNEVY LGKEKFDSVH SKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIIHKK

	de CD86 (B7-2)	KPTGMIRIHQMNSELSVLANSFSQPEIVPISNITENVYINLTCSIIH GYPEPKKMSVLLRTKNSTIEYDGVMMQKSQDNVTELYDVSISLSVSF PDVTSNMTIFCILETDKTRLLSSPFSIELEDPQPPDHIP
73	Domínio extracelular ICOSLG	DTQEKEVRAMVGSDELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTIVT YHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTTPQDEQK FHCLVLSQSLGFEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTF TCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSV LRIARTPSVNIGCCIEENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVS TGEKNAAT
74	Domínio extracelular MICA	EPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQ GQWAEDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQE IRVCEIHEDNSTRSSQHFFYYDGELFSLQNLETKEWTMPQSSRAQTL AMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRLYKSGVVLRRTPP MVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQW GDVLPDGNNGTYQTWVATRICQGEQRFCTCYMEHSGNHSTHPVPSGK VLVLQSHW
75	Domínio extracelular MICB	AEPHSLRYNLMVLSQDESQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAPK QGQWAEDVLGAKTWDTEDETETENGQDLRRTLTHIKDQKGLHSLQ EIRVCEIHEDSSTRGSRHFYYDGELFSLQNLETQESTVPPQSSRAQT LAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLKSGVAIRRTVP PMVNVTCSEVSEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHNTQQ WGDVLPDGNNGTYQTWVATRIQGEQRFCTCYMEHSGNHGTHPVPSPG KVLVLQSQRTD
76	Domínio extracelular ULBP1	GWVDTHCLCYDFIITPKSRPEPQWCEVQGLVDERPFLHYDCVNHKA KAFASLGKKVNVTKTWEEQTETLRDVEDFLKGQLLDIQVENLIPIE PLTLQARMSCEHEAHGHGRGSWQFLFNGQKFLFLFDSNNRKWTALHP GAKKMEKWEKNRDVTMFFQKISLGDCMKWLEEF LMYWEQMLDPTK PPSLAPG
77	Domínio extracelular ULBP2	GRADPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTF LHYDCGNKTV TPVSPLGKKLNVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLRDIQLENYTPKE PLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSFDGQIFLLFDSEKRMWTTVHP GARKMKEKWENDKVVAMSFHYFSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSA GAPLAMS
78	Domínio extracelular ULBP3	DAHSLWYNFTIIHLPRHGQQWCEVQSQVDQKNFLSYDCGSDKVLMS GHLEEQLYATDAWGKQLEMLREVGRRLRLLEADTELEDFTPSGPLT LQVRMSCECEADGYIRGSWQFSFDGRKFLFLFDSNNRKWTVVHAGAR RMKEKWEKDSGLTTFFKMVSMRDCKSWLRDFLMHRKKRLEPTAPPT MAPG
79	Domínio extracelular ULBP4	HSLCFNFTIKSLSRPGQPWCEAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVKPLGL LGKKVYATSTWGELTQTLGEVGRDLRMLLCDIKPQIKTSDPSTLQV EMFCQREAERCTGASWQFATNGEKSLLFDAMNMTWTVINHEASKIK ETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCDHWLREFLGHWLEAMPEPTVSPVNAS DIHWSSSSLPD
80	ULBP5, domínio extracelular da isoforma 1	GLADPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTF LHYDCGSKTV TPVSPLGKKLNVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYIPKE PLTLQARMSCEQKAEGHSGSWQLSFDGQIFLLFDSENRMWTTVHP GARKMKEKWENDKDMTMSFHYISMGCCTGWLEDFLMGMDSTLEPSA GAPPTMSSG
81	ULBP5, domínio extracelular	GLADPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTF LHYDCGSKTV TPVSPLGKKLNVTTAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENYIPKE PLTLQARMSCEQKAEGHSGSWQLSFDGQIFLLFDSENRMWTTVHP

	da isoforma 2	GARKMKEKWENDKDMTMSFHYISMGDCTGWLEDFLMGMDSTLEPSA GGTV
82	Domínio extracelular ULBP6	RRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLLHYDCGNKTV TPVSPLGKKLNVMTAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYTPKE PLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLLFDSEKRMWTTVHP GARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSA GAPLAMSSG
83	Domínio extracelular SLAMF1	ASYGTGGRMMNCPKILRQLGSKVLLPLTYERINKSMNKSIIHVVTM AKSLENSVENKIVSLDPSEAGPPRYLGDRYKFYLENLTLGIRESRK EDEGWYLMTLEKNVSVQRFCLQLRLYEQVSTPEIKVLNKTQENGTC TLILGCTVEKGDHVAWSWSEKAGTHPLNPANSSHLLSLTLGPQHAD NIYICTVSNPISNNSQTFSPWPGCRTDPSETKP
84	Domínio extracelular SLAMF2	QGHVLVHMTVVSNSVTNLNISESLPENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSR KSKYFESKFGRVRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNE QEWKIKLQVLDPVPKPKVIEKIEDMDDNCLYLKLSVCVIPGESVNYT WYGDKRFPKELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNVSSKNGTVC LSPPCTLARS
85	Domínio extracelular SLAMF3	KDSAPTVVSGILGGSVTLPNLNISVDTEIENVIWIGPKNALAFARPK ENVTIMVKSYLGRDLITKWSYSLCISNLTNLNDAGSYKAQINQRNFE VTTEEEFTLFVYEQQLQEPQVTMKS VKVSENFSCNITLMCSVKGAEK SVLYSWTPREPHASESNGGSILTVSRTPCDPLPYICTAQNPVSQR SSLPVHVQGFCCTDPGASRGGTTGETVVGVLGEPVTLPALPACRDT EKVVWLFNTSIIISKEREEAATADPLIKSRDPYKNRVWVSSQDCSLK ISQLKIEDAGPYHAYVCSEASSVTSMTHVTLLIYRRLRKPKITWSL RHSEGDICRISLTCSVEDGGNTVMYTWTPLOKEAVVSQGESHLNVS WRSSSENHPNLCTASNPVSRSSHQFLSENICSGPERNTK
86	Domínio extracelular SLAMF4	CQGSADHVVSISGVPLQLQPNISIQTKVDSIAWKLLPSQNGFHHIL KWENGSLPNTSNDRESFIVKNLSLLIKAAQQQDSGLYCLEVTSIS GKVQTATFQVFVFESLLPDKVEKPRLQGGQKILDRGRCQVALSCLV SRDGNVSYAWYRGSKLIQTAGNLTYLDEEVDINGHTYTCNVSNPV SWESHTLNLTDQCQNAHQEFRRWP
87	Domínio extracelular SLAMF5	KDSEIFTVNGILGESVTFPVNIQEPRQVKIIAWTSKTSVAYVTPGD SETAPVVTVTHRNYERIHALGPNYNLVISDLRMEDAGDYKADINT QADPYTTTKRYNLQIYRRLGKPKITQSLMASVNSTCNVTLTCSVEK EEKNVTYNWSPLGEEGNVLQIFQTPEDQELTYCTAQNPVSNNSDS ISARQLCADIAMGFRTHHTG
88	Domínio extracelular SLAMF6	QSSLTPLMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFTITWLFNETSLAFIVP HETKSPEIHVTNPKQGKRLNFTQSYSLQLSNLKMEDTGSYRAQIST KTSAKLSSYTLRILRQLRNIQVTNHSQLFQNMTCELHLTCSVEDAD DNVSFRWEALGNTLSSQPNLTVSWDPRISSEQDYTCIAENAVSNLS FSVSAQKLCEDEVKIQYTDTKM
89	Domínio extracelular SLAMF7	SGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTLPVTIQPEGG TIIIVTQNRNRERVDFFPDGGYSLKLSKLKKNDSGIYYVGIYSSSLQQ PSTQEYVLHVYEHLSKPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEDV IYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSRNFS SPILARKLCEGAADDPDSSM
90	precursor de cadeia alfa1 humana de colágeno tipo I (NCBI:	MFSFVDLRLLLLLLAATALLTHGQEEGQVEGQDEDIPTITCVQNGLR YHDRVWKPEPCRICVCDNGKVLCDVICDETKNCPGAEVPEGECC PVC PDGSESP TDQETT GVEGPKGDTGPRGPRGPAGPPGRDGIPGQP GLPGPPGPPGPPGPPGLGGNFAPQLSYGYDEKSTGGISVP GPMGPS GPRGLPGPPGAPGPQGFQGPPEGEPGEPGASGPMGPRGPPGPPGKNG

	NP_000079.2ti po I)	DDGEAGKPGRPGERGPQGGARGLPGTAGLP GMKGHRGFSGLDGA KGDAGPAGPKGEFGSPGENGAPGQMGPRLPGERGRPGAPGPAGAR GNDGATGAAGPPGPTGPAGPPGFFPGAVGAKGEAGPQGPARGSEGPQG VRGEPGPPGPAGAAGPAGNPAGADGQPGAKGANGAPGIAGAPGFPGA RGPSGPQGGPPGPKGNSGEPGAPGSKGDTGAKGEPGPVGVQGGP GPAGEEGKRGARGEPTGLPGPPGERGGPGSRGFPAGDGVAGPKG PAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPAGAKGLTGSPGSPGPDGK TGPPGPAGQDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFP GPKGAAGEPGKAGER GVPGPPGAVGPAGKDGEAGAQQGPPGPAGPAGERGEQQPAGSPGFQG LPGPAGPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGARGERGFPGERGVQGP PGPAGPRGANGAPGNDGAKGDAGAPGAPGSQGAPGLQGMPPGERGAA GLPGPKGDRGDAGPKGADGSPGKDGVRGLTGPIGPPGPAGAPGDKG ESGPSGPAGPTGARGAPGDRGEPGPPGPAGFAGPPGADGQPGAKGE PGDAGAKGDAGPPGPAGPAGPPGPIGNVGAPGAKGARGSGAPPGAT GFPGAAGRVPGP GSGNAGPPGPPGPAGKEGGKGRGETGPAGRP EVGPPGPPGPAGEKGSAGADGPAGAPGTPGPQGIAGQRGVVGLPGQ RGERGFPLPGPSGEPGKQGPSGASGERGPPGPMGPPGLAGPPGES GREGAPGAEGSPGRDGSPGAKGDRGETGPAGPPGAPGAPGAPGPVG PAGKSGDRGETGPAGPAGPVGPVGARGPAGPQGPGRDKGETGEQGD RGIKGHGFSGLQGGPPGPPGSPGEQGPSGASGPAGPRGPPGSAGAP GKDGLNGLPGPIGPPGPRGRTGDAGPVGPPGPPGPPGPPSAGF DFSFLPQQPQEKADGGYRADDANVVRDRDLEVDTTLKSLSQQI ENIRSPEGSRKNPARTCRDLKMCHSDWKSGEYWIDPNQGCNLDIAK VFCNMETGETCVYPTQPSVAQKNWYISKNPKDKRHVWFGESMTDGF QFEYGGQGSDDPADVAIQLTFLRLMSTEASQNIYHCKNSVAYMDQQ TGNLKKALLLQGSNEIEIRAEGNSRFTYSVTVDGCTSHTGAWGKT VIEYKTTKTSRLPIIDVAPLDVGAPDQEFGEFVGPVCF
91	precursor de cadeia alfa2 humana de colágeno tipo I (Sequência de Referência NCBI: NP_000080.2)	MLSFVDTRTLTLLAVTLCLATCQSLQEETVRKGPAGDRGPRGERGP PGPPGRDGEDGPTGPPGPPGPPGPPGLGNGFAAQYDGKGVGLGPP MGLMGPRGPPGAAGAPGPQGFQGPAGEPGEPPQTGPAGARGPAGPP GKAGEDGHPGKPGRPGERGVVGPQGARGFPGTPLPGFKGIRGHNG LDGLKGQPGAPGVKGEPPGAPGENGTGQTGARGLPGERGRVGAPGP AGARGSDGSVGPVGPAGPIGSAGPPGFPAGPAGPKGEIGAVGNAGPA GPAGPRGEVGLPGLSGPVGPPGNPGANGLTGAKGAAGLPGVAGAPG LPGPRGIPGPVGAAGATGARGLVGEPGPAGSKGESGNKGEPPSAGP QGPPGPSGEEGKRGPNGEAGSAGPPGPPGLRSGSPSRGLPGADGRA GVMGPPGSRGASGPAGVRGPNGDAGRPGEPGLMGPRGLPGSPGNIG PAGKEGPVGLPGIDGRGPPIGPAGARGEPPNIGFPGPKGPTGDPGK NGDKGHAGLAGARGAPGPDGNNGAQGPPGPQGVQGGKGEQGP GPP GFQGLPGPSGPAGEVGKPGERGLHGEFGLPGPAGPRGERGPPGESG AAGPTGPIGSRGPSGPPGPDGNKGEPPGVVAVGTAGPSGPSGLPGE RGAAGIPGGKGEKGEPPGLRGEIGNPGRDGARGAPGAVGAPGPAGAT GDRGEAGAAGPAGPAGPRGSPGERGEVGPAGPNFAGPAGAAGQPG AKGERGAKGPKGENGVVGP TGVPVGAAGPAGPNPPGPAGSRGDGGP PGMTGFPGAAGRTGPPGPSGISGPPGPPGPAGKEGLRGRGDQGPV GRTGEVGAVGPPGFAGEKGPSGEAGTAGPPGTGPQGLLGAPGILG LPGSRGERGLPGVAVGEPGLGIAGPPGARGPPGAVGSPGVNGA PGEAGRDGNPGNDGPPGRDQPGHKGERGYPNIGPVGAAGAPGPH GPVGPAGKHGNRGETGPSGPVGPAGAVGPRGPSGPQGIKRGDKGEPG EKGPRGLPGLKGHNGLQGLPGIAGHHGDQGAPGSVGPAGPRGPAGP SGPAGKDGRGTGHPGTVPAGIRGPQGHQGPAGPPGPPGPPGPPGVS

		GGGYDFGYDGDYFADQPRSAFSLRPKDYEVDATLKSLLNNQIETLL TPEGSRKNPARTCRDLRLSHPEWSSGGYYWIDPNQGCTMDAIKVYCD FSTGETCIRAQPENIPAKNWYRSSKDKKHVWLGETINAGSQFEYNV EGVTSKEMATQLAFMRLLANYASQNTYHCKNSIAYMDEETGNLKK AVILQGSNDVELVAEGNSRFTYTVLVDGCSKKTNEWGKTIIEYKTN KPSRLPFLDIAPLDIGGADQEFFVDIGPVCFK
92	cadeia alfa1 humana de colágeno tipo IV (Sequência de Referência NCBI: XP_011519350. 1)	MQGPEGPQGGPPGQKGDTEPGLPGTKGTRGPPGASGYPGNPGLPGI PGQDGPFGPPGIPGCNGTKGERGFLGPPGLPGFAGNPFGPPGLPGMK GDPGEILGHVPGMLLKGERGFPFGIPGTPGPPGLPGLPQGPVGPFGFT GPPGPPGPPGPPGEGKQMGSLSFQGPKGDKGDQGVSGPPGVPGQAQV QEKGDFATKGEKQKGEFGFQGMFGVGEKGEFGKPGPRGKPGKGDG KGEKGSFGFPGEFGYPGLIGRQGPQGEKGEAGPPGPPGIVIGTGPL GEKGERGYPGTPGPRGEPGPKGFPGLPGQPGPPGLPVPQGAGAPGF PGERGEKGRGFPGTSLPGPSGRDGLPGPPGSPGPPGQPGYTNGIV ECQPGPPGDQGGPGIPGQPGFIDGEIKGEKQKGESCLICDIDGYRGP PGPQGGPGEIGFPGQPGAKGDRGLPGRDGVAGVPGPQGTPLIGQP GAKGEPGEFYFDLRLKGDGDPGFPQPGMPGRAGSPGRDGHPGLP GPKGSPGSVGLKGERGPPGGVGFPGSRGDTGPPGPPGYGPAGFIGD KGQAGFPGGPGSPGLPGPKGEPGKIVPLPGPPGAEGLPSPGFPGP QGDRGFPGTPGRPLPGKEKGAVGQPGIGFPGPPGPKGVDGLPGDMG PPGTPGRPGFNGLPGNPGVQGGQKGEFGVGLPLGLKGLPLPGIPGTP GEKGSIGVPVPGGEHGAIGPPGLQGIRGEPGPPGLPGSVGSPGVPG IGPPGARGPPGGQGGPGLSGPPGIKGEKGFPFGPGLDMPGPKGDKG AQGLPGITGQSGPLPLPGQQGAPGIPGFPGSKGEMGMVMTGPGQGS PGPVGAPGLPGEKGDHGFPGSSGPRGDPGLKGDGVDGLPGKPGSM DKVDMGSMKGQKGDQGEKQIGPIDGEKSRGDPGTPGVPCKDGQAG QPGQPGPKGDPGISGTPGAPGLPGPKGSVGGMGLPGTPGEKGVPGI PGPQGSPLPGDKGAKGEKQAGPPGIGIPGLRGEKGDQGIAGFPG SPGEKGEKGSIGIPGMPGSPGLKGSPPSVGYPGSPGLPGEKGDKGL PGLDGIPGVKGEAGLPGTPGPTGPAGQKGEFGSDGIPGSAGEKGEF GLPGRGFPGFPAGKGDGSKGEVGFPLAGSPGIPGSKEQGFMGP PGPQGGPGLPGSPGHATEGPKGDRGPQGGPGLPLPGMPGPPGLPG IDGVKGDKNPWPAGPVPGPKGDPGFQGMFGIGGSPGITGSKGD MGPPGVPGFQGPKGLPLGLQGIKGDQGDQGVPGAKGLPGPPGPPGPY DIIKGEPLPGPEGPPGLKGLQGLPGPKQGGVTGLVGIPGPPGIP GFDGAPGQKGEMGPAGPTGPRGFPGPPGPDGLPGSMGPPGTPSVDH GFLVTRHSQTIDDPQCPSGTKILYHGYSLLYVQGNERAHGQDLGTA GSCLRKFSTMPFLFCNINNVCNFASTRNDYSYWLSTPEPMPMSMAPI TGENIRPFISRCACEAPAMVMAVHSQTIQIPPCPSGWSSLWIGYS FVMHTSAGAEGSQALASPGSCLEEFSAFFIECHGRGTCNYYANA YSFWLATIERSEMFKKPTPSTLKAGELRTHVSRQCVMRRT
93	cadeia alfa2 humana de colágeno tipo IV (Sequência de Referência NCBI: NP_001837.2)	MGRDQRAVAGPALRRWLLLTGTVTVGFLAQSVLAGVKKFDVPCGGRD CSGGCQCYPEKGGRGQPGVPVPGQYNGPPGLQGFPGLQGRKGDKE RGAPGVTGPKGDVGARGVSGFPAGDGIPGHPGQGGPRGRPGYDGCN GTQGDSPGQGGPSEGFTGPPGPQGPKGQKGEFYALPKEERDRYRG EPGEPLVGFQGGPGRPGHVGMGPVAGPRPGPPGPPGPKGQQGN RGLGFYGVKGEKGDVGQPGNIPSDTLHPIIAPTGVTFHPDQYKG EKGSEGEFGIRGISLKGEEGIMGFPLRGYPGLSGEKSPGQKGSR GLDGYQGPDPGRGPKGEAGDPGPPGLPAYSPHPSLAKARGDPGFP GAQGEFGSQGEPGDPGLPGPPGLSIGDGDQRRGLPGEMGPKGFIGD PGIPALYGGPPGPDGKRGPPGPPGLPGPPGPDGFLFLGLKAKGRAG

		FPGLPGSPGARGPKGWKGDAGECRCTEGDEAIKGLPGLPGPKGFAG INGEFGRKGDGRDPPGQHGLPGFPGLKGVPGNIGAPGPKGAKGDSRT ITTKGERGQPGVPGVPGMKGDDGSPGRDGLDGFPGLPGPPGDGIKG PPGDPGYPGIPGTGKTPGEMGPPGLGLPGLKQGRRGFPDAGLPGPP GFLGPPGPAGTPGQIDCDTDVKRAVGDRQEAIQPGCIGGPKGLPG LPGPPGPTGAKGLRGIPGFAGADGGPGPRGLPGDAGREGFPGPFGF IGPRGSKGAVGLPGPDGSPGPIGLPGPDGPPGERGLPGEVLGAQPG PRGDAGVPGQPGLKGLPGDRGPPGFRGSQGMPPGLKQGPPGLPGP SGQPGLYGPPGLHGFPAGPQEGPLGLPGIPGREGLPGDRGDPGDT GAPGPVGMKGLSGDRGDAGFTGEQGHGSPGFGKIDGMPGTPGLKG DRGSPGMDGFQGMPPGLKGRPGFPGSKGEAGFFGIPGLKGLAGEPGF KGSRGDPGPPGPPVILPGMKDIKGEKGDEGPMGLKGYLGAKGIQG MPGIPGLSGIPGLPGRPGHIKGVKGDIGVPGIPGLPGFPVAGPPG ITGFPFGISRGDKGAPGRAGLYGEIGATGDFGDIGDTINLPGRPG LKGERGTTGIPGLKGGFGEKGTGDI GFPGITGVTGVQGGPGLKGQ TGFPGLTGPPGSQGEGLGRIGLPGGKGDDGWPGAPGLPGFPGLRGIR GLHGLPGTKGFPGSPGSDIHGDPGFPGPPGERGDPGEANTLPGPVG VPGQKGDQGAPGERGPPGSPGLQGFPGITPPSNISGAPGDKGAPGI FGLKGYRGPPGPPGSAALPGSKGDTGNPGAPGTPGTGWAGDSGPQ GRPGVFGLPGEKGPRGEQGFMGNTGPTGAVGDRGPKGPKGDPGFPG APGTVGAPGIAGIPQKIAVQPGTVGPQRRGPPGAPGEMGPQGGPPG EPGFRGAPGKAGPQGRGGVSAVPGFRGDEGPIGHQGP IQEGAPGR PGSPGLPGMPGRSVSIGYLLVKHSQTDQEPMPVGMNKLWSGYSL YFEGQEKAHNQDLGLAGSCLARFSTMPFLYCNPGDVCYYASRNDKS YWLSTTAPLPMMPVAEDEIKPYISRCVCEAPAIAIAVHSQDVSIP HCPAGWRSWLWIGYSFLMHTAAGDEGGGQSLVSPGSCLEDFRATPFI ECNGGRGTCHYYANKYSFWLTTIPEQSFQSGSPADTLKAGLIRTHI SRCQVCMKNL
94	cadeia alfa3 humana de colágeno tipo IV (Sequência de Referência NCBI: NP_000082.2)	MSARTAPRPQVLLLPLLLVLLAAAPAASKGCVCKDKGQCFCGAKG EKGEKGFPGPPGSPGQKFTGPEGLPGPQGPKGFPGLPGLTGSKGV RGISGLPGFSGSPGLPGTPGNTGPYGLVGVPGCSGSKGEQGFGLP GTLGYPGIPGAAGLKGQKGAPAKEEDIELDAGKDPGLPGAPGPQGL PGPPGFPGVPVPPGPPGFFGFPGAMGPRGPKGHMGERVIGHKGERG VKGLTGPPGPPGTIVITLTGPDNRTDLKGEKGDKGAMGEPGPPGPS GLPGESYGSEKGA PGDPGLQKPKGDGVPGFP GSEGVKGNRGFPGL MGEDGIKGQKGDIGPPGFRGPTEYYDTYQEKGDEGTPGPPGPRGAR GPQGPSGPPGVP GSPGSSRPGLRGAPGWPGGLKGSKGERGRPGKDAM GTPGSPGCAGSPGLPGSPGPPGPPGDIVFRKGPPGDHGLPGYLGSP GIPGVDGPKGEPGLLCTQCPYIPGPPGLPGLPLHGKVGIPGRQGA AGLKGSPPGSPGNTGLPGFPGFPGAQGDPLKGEKGETLQPEGQVGV PGDPGLRGQPGRKGLDGIPGTPGVKGLPGPKGELALSSEKGDQGP GPDGSPGSPGAPAGPPGYGPQGEPLQGTQGVPGAPGPPGEAGP RGELSVSTPVPGPPGPPGPPGHPGPQGPPIPGSLGKCGDPLPGP DGEPGIPGIGFPGPPGPKGDQGFPGTKGSLGCPGKMGEPLPGPKP LPGAKGEP AVAMPGGPGTPGFPGERGNSEHGEIGLPLPLPGTP GNEGLDGPRGDPQPGPPGEQGPGRGCI EGPRGAQGLPLNGLKGQ QGRRGKTGPKGDPGIPGLDRSGFPGETGSPGIPGHQGEPMPLGQRG YPGNPGILGPPGEDGVIGMMGFPGAIGPPGPPGNPGTPGQRGSPGI PGVKGQRGTPGAKGEQDKGNPGPSEISHVIGDKGEPGLKGFAGNP GEKGNRGVP GMPGLKGLKGLPGPAGPPGPRGDLGSTGNPGEPGLRG IPGSMGNMGMPGSKGKRGT LGFPGRAGRPGLPGI HGLQGDKGEPGY

		SEGTRPGPPGPTGDPGLPGDMGKKGEMGQPGPPGHLGPAGPEGAPG SPGSPGLPGKPGPHGDLGFKGIKGLLGPPGIRGPPGLPGFPGSPGP MGIRGDQGRDGIPGPAGEKGETGLLRAPPGPRGNPGAQGAKGDRGA PGFPGLPGRKGAMGDAGPRGPTGIEGFPGPPGLPGAIIPGQTGNRG PPGSRGSPGAPGPPGPPGSHVIGIKGDKGSMGHPGPKGPPGTAGDM GPPGRLGAPGTPGLPGPRGDPGFQGFPGVKGEKGNPGFLGSI GPPG PIGPKGPPGVRGDPGTLKIIISLPGSPGPPGTPGEPGMQGEPPPPGP PGNLGPGCGPRGKPGKDGPPTGPPAGEKGNKGSKGEPGPAGSDGLP GLKGKRGDSGSPATWTTTRGFVFTTRHSQTTAIPSCPEGTVPLYSGFS FLFVQGNQRAHGQDLGTLGSLQRFRTTMPFLFCNVNDVCNFASRND YSYWLSTPALMPMNMAPIITGRALEPYISRCTVCEGPAIAIAVHSQT TDIPPCPHGWISLWKGSFIMFTSAGSEGTQALASPGSCLEEFRA SPFLECHGRGTCNYYSNSYSFWLASLNPERMFRKPIPSTVKAGELE KIIISRCQVCMMKRRH
95	cadeia alfa4 humana de colágeno tipo IV (Sequência de referência NCBI: NP_000083.3)	MWSLHIVLMRCSFRLTKSLATGPWSLILILFSVQYVYGSGKKYIGP CGGRDCSVCHCVPEKSGSRGPPGPPGPQGP IGPLGAPGPIGLSGEKG MRGDRGPPGAAGDKGDKGPTGVPGFPGLDGIPGHPGPPGPRGKPGM SGHNGSRGDPGFP GGRGALGPGGPLGHPGEKGEKGNVSF ILGAVKG IQGDRGDPGLPGLPGSWGAGGPAGPTGYPGEPGLVGPPGQPGRPGL KGNPGVGKVGQMGDPGEVGGQGSPPGPTLLVEPPDFCLYKGEKGIKG IPGMVGLPGPPGRKGESGIGAKGEKGI PGFP GPRGDPGSYSGSPGFP GLKGELGLVGDPGLFGLIGPKGDPGNRGHPGPPGVLVTPPLPLKGP PGDPGFPGRYGETGDVGP GPPGGLGRPGGEACAGMIGPPGPQGFPG LPGLPGEAGIPGRPD SAPGKPGKPGSPGLPGAPGLQGLPGSSVIYC SVGNPGPQGIKGVGP GGRGPKGEKGNELCACEPGPMGPPGPPG LPGRQGSKGD LGLPGWLGTKGDPGPPGAEGPPGLPGKHGASGPPGN KGAKGDMVVS RVKGHKGERGPDGPPGFP GQPGSHGRDGHAGEKGD GPPGDHEDATPGGKGFPGPLGPPGKAGPVGPPGLGFP GPPGERGHP GVPGHGVRGPDGLKGQKGD TISCNVTYPGRHGPPGFDGPPGPKGF PGPQGAPGLSGSDGHKGRPGTPTAEIPGPPGFRGMDGDPGFGGEK GSSPVGPPGPPGSPGVNGQKGIPGDP AFGHLGPPGKRGLSGVPGIK GPRGDPGCPGAEGPAGIPGFLGLKGPKGREGHAGFPVPGPPGHSC ERGAPGIPGQPLPGYPGSPGAPGGKGQPGDVGP GPPAGMKGLPGL PGRPGAHPGPPGLPGIPGFP GDDGLGPPGPKGPRGLPGFP GPPGER GKPGAEGCPGAKGEPGEKGM SGLPGDRGLRGAKGAIGPPGDEGEMA IISQKGTGEPGPPGDDGFP GERGDKGTPGMQGRREGEPGRYGP GPF HRGEPGEKQPGPPGPPGPPGSTGLRGF IGFPGLPGDQGEPPSGPP PGFSGIDGARGPKGNKGDPA SHFGPPGPKGEPGSPGCPGHFGASGE QGLPGIQGPRGSPGRPGPPGSSGPPGCPGDHGMPLRGQP GEMGDP GPRGLQGDPIPGPPGIKGPSGSPGLNGLHGLKGQKGTKGASGLHD VGPPGPVGIPGLKGERGDPGSPGISPPGPRGKKGPPGPPGSSGPPG PAGATGRAPKDIPDPGPPGDQGP GPDGPRGAPGPPGLPGSVDLLR GEPGDCGLPGPPGPPGPPGPPGYKFGCDGKDGQKGPVGFP GPQG PHGFP GPPGEKGLPGPPGRKGPTGLPGPRGEPGPPADVDDCPRI PG LPGAPGMRGPEGAMGLPGMRGPSGPGCKGEPGLDGRRGVDGVP GSP GPPGRKGD TGEDGYPGGP GPPGPIGDPGPKGFGPGYLGGFLLVLHS QTDQEPTCPLGMPRLWTGYSLLYLEGQEKAHNQDLGLAGSCLPVFS TLPFAYCNIHQVCHYAQRNDRSYWLASAAPLPMPLSEEAIRPYVS RCAVCEAPAQAVAVHSQDQSI PPCPQTWRSLWIGYSFLMHTGAGDQ GGGQALMSPGSCLED FRAAPFLECQGRQGTCHFFANKYSFWLTTVK ADLQFSSAPADTLKESQAQRQKISRCQVCVKYS

96	cadeia alfa5 humana de colágeno tipo IV (Sequência de referência NCBI: XP_011529151.2)	MEVDSGKTENRDWEGFCYSTSAYWKNLYDGLLACYGCSPGSKDCDS GIKGEKGERGFPGLEHPLPGFFPGPEGPPGPRGQKGGDGIPGPPG PKGIRGPPGLPGFFGTPGLPGMPGHDGAPGPGQIPGCNGTKGERGF PGSPGFPGGLQGPPGPPGIPGMKGEPSIIMSSLPGPKGNPGYPGPP GIQGLPGPTGIPGPIGPPGPPGLMGPPGPPGLPGPKGNMGLNFQGP KGEKGEQGLQGPPGPPGQISEQKRPIDVEFQKGDQGLPGDRGPPGP PGIRGPPGPPGGEKGEKGEQGEPPGKRKPKGKDGENGQPGIPGLPGD PGYPGEPPGRDGEKQKGDGTGPPGPPGLVIPRPGTGITIGEKNIGL PGLPGEKGERGFPGIQGPPGLPGPPGAAMGPPGPPGFPPGERGQKG DEGPPGISIPGPPGLDGQPGAPGLPGPPGPAGPHIPPSDEICEPGP PGPPGSPGDKGLQGEQGVKGDKGDTCFNCIGTGISGPPGQPGPLGL PGPPGSLGFPGQKGEKQAGATGPKGLPGIPGAPGAPGFPGSKGEP GDILTFPGMKGDKGELGSPGAPGLPGLPPTPGQDGLPGLPKGEK GGITFKGERGPPGNPGLPGLPGNIGPMGPPGFGPPGPVGEKGIQGV AGNPGQPGIPGPKGDPGQTITQPGKPLPGNPGRDGDVGLPGDPGL PGQPLPGIPGSKGEPGIPGIGLPGPPGPKGFPGIPGPPGAPGTPG RIGLEGPPGPPGFPGPKGEPPFALPGPPGPPGLPGFKGALGPKGDR GFPGPPGPPGRTGLDGLPGPKGDVGPNGQPGPMGPPGLPGIGVQGP PGPPGIPGPIGQPLGHGIPGEKGDGPPGLDVPGPGERGSPGIPG APGPIGPPGSPGLPGKAGASGFPGTKGEMGMMGPPGPPGLGIPGR SGVPGLKGGDGLQGQPLPGPTGEKGSKEPGLPGPPGMDPNLLG SKGEKGEPPGLPGIPGVSGPKGYQGLPGDPGQPLSGQPLPGPPGP KGNPGLPGQPLIGPPGLKGTIGDMGFPGPQVEGPPGPSVPGQP GSPGLPGQKGDGDPGISSIGLPGLPGLPKGEPPGLPGYPGNPGIKGS VGDPGLPGLPPTGAKGQPLPGFPPTGPPGPKGISGPPGNPGLP GEPGPVGGGGHPGQPGPPGEKKGKPGQDGIPGPAGQKGEPPQPGFGN PGPPGLPGLSGQKGDGGLPGIPGNPGLPGPKGEPPGFHGFPGVQGP GPPGSPGPALEGPKGNPGPQPPGPRGPTGFGQGLPGPEGPPGLPGN GGIKGEKGNPGQPLPGLPGLKGDQPPGLQGNPGRPGLNGMKGDP GLPGVPGFPGMKGPSVPGSAGPEGEPPGLIGPPGPPGLPGPSGQSI IIKGDAGPPGIPGQPLKGLPGPQGPQGLPGPTGPPGDPGRNGLPG FDGAGGRKGDPLPGQPGTRGLDGPPGPDGLQGPPGPPGTSSVAHG FLITRHSQTTDAPQCPQGTLLQVYEGFSLLYVQGNKRAHGQDLGTAG SCLRRFSTMPFMFCNINNVCNFASTRNDYSYWLSTPEPMPMSMQPLK GQSIQPFISRCVCEAPAVVIAVHSQTIQIPHCPQGWDSLWIGYSF MMHTSAGAEKSGQALASPGSCLEEFPSAPFIECHGRGTCNYYANSY SFWLATVDVSDMFSSKPQSETLKAGDLRTRISRCQVCMKRT
97	cadeia alfa6 humana de colágeno tipo IV Sequência de referência (NCBI: XP_006724680.1)	MLINKLWLLLVTLCLEELAAAGEKSYGKPCGGQDCSGSCQCFPEK GARGRPGPIGIQPTGPQGFTGSTGLSGLKGERGFGLLGYPYGPKG DKGPMGVPLGLINGIPGHPGQPGPRGPPGLDGCNGTQGA VGFPGP DGYPLGLGPPGLPGQKGSKGDVLPAGSFKGMKGDPLGLDGLTG PQAGPGFPGAVGPAGPPGLQGPPGPPGLPGPDGNMGLGFQGEKGVK GDVGLPGPAGPPPSTGELEFMGFPGKKGSKGEPGPKGFPGISGPP GFPGLGTTGEKGEKGEKIPGLPGPRGPMGSEGVQGPQGGKGT LGFPGLNGFQGIEGQKGDIGLPGPDVFDIDGAVISGNPGDPGVPG LPGLKGDEGIQGLRGP SGVPGLPALSGVPALGPQGFPLKGDQGN PGRTTIGAAGLPGRDGLPGPPGPPGPPSPEFETETLHNKESGFPL RGEQGPKNLGLKGIKGD SGFCACDGGVPNTGPPGEPGPPGPWGLI GLPGLKGARGDRSGGAQGPAGAPGLVGPLPGSPGKKGKGEPI LST IQGMPGDRGDSGSQGFGRVIGEPGKGDVPLPGPLPGPDGGQGF GEKGLPGLPGEKGHPGPPGLPGNGLPGLPGRGLPGDKGDGLPGQ

		QGLPGSKGDCCCREVGKGDLDTERGITLPCIIPGSYGPSGFFPGTPG FPGPKGSRGLPGTPGQPGSSGSKGEPGSPGLVHLPELPGFFGPRGE KGLPGFPGPLPGKDGLPGMIGSPGLPGSKGATGDI FGAENGAPGEQG LQGLTGHKGFLGDSGLPGLKGVHKGKPGLLGPKGERGSPGTPGQVQG PGTPGSSGPYGIKKSGLPGAPGFFPGISGHPGKKGTRGKKGPPGSI VKKGLPGLKGLPGNPGLVGLKGSPPGSPGVAGLPALSGPKGEKGSVG FVGFFGIPGLPGIPGTRGLKGIPGSTGKMGPSGRAGTPGEKGDGRN PGPVGIPSPRRPMSNLWLKGDKGSQGSAGSNGFFGPRGDKGEAGRP GPPGLPGAPGLPGI IKGVS GKPGPPGFMGIRGLPGLKGSSGITGFP GMPGESGSQGIRGSPGLPGASGLPGLKGDNGQTV EISGSPGPKGQP GESGFKGT KGRDGLIGNIFPGNKGEDGKVGVS GDVGLPGAPGFP VAGMRGEPGLPGSSGHQGAIGPLGSPGLIGPKGFPGFPLHGLNGL PGTKGTHGTPGPSITGVPGPAGLP GPKGEKGYPGIGIGAPGKPLR GQKGD RGFPGLQGPAGLP GAPGISLP SLIAGQPGDPGRPGLDGERG RPGPAGPPGPPGSSNQDGTGDPGFP GIPGPKGPKGDQGIPGFSGL PGELGLKGMRGEPGFMGTPGKVGPPGDPGFP GPKGKAGPRGSSGLQ GDPGQTP TAEAVQVPPG PLGLPGIDGIPGLTGDPGAQGPVGLQGSK GLPGIPGKDGP SGLPGPPGALGDPGLPGLQGPFGFEGAPGQQGPF MPGMPGQSMRVGYTLVKHSQSEQVPPCPIGMSQLWVGYSLLFVEGO EKAHNQDLGFAGSCLPRFSTMPFIYCNINEVCHYARRNDKSYWLST TAPIPMMPVSQTQIPQYISRCVCEAPSQAIAVHSQDITIPQCPLG WRSLWIGYSFLMHTAAGAEGGGQSLVSPGSCLED FRATPFIECSGA RGTCHYFANKYSFWLT TVEERQQFGELPVSETLKAGQLHTRVSRQ VCMKSL
98	LAIR-1	QEEDLPRPSISAEPTVIPLGSHVTFVCRGPVGVQTFRLERESRST YNDTEDVSQASPSESEARFRIDSVSEGNAGPYRCIYYKPPKWSEQS DYLELLVKETSGGPDSPDTEPGSSAGPTQRP SDNSHNEHAPASQGL KAEHLYILIGVSVVFLFCLLLLVLFLCLHRQNQIKQGPPRSKDEEQK PQORPD LAVDVLERTADKATVNLPEKDRETDTSALAAGSSQEVTY AQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMAESITYAAVARH
99	LAIR-2	QEGALPRPSISAEPTVISPGSHVTFMCRGPVGVQTFRLEREDRAK YKDSYNVFR LGPSESEARFHIDSVSEGNAGLYRCLYYKPPGWSEHS DFLELLVKESSGGPDSPDTEPGSSAGTVP GTEASGF DAP
100	Glico- proteína IV (domínio extracelular de CD36)	GDLLIQKTIKKQVVLEEGTIAFKNWVKTGTEVYRQFWIFDVQNPQE VMMNSSNIQVKQRGPYTYRVRFLAKENVTQDAEDNTVSFLQPNGAI FEP SLSVGTEADNFTVLNLAVAAASHIYQNQFVQMI LNSLINKSKS SMFQVRTLRELLWGYRDPFLSLVPYPVTTTVGLFY PYNNTADGVYK VFNGKDNISKVAI IDTYKGKRNL SYWESHCDMINGTDAASFPPFVE KSQVLQFFSSDICRSIYAVFESDVNLKGIPVYRFVLP SKAFASPVE NPDNYCFCTEKIISKNCTSYGVLDISKCKEGRPVYISLPHFLYASP DVSEPIDGLNPNEEEHRTYLDIEPITGFTLQFAKRLQV NLLVKPSEKIQVLKNLKRNYIVPILWLNETGTIGDEKANMFRSQVT GKIN
101	Nidogen	LSRQELFPFGPGQGDLELEDGDDFVSPAELSGALRFYDRSDIDAV YVTTNGIIATSEPPAKESHPLFPPTFGAVAPFLADLDTTDGLGKV YYREDLSPSITQRAAECVHRGFPEISFQPS SAVVVTWESVAPYQGP SRDPDQKGRNTFQAVLASSDSSSYAIFLYPEDGLQFH TTF SKEN NQVPAVVAFSQGSVGFLWKSNGAYNIFANDRESVENLAKSSNSGQQ GVWVFEIGSPATTNGVVPADVILGTEDGA EYDDEDEDYDLATTRLG LEDVGTTPFSYKALRRGGADTYSVPSVLSPRRAATERPLGPPTERT RSFQLAVETFHQQHPQVIDVDEVEETGVVF SYNTDSRQT CANNRHQ

		CSVHAECRDYATGFCCSCVAGYTGNRQCVAEGSPQRVNGKVKGRI FVGSSQVPIVFENTDLHSYVVMNHGRSYTAISTIPETVGYSLLPLA PVGGIIGWMFAVEQDGFKNFSTITGGEFTRQAEVTFVGHFPGNLVIK QRFSGIDEHGHLLTIDTELEGRVPQIPFGSSVHIEPYTELYHYSTSV ITSSSTREYTVTEPERDGASPSRIYTYQWRQTITFQECVHDDSRPA LPSTQQLSVDSVFLYNQEEKILRYALSNSIGPVREGSPDALQNPC YIGTHGCDTNAACRPGPRTQFTCECSIGFRGDGRTCYDIDECSEQP SVCGSHTICNNHPGTFRCECVEGYQFSDEGTCVAVVDQRPINYCET GLHNCDIPQRAQCIYTGSSSYTCSCLPGFSGDQACQDVDECQPSR CHPDAFCYNTPGSFTCQCKPGYQGDGFRCPVGEVEKTRCQHEREHI LGAAGATDPQRP IPPGLFVPECDAGHYAPTQCHGSTGYCWCVDRD GREVEGTRTRPGMTTPCLSTVAPP IHQGPVPTAVIPLPPGTHLLF AQTGKIERLPLEGNTMRKTEAKAFLHVPKVI IGLAFDCVDKMVYW TDITEPSIGRASLHGGEPTTIIIRQDLGSPEGIAVDHLGRNIFWTD NLDRIEVAKLDGTQRRVLFETDLVNPRGIVTDSVRGNLYWTDWNRD NPKIETSYMDGTNRRIILVQDDLGLPNGLTFDAFSSQLCWVDAGTNR AECLNPSQPSRRKALEGLQYPFAVTSYGKNLYFTDWKMNSVVALDL AISKETDAFQPHKQTRLYGITTALSQCPQGHNYCSVNNGGCTHLCL ATPGSRTCRCPDNTLGVDCIEQK
102	Perlecan	VTHGLRAYDGLSLPEDIETVTASQMRWTHSYLSDDMLADSI DLGSGDLGSGDFQMVYFRALVNFTRSYEYSPQLEDAGSREFREVSE AVVDTLESEYKIPGDQVVSVVF IKELDGWVVFVLDVGSSEGNADGA QIQEMLLRVISSGSVASYVTSPQGFQFRRLGTVPPQFRACTEAEFA CHSYNECVALEYRCRRPDCRDMSEDLNCEEPVLGISPTFSLLVET TSLPPRPETT IMRQPPVTHAPQPLPGSVRPLPCGPQEAACRNGHC IPRDYLCGQEDCEDGSDCLCGPPPPCEPNEFP CGNGHCALKLWR CDGDFDCEDRTDEANCP TKRPEEVCPTQFRCVSTNMCI PASFHCD EESDCPDRSDEFGCMP PQVVTTPRESIQASRGQTVTFTCVAIGVPT PIINWRLNWGHIPSHPRVTVTSEGGRTLI IRDVKESDQGAYTCEA MNARGMVFGIPDGVLELVPQRGPCPDGHFYLEHSAACLPCFCFGIT SVCQSTRFRDQIRLRFDPDDFKGVNVTMPAQPGTPPLSSTQLQI DPSLHEFQLVDLSRRFLVHDSFWALPEQFLGNKVDSYGGSLRYNVR YELARGMLEPVQRPDVVLMGAGYRLLSRGHPTQPGALNQRQVQFS EEHWVHESGRPVQRAELLQVLQSLEAVLIQTVYNTKMASVGLSDIA MDTTVTHATSHGRAHSVEECRCPIGYSGLSCESCDAHFTRVPGGPY LGTCSGCNCNGHASSCDPVYGHCLNCQHNTGEPQCNCKKAGFFGDA MKATATSCRPCPCPYIDASRRFSDTCFLD TDGQATCDACAPGYTGR RCESCAPGYEGNPIQPGGKCRPVNQEIVRCDERGSMGTSGEACRCK NNVVGRILCNECADGSFHLSTRNPDGCLKCF CMGVSRHCTSSWSRA QLHGASEEPGHFSLTNAASTHTTNEGIFSTP GELGFSFHRLLSG PYFWSLPSRFLGDKVTSYGGELRFTVTQRSQPGSTPLHGQPLVVLQ GNNIILEHHVAQEPSPGQPSTFIVPFREQAWQRPDGPATREHLLM ALAGIDTLLIRASYAQPPAESRVSGISMDVAVPEETGQDPALVEEQ CSCPPGYRGPSCQDCDTGYTRTPSGLYLGTCECSCSCHGHSEACEPE TGACQGCQHHTGEP RCEQCQPGYYGDAQRGTPQDCQLCPCYGDPAA GQAAHTCFLDTDGHPTCDACSPGHSGRHCERCAPGYGNPSQGGQPC QRDSQVPGPIGCNCDPQGSVSSQCDAAAGQCQCKAQVEGLTCSHCRP HHFHLASNPDPGCLPCFCMGITQQCASSAYTRHLISTHFAPGDFQG FALVNPQRNSRLTGEFTVEPVPEGAQLSFGNFAQLGHESFYWQLPE TYQGDKVAAYGGKLRYTLSYTAGPQGSPLSDPDVQITGNIMLVAS QPALQGPERRSYEIMFREEFWRRPDGQPATREHLLMALADLDELLI

		RATFSSVPLAASISAVSLEVAQPGPSNRPRALEVEECRCPPGYIGL SCQDCAPGYTRTGSGLYLGHCELCCECNHSDLCHPETGACSQCHN AAGEFCELCAPGYGDATAAGTPEDCQPCACPLTNPENMFSRTCESL GAGGYRCTACEPGYTGOYCEQCGPGYVGNPSVQGGQCLPETNQAPL VVEVHPARSIVPQGGSHSLRCQVSGSPPHYFYWSREDGRPVPSGTQ QRHQGSELHFPSVQPSDAGVYICTCRNLHQSNTRSRAELLVTEAPSK PITVTVEEQRSQSVRPGADVTFICTAKSKSPAYTLVWTRLHNGKLP TRAMDFNGILTIRNVQLSDAGTYVCTGSNMFAMDQGTATLHVQASG TLSAPVVSIIHPPQLTVQPGQLAEFRCSATGSPTPTLEWTGGPGGQL PAKAQIHGGILRLPAVEPTDQAQYLCRAHSSAGQQVARAVLHVHGG GGPRVQVSPERTQVHAGRTVRLYCRAAGVPSATITWRKEGGSLLPQ ARSERTDIATLLIPAITTADAGFYLCVATSPAGTAQARIQVVLSA SDASPPPVKIESSSPSVTEGQTLDLNLCVVAGSAHAQVTWYRRGGS PPHTQVHGSRLRLPQVSPADSGEYVCRVENSGPKEASITVSVLHG THSGPSYTPVPGSTRPIRIEPSSSHVAEGQTLDLNLCVPGQAHAQV TWHKRGGSLPARHQTHGSLLRLHQVTPADSGEYVCHVVGTSGL SVLVTIEASVIPGPIPPVRIESSSSTVAEGQTLDLSCVVAGQAHAQ VTWYKRGGSLPARHQVGRSRLYIFQASPADAGQYVCRASNGMEASI TVTGTGTQGANLAYPAGSTQPIRIEPSSSQVAEGQTLDLNLCVPGQ SHAQVTWHKRGGSLPVRHQTHGSLLRLYQASPADSGEYVCRVLGSS VPLEASVLVTIEPAGSVPALGVTPTVRIESSSSQVAEGQTLDLNCL VAGQAHAQVTWHKRGGSLPARHQVHGSRLRLQVTPADSGEYVCRV VGSSGTQEASVLVTIQQLSGSHSQGVAYPVRIESSSASLANGHTL DLNCLVASQAPHTITWYKRGGSLPSRHQIVGSRLRIPQVTPADSGE YVCHVSNAGSRETSLIVTIQSGSSSHVPSVSPPIRIESSSPTVVE GQTLDLNLCVVARQPQAIITWYKRGGSLPSRHQTHGSHLRLHQMSVA DSGEYVCRANNNIDALEASIVISVSPSAGSPSAPGSSMPIRIESS SHVAEGETDLNLCVPGQAHAQVTWHKRGGSLPSHHQTRGSRLRLH HVSPADSGEYVCRMVGMSSGPLEASVLVTIEASGSSAVHVPAPGGAP PIRIEPSSSRVAEGQTLDLKCVVPGQAHAQVTWHKRGGNLPARHQV HGPLLRLNQVSPADSGEYSCQVTGSSGTLEASVLVTIEPSSPGPIP APGLAQPIYIEASSSHVTEGQTLDLNLCVPGQAHAQVTWYKRGGSL PARHQTHGSQRLRLHLVSPADSGEYVCRAASGPGEQEASFTVTVP SEGSSYRLRSPVISIDPPSSTVQQGQDASFKCLIHGDAAPISLEWK TRNQELEDNVHISPNGSIITIVGTRPSNHGTYRCVASNAYGVAQSV VNLSVHGPPTVSVLPEGPVWVKVGKAVTLECVSAGEPRSSARWTRI SSTPAKLEQRTYGLMDSHAVLQISSAKPSDAGTYVCLAQNALGTAQ KQVEVIVDTGAMAPGAPQVQAEAEELTVEAGHTATLRCSATGSPAP TIHWSKLRSLPWQHRLEGDTLIIPRVAQQDSGQYICNATSPAGHA EATIIHVESPPYATTVPEHASVQAGETVQLQCLAHGTPPLTFQWS RVGSSLPGRATARNELLHFERAAPEDSGRYRCRVTNKVGSAEFAQ LLVQGPPGSLPATSIPAGSTPTVQVTPQLETKSIGASVEFHCAVPS DRGTQLRWFKEGGQLPPGHVQDGVLRIQNLQDQSCQGTIICQAHGP WGKAQASQALVIALPSVLINIRTSVQTVVVGHAVEFECLALGDPK PQVTWSKVGGHLRPGIVQSGGVVRIAHVELADAGQYRCTATNAAGT TQSHVLLLQALPQISMPQEVVRVPAGSAAVFPCIASGYPTPDISWS KLDGSLPPDSRLNNMLMLPSVRPQDAGTYVCTATNRQGVKFAFAH LQVPERVVPYFTQTPYSFLPLPTIKDAYRKFEIKITFRPDSADGML LYNGQKRVPGSPTNLNLRQPDFISFGLVGGRPEFRFDAGSGMATIR HPTPLALGHFHTVTLLRSLTQGSLLIVGDLAPVNGTSQGKFQGLDLN EELYLGYPDYGAIPKAGLSSGFIGCVRELRIQGEEIVFHDNLTA

		HGISHCPTCRDRPCQNGGQCHDSESSSYVCVCPAGFTGSRCEHSQA LHCHPEACGPDATCVNRPDGRGYTCRCHLGRSGLRCEEVTVTTSP LSGAGSYLALPALTNTHHELRLDVEFKPLAPDGVLLFSGGKSGPVE DFVSLAMVGGHLEFRYELGSGLAVLRSAEPLALGRWHRVSAERLNK DGSLRVNGGRPVLRRSSPGKSQGLNLHTLLYLGGVEPSVPLSPATNM SAHFRGCVGEVSVNGKRLDLTYSFLGSQIGQCYDSSPCERQPCQH GATCMPAGEYEFQCLCRDGFKGDLCEHEENPCQLREPC LHGGTCQG TRCLCLPGFSGPRCQQGSGHGIAESDWHLEGGSGNDAPGQYGA YFH DDGFLAFP GHVFSRSLPEVPETIELEVRTSTASGLLLWQGVVEGEA GQ GKDFISLGLQDGH LVFRYQLGSGEARLVSEDP INDGEWHRVTAL REGRRGSIQVDGEELVSGRSPGPNVAVNAKGSVYIGGAPDVATLTG GRFSSGITGCVKNLVLHSARPGAPPPQPLDLQHRAQAGANTRPCPS
103	Biglican	DEEASGADTSGVLDPD SVTPTYSAMCPFGCHCHLRVVQCS DLGLKS VPKEISPDTTLLDLQNN DISELRKDDFKGLQHL YALVLVNNKISKI HEKAFSPLRKLQKLYISK NHLVEIPP NLPSSELVLR IH DNRIKVP KGVFSGLRNMNCIEMGGNPLENSGFEPGAFDGLKLN YLR ISEAKLT GIPKDLPETLNE LHLDHNKIQAIELEDLLRYSKLYRLGLGHNQIRM IENGSLSF LPTLRELHLDNNKLARVPSGLPDLKLLQV VYLHSNNIT KVGVNDFCPMGFGVKRAYYNGISLFNNPVPYWEVQPATFRCVTDRL AIQFGNYKK
104	Decorin	DEASGIGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRCQCHLRVVQCS DLGLDKVP KDLPPDTTLLDLQNNKITEIKDGD FKNLKNLHALILVNNKISKVSP GAFTPLVKLERLYLSKNQLKELPEKMPKTLQELRAHENEITKVRKV TFNGLNQMI VIELGTNPLKSSGIENGAFQGMKKLSYIRIADTNITS IPQGLPPSLTELHLDGNKISR VDAASLKG LNNLAKLGLSFNSISAV DNGLSANTPHLRELHLDNNKLTRVPGGLAEHKYIQV VYLHNNNISV VGSSDFCPPGHNTKKASYSGVSLFSNPVQYWEIQPSTFRCVYVRS AIQLGNYK
105	Asporin	DMEDTDDDDDDDDDDDDDEDNSLFP TREPRSHFFPFDLFPMCPFG CQCYSRVVHCSDLGLTSVPTNIPFDTRMLDLQNNKIKEIKENDFKG LTSLYGLILN NNKLT KIH PKAFLTTKKLRRLYLSHNQLSEIPLNLP KSLAELRIHENKVKKIQKDTFKGMNALHVLEMSANPLDNNGIEPGA FEGVTVFHIRIAEAKLTSVPKGLPPTLLELHLDYNKISTVELEDFK RYKELQRLGLGNK KITDIENGLANIPRVREIHL ENNKLK KIPSGL PELKYLQIIFLHSNSIARVGVNDFCPTVPKMKKSLYSAISLFNNPV KYWEMQPATFRCVLSRMSVQLGNFGM
106	Fibromo- dulina	QYEDDPHWWFHYLRSQQSTYYDPYDPYPYET YEPYPYGVDEGPAYT YGSPSPDPRDCPQECDCPPNFPTAMYCDNRNLKYLFPVPSRMKYV YFQNNQITSIQEGVFDNATGLLWIALHGNQITSDKVGRKVF SKLRH LERLYLDHNNLTRMPG PLPRSLRELHLDHNQISRVPNNALEGL ENL TALYLQHNEIQEVGSSMRGLRSLILLDLSYNHLRKVPDGLPSALEQ LYMEHNNVYTVPDSYFRGAPKLLYVRLSHNSLTNNGLASNTFNSSS LLELDLSYNQLQKIPPVNTNLENLYLQGNRINEFSISSFCTVVDVV NFSKLQVLRLDGNEIKRSAMPADAPLCLRLASLIEI
107	Lumican	QYYDYDFPLSIYQSSPNCAP ECNCPE SYP SAMYCD ELKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLIL DHNLL ENSKIKGR VFSKLKQLKKLHINHNNLTESVGPLPKSLEDLQLTHNKITKLG SFE GLVNLTFIHLQHNR LKEDAVSAAFKGLKSLEYLDLSFNQIARLP SG LPVSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFNALQYLRLSHNELADSGIPG NSFNVSSSLVELDLSYNKLKNIPTVNENLENYYLEVNQLEKFDIKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNRISETSLPPDMEYCLRVANEVTLN

108	PRELP	QPTRRPRPGTGPGRPRPRPRPTPSFQPQDEPAEPTDLPPPLPPGP PSIFPDCPRECYCPPDFPSALYCDSRNLRKVPVIPPRIHYLYLQNN FITELPVESFQONATGLRWINLDNNRIRKIDQRVLEKLPGLVFLYME KNQLEEVPSALPRNLEQLRLSQNHISRIPPGVFSKLENLLLLDLQH NRLSDGVFKPDTFHLGNLMQLNLAHNILRKMPPRVPTAIHQLYLD SNKIETIPNGYFKSFPNLAFIGRLNKNKLTDRGLPKNSFNISNLLVL HLSHNRISSVPAINNRLLEHLYLNNNSIEKINGTQICPNDLVAFHDF SSDLENVPHLRYLRDLGNLYLKPPIPLDLMMCFRLLQSV VI
109	Osteoadarina / Osteomo- dulina	QYETYQWDEDYDQEPDDDYQTGFPPFRQNVYDGVFPFHQYTLGCVSEC FCPTNFPSSMYCDNRKLTIPNIPMHIQQLYLQFNEIEAVTANSFI NATHLKEINLSHNKIKSQKIDYGVFAKLPNLLQLHLEHNNLEEFPF PLPKSLERLLLGYNEISKLTQTNAMDGLVNLTMDLGCYNLHDSLLK DKIFAKMEKLMQLNLCSNRLESMPGLPSSLMYLSLENNSSISPE KYFDKLPKLHTLRMSHNKLQDIPYNIFNLPNIVELSVGHNLKQAF YIPRNLEHLYLQNNIEKMNLTVMCPSIDPLHYHHLTYIRVDQNKL KEPISSYIFFCFPHIHTIYYGEQRSTNGQTIQLKTQVFRFPDDDD ESEDHDDPDNAHESPEQEGAEGHFDLHYENQE
110	Opticina	ASLPRKERKRREEQMPREGDSFEVLPLRNDVLNPDNYGEVIDLSNY EELTDYGDQLPEVKVTSAPATSI SPAKSTTAPGTPSSNPTMTRPT TAGLLLSSQPNHGLPTCLVCVCLGSSVYCDDIDLEDIPPLPRRTAY LYARFNRI SRIRAE DFKGLTKLRIDLSNNLISSIDNDAFRLLHAL QDLILPENQLEALPVLPSGIEFLDVRLNRLQSSGIQPAAFRAMEKL QFLYLSDNLLDSIPGPLPLSLRSVHLQNNLIETMQRDVFCDP EEHK HTRRQLEDIRLDGNP INLSLFP SAYFCLPRLP IGRFT
111	Osteoglicina / Mimecan	PPTQQDSRIIYDYGTDNFEE SIFSQDYEDKYLDGKNIKEKETVIIP NEKSLQLQKDEAITPLPPKKENDEMP TCLLCVCLSGSVYCEEVDID AVPPLPKESAYLYARFNKIKKLTAKDFADIPNLRRLDFTGNLIEDI EDGTFSKLSLLEELSLAENQLLKLPLVLPKLTLFNAKYNKIKSRGI KANAFKLNLTFLYLDHNALESVPLNLPESLRVIHLQFNNIASIT DDTFCKANDTSYIRDRIEIRLEGNP IVLGKHPNSFICLKRLPIGS YF
112	Chondro- adherin	QRCPPQACICDNSRRHVACRYQNLTEVPDAIPELTQRLDLQGNLLKV IPAAAFQGVPHLTHLDLRHCEVELVAEGA FRGLGRLLLLNLASNHL REL PQEALDGLGSLRRLELEGNAL EELRPGTFGALGALATLNLAHN ALVYLPAMAFQGLLRVRLRLSHNALSVLAP EALAGLPALRRLSLH HNELQALPGPVLSQARGLARLELGHNP LTYAGEEDGLALPGLRELL LDGGALQALGPRAFAHCPRLHTLDLRGNQLDTLPPLQGPGLRRLR LQGNPLWCGCQARP LLEW LARARVRSDGACQGPRLRGEALDALRP WDLRCPGDAAQEEEELEERAVAGPRAPPRGPPRGPGGEERAVAPCPR ACVCVPESRHSSCEGCGLQAVPRGFP SDTQLLDLRNHFPSVPRAA FPGLGHLVSLHLQHCGIAELEAGALAGLGR LIYLYLSDNQLAGLSA AALEGAPRLGYLYLERNRFLQVPGAALRALPSLFSLHLQDNAVDR APGDLGRTRALRWVYLSGNRITEVSLGALGPARELEKLHLDRNQLR EVPTGALEGLPALLELQLSGNPLRALRDGAFQPVGRSLQHFLFNSS GLEQICPGAFSGLGPGLQSLHLQKNQLRALPALPSLSQLELIDLSS NPFHCDCQLLPLHRWLTGLNLRVGATCATPPNARGQRVKAAA AVFE DCPGWAARKAKRTPASRP SARRTP IKGRQC GADKVGKEKGRL
113	Podocan	GPVLAVRAPGFGRSGGHSLSPEENEFAEEEPVLVLSPEEPGPGPAA VSCPRDCACSQEGVVDCCGIDLREFPGDLPEHTNHLSLQNNQLEKI YPEELSRLHRLETNLQNNRLTSRGLPEKA FEHLTNLYLYLANNK

		LT LAPRFLPNALISVDFAANYLT KIYGLTFGQKPNLRSVYLHNNKL ADAGLPDNMFNGSSNVEVLILSSNFLRHVPKHLPPALYKLHLKNNK LEKIPPGAFSELSSRELYLQNNYLTDEGLDNETFWKLSSLEYLDL SSNNLSRVPA GLPRSLVLLHLEKNAIRSDANVLTPIRSLEYLLH SNQLREQGIHPLAFQGLKRLHTVHLYNNALERVPSGLPRRVRTLMI LHNQITGIGREDFATTYFLEELNLSYNRITSPQVHRDAFRKLRLLR SLDLSGNRLHTLPPGLPRNVHVLKVKRNELAAALARGALVGMAQLRE LYLT SNRLRSRALGPRAWVDLAHLQLLDIAGNQLTEIPEGLPESLE YLYLQNNKISAVPANAFDSTPNLKGIFLRFNKLAVGSVVD SAFRRL KHLQVLDIEGNLEFGDISKDRGRLGKEKEEEEEEEEEEEEEETR
114	Região constante de IgG1 humana (sequência de aminoácidos)	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
115	Domínio Fc de IgG1 humana (sequência de aminoácidos)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
116	Domínio HSA I	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKL VNEV TEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECF LQHKDDNP LRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKY LYE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDE LRDEGKASSAKQR
117	Domínio HSA II	GKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKL VTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCE KPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLY EYARRHPDYSV VLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQ
118	Domínio HSA III	NLIKQNC ELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLG KVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCC TESLVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFA EEGKKLV AASQAALGL
119	Linker	LEA (EAAAK) ₄ ALEA (EAAAK) ₄ ALE
120	Lumican-MSA- IL2 (lumican em negrito; linkers em itálico; MSA sublinhado; IL2 negrito e sublinhado; HIS tag pontilhada)	QYYDYDIPLFMYGQISPNC AP ECNC PHSYPTAM YCDDLKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLIIDHNLL ENSKI KIGK VF SKLQ LK KLHINYN NLTESV GPLPKSLQDLQLTNNKISK LG SFD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASL KGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFN ISSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLP PD MYECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI AFSQYLQKCSYDEHA KL VQE VTDF AKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LAD CC TKQEPERNECF LQHKDDNP SLPPFERPEAEAMCTSF KENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYAEQYNEILTQCCAEADKESCL

	sublinhada)	TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADDFVEDQEVCKNYAEAKDVF LGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT KCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTFECQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQH HHHHHH
121	MSA-IL2 (MSA em negrito; ligante em itálico, IL2 sublinhado; marca HIS pontilhada sublinhada)	EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI AF SQYLQKCSYDEHAKLVQEV TDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCTKQEPERNECF LQHKDDNP SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADDFVEDQEVCKNYAEAKDVF LGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT KCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTFECQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQH HHHHHH
122	IL12-MSA (IL12p40 negrito; ligantes itálico; IL12p34 sublinhado; MSA negrito e sublinhado; marca HIS pontilhada sublinhada)	MWELEKD VYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTS DQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTF LKCEAPNYSGRFTCSWL VQRNMDLFKNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTL DQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLP IELALEARQ QNKYENYSTSFFIRDI IKPDPKPNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAF LVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCR VRS GGSGGGSGGGSGGGSRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDI TRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSSTTRGSCLP PQKTS LMMTLC LGS IYED LKMYQTEFQAINAALQNHNHQQI ILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLC ILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI AF SQYLQKCSYDEHAKLVQEV TDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCTKQEPERNECF LQHKDDNP SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADDFVEDQEVCKNYAEAKDVF LGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGT KCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTAEEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNKLKLPRLMTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTFECQFDDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQH HHHHHH

		LPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLL RLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCD LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCT LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERR PCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAE LVKHKPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCFSTEGPNLVT RCKDALAHHHHHH
123	IL12-MSA- Lumican (IL12p40 negrito; linkers itálico; IL12p34 sublinhado; MSA negrito e sublinhado; lumican negrito, sublinhado e itálico; marca HIS pontilhada sublinhada)	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSQDRHGV IGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGWST EILKNFKNKTFLLKCEAPNYSGRFTCSWLQVRNMDLKFNKSSSSSP DSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYKYSVSCQEDVTCPTAEETLP I ELALEARQONKYENYSTSFFIRDI IKPDPKPNLQMKPLKNSQVEVS WEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEK TSTEVQCKGGNVCVQAQDRYNNSSCSKWACVPCRVSGGSGGGSGG GSGGGSRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTA EDIDHEDITRDQSTLTKTCLPLELHKNESCLATRETSTSTRGSCLP PQKTSLMMTLCGLSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNNHNOQIILDKG MLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFST RVVTINRVMGYLSSAGSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFG DKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPFER PEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNE ILTQCCAADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGER AFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECAD DRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLLKKAHCLSEVEHDTMPAD LPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLL RLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCD LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCT LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERR PCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAE LVKHKPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCFSTEGPNLVT RCKDALAGGGSGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPT AMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWL ILDHNLLENSKIKGKVFSLKLQKLKLHINYNLTESVGPLPKSLQD LQLTNNKISKLGSEFDGLVNLTFFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKLSLE YLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQY LRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENY YLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDM YECLRVANEITVNHHHHHH
124	Lumican-GGGS- (H) 6	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLIILDHNLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSEFD GLVNLTFFIYLQHNQLKEDAVSASLKLKLSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVNGG GSHHHHHH
125	Lumican D213A	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLIILDHNLLENSKIKGK

		VFSKLKQLKKLHINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLANNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSHHHHHH
126	Lumican-MSA	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLIILDHNLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLIASFQYLQKCSYDEHA KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCL TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQAT ISSKLQTCCKPPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV KNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCA EANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAIL VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCKCTLPEDQRLPCVEDYLS AILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKT VMDDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHH
127	Gluc	KPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGLPGKKLPLEVLKEMEAN ARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIG EAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSD LLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDGGGSHHHHHH
128	Lumican-Gluc	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLIILDHNLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGSKPTENNEDFNIVAVASNFATTDLDADRGLPGKKLP LEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEG DKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCL KGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDGGGSHH HHHH
129	CNA35-Gluc	ARDISSTNVTDLTVSPSKIEDGGKTTVKMTFDDKNGKIQNGDMIKV AWPTSGTVKIEGYSKTVPLTVKGEQVGQAVITPDGATITFNDKVEK LSDVSGFAEFVQGRNLTQTNTSDDKVATITSGNKSTNVTVHKSEA GTSSVFYYKTGDMLPEDTTHVRWFLNINNEKSYVSKDITIKDQIQG GQQLDLSTLNINVTGTHSNYYSGQSAITDFEKAFFGSKIITVDNTKN TIDVTIPQGYGSYNSFSINYKTKITNEQQKEFVNNSQAWYQEHGKE

		EVNGKSFNHTVHNINANAGIEGTVKGELKVLKQDKDTKGGGSGGGSGGGSKPTENNEDFNIVAVASNFATDLDADRGKLP GKKLPLEVLKE MEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQ GGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANV QCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDGGGSHHHHHH
130	ColG s3a / s3b-Gluc	PITKEMEPNDDIKEANGPIVEGVTVKGDLNGSDDADTFYFDVKEDG DVTIELPYSGSSNFTWLVIYKEGDDQNHIA SGIDKNNSKVGTFKSTK GRHYVFIYKHDSASNISYSLNIKGLGNEKLKEKENNDSSDKATVIP NFNTTMQGSLLGDDSRDYYSFEVKEEGEVNIELDKKDEF GVTWTLH PESNINDRITYGQVDGNKVS NKVKLRPGKYLLVIYKYS GSGNYELR VN GGGSGGGSGGGSGKPTENNEDFNIVAVASNFATDLDADRGKLP GKLP LEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCH TYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCT TGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGAGGDGG GSHHHHHH
131	ColH_s3-Gluc	GTEKEPNNSKETASGP IVP GIPVSGTIENTSDQDYFYFDVITPGEV KIDINKLGYGGATWVYDENNNNAVSYATDDGQNL SGFKADKPGRY YIHL YMFNGSYMPYRINIEGGGSGGGSGGGSGKPTENNEDFNIVAVA SNFATDLDADRGKLP GKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLS HIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGFKDL EPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFAS KIQGQVDKIKGAGGDGGGSHHHHHH
132	PLGF2 HBD-Gluc	RRRPKGRGKRREKQRP TDSHLGGGSGGGSGGGSGKPTENNEDFNIV AVASNFATDLDADRGKLP GKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLI CLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEAIVDIPEIPGF KDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCAT FASKIQGQVDKIKGAGGDGGGSHHHHHH
133	4M5.3-MSA-Lumican	ADVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYL RWYLQKP GQSPKVL IYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLG VY FCSQSTHVPWTFGGGT KLEIKSSADDAKDAAKKDDAKKDDAKKD G GVKLDETGGGLVQPGGAMKLS CVTSGFTTFGHYWMNWVRQSPEKGLE WVAQFRNKPYNYETYYS DSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNL RVED TGIYYCTGASYGMEYLGQGT SVTVSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQ HFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCD KSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECF LQHKDDN PSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELL YYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCS SMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCH GDLL ECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKKAHCLSEV EHD TMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHP DYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPK NLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLG RVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCC SGSLVERRPCFSALTVD ETYVPKEFKAETFTFHS DICTLPEKEKQI KKQTALAE LVKHKPKATAEQ LKTVMDDF AQFLDTCCKAADKDT CFS TEGPNLVTRCKDALAGGGSGGGSQYYDYDIPLEMYGQISP NCAPEC NCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFE NVTDLQWLILDHNLLENSKI KGKVF SKLKQLKKLHINYNNLTESVG PLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSAS

		<u>LKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYF</u> <u>KRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPT</u> <u>VNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLT</u> <u>QSSLPPDMYECLRVANEITVN</u>GGGSHHHHHH
134	Ss07d-MSA- Lumican	ATVKFKYKGEEKQVDISKIYLVLRGKFIFYFYDLGGGKLGGLGHVS EKDAPKELLQMLEKQKKGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFG DKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFER PEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNE ILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGER AFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECAD DRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLKKAHCLSEVEHDTMPAD LPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLL RLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNC LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCT LPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERR PCFSALTVDETYVPKEFKAETTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAE LVKHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCKAADKDTCTFSTEGPNLVT RCKDALAGGGSGGGGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPT AMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWL ILDHNLLENSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQD LQLTNNKISKLG SFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLE YLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQY LRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENY YLEVNELEKFDVKSFCKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDM YECLRVANEITVN GGGSHHHHHH
135	ZZ-MSA Lumican	MRVPAQLLGLLLWLPGARCAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEE QRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKVDNKFNKEQQNAF YEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKG GGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLV QEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELAD CCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFM GHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPK LDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNAD FAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADRAELAKYMCENQATISS KLQTCCKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNY AEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEAN PPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNC DLYEKLGEYGFQNAILVRY TQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAIL NRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFK AETTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAE LVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQFLDTCKAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSGGGGQYY DYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPG IKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGVFS KLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLV NLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPT SLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSF NISSLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKI LGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVN GGGSH

		HHHHH
136	Lumican-MSA- FcIII4C	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKCSYDEHA KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSPPPFERPEAEAMCTSFKENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEIILTQCCAEADKESCL TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQAT ISSKLQTCCKPDLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV KNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCA EANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAI VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLS AILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQ VMDDFAQFLDTCCAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGGS CDCA WHLGELVWCTCHHHHHH
137	Lumican-MSA- Fn3	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIASFQYLQKCSYDEHA KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSPPPFERPEAEAMCTSFKENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEIILTQCCAEADKESCL TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQAT ISSKLQTCCKPDLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV KNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCA EANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAI VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLS AILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQ VMDDFAQFLDTCCAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGGS VSDV PRDLEVVAATPTSLLISWCCSDNCSNSYRITYGETGGNSPVQEF TV PRSCFMATISGLKPGVDYTTITAYAVTDSNGPHPISINYRTHHHHHH
138	Lumican-MSA- SpG2	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG

		NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHA KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEIILTQCCAEADKESCL TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQAT ISSKLQTCCKDPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV KNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCA EANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAI VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLS AILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKQTALAEVLKHKPKATAEQLKT VMDDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSTYKL VINGKTLKGETTTEAVDAATAEKVKQYANDYGVDGEWTYDDATKT FTVTEKPEVIDASELTPAVTTYKL VINGKTLKGETTTKAVDAETA KAFKQYANDYGVDGVWTYDDATKTFTVTEHHHHHH
139	Lumican-MSA- RRGW	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLTSVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLSGSD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHA KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEIILTQCCAEADKESCL TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQAT ISSKLQTCCKDPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV KNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCA EANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAI VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLS AILNRVCLLHEKTPVSEHVTCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKQTALAEVLKHKPKATAEQLKT VMDDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSTRGW HHHHHH
140	Lumican-MSA- WGRR	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLTSVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLSGSD GLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVNGG GSGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHA KLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGE LADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPT TFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEIILTQCCAEADKESCL TPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFP

		NADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQAT ISSKLQTCCKDPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV KNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCA EANPPACYGTVLAEEFQPLVEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAI VRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLS AILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPK EFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAEVLKHKPKATAEQ VMDDFAQFLDTCCKAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSWGR HHHHHH
141	4420 LC - cadeia kappa murina	DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPG QSPKVLIIKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYF CSQSTHVPWTFGGG TKLEIKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVV CFLNNFY PKDINV KWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
142	4220 HC- Lumican (LALA-PG)	DVKLDETGGGLVQPGRPMKLS CVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLE WVAQIRNKPYNYETYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVED MGIYYCTGSYYGMDYWGQGT SVTVSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSS VTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKV DKKIEPRVPITQNPCPPLKE CPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPMVT CVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGK EFKCKVNNRALGSP IEKTI SKPRGPVRAPQVYVLPPP AEEMTKKEF SLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSK LRVQKSTWERSLFA CSVVHEGLHNHLTTKTI SRSLGKGGGSGGG GSGGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNC APECNCPHSYPTAMY CDDLK LKSVPMPVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLE NSKIKGKVF SKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKI SKLGSFDGLVNLTFIYLOHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQ MSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNEL ADSGVPGNSFNISSELELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELE KFDVKSECKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMEYEC LRVAN EITVN
143	4220 HC - mIgG2c	DVKLDETGGGLVQPGRPMKLS CVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLE WVAQIRNKPYNYETYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVED MGIYYCTGSYYGMDYWGQGT SVTVSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSS VTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKV DKKIEPRVPITQNPCPPLKE CPPCAAPDAAGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPMVT CVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGK EFKCKVNNRALGSP IEKTI SKPRGPVRAPQVYVLPPP AEEMTKKEF SLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSK LRVQKSTWERSLFA CSVVHEGLHNHLTTKTI SRSLGK
144	23/03 LC - kappa murino	METDTLLLWVLLWVPGSTGDTVLTQSPALAVSPGERVTISCRASE SVSTRMHWYQQRPGQPPKLLIYVASRLESGVPARFSGGGSGTDFTL TIDPVEANDTATYFCQQSWNDPWFGGG TKLEIKRADAAPT VSIFF PSSEQLTSGGASVVCF LNNFY PKDINV KWKIDG SERQNGVLNSWTD QDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR NEC

145	3/23 HC-lumican	MDIWLSLVFLVLF IKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGF TLSDYYMAWVRQAP KKGLEWVASINYESSTYYGESVKGRFTISR NAKSTLYLQMN SLRSEDTATYYCVRHDNYFDYWGGQVLTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSGLSSG VHTFPALLQSGLYTLSSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKV DKKIEPRVPITQNPCPPLKECPPCAAPD AAGGPSVF IFPPKIKDVLMI SLSPMVTCTVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQHQDWMSEKFKCKVNNRAL GSP IEKTIKPRGPVRA PQVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNY KNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERSLGFACSVVHEGLHNHLT TKTISRSLGKGGGGSGGGSGGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAP ECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKA FENVTDLOWLILDHNLLNSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTES VGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFDGLVNLTFTIYLOHNOLKEDAVS ASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDE YFKRFTGLQYLRRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSI PTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNP LTQSSLPDDMYECLRVANEITVN
146	LOB12.3 LC - kappa murino	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLAWYHQKPGKSPQL LIYGSTSLADGVPSRFSGSSSGSQYSLKISRLQVEDIGIYYCLQAY GAPWTFGGG TKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTITKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
147	LOB12.3 HC-Lumican	DVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGF IFSYFDMAWVRQAPTKGLE WVASISPDGSI PYYRDSVKGRFTVSRENAKSSLYLQMDSLRSEDTA TYYCARRSYGGYSEIDYWGGQVMVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGGT TGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSGLSSGVHTFPALLQSGLYTL SSSVTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDDKKIEPRVPITQNPCP PLKECPPCAAPD AAGGPSVF IFPPKIKDVLMIISLSPMVTCTVVVDVSE DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM SGKEFKCKVNNRAL GSP IEKTIKPRGPVRA PQVYVLP PPAEEMTK KEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFM YSKLRVQKSTWERSLGFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKGGGGSG GGGGSGGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAP ECNCPHSYPTAMYCD DLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLOWLILDHN LLENSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTN NKISKLGSGFDGLVNLTFTIYLOHNOLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLS FNQMSKLPAGLPTSLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRRLSH NELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVN ELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDDMYECLR VANEITVN
148	OX86 LC - kappa murino	DIVMTQGALPNPVP SGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLWNWFLQRP QSPQLLTYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTL KISRVAEDAGVYY CQQVREYPTFTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
149	OX86 HC-	QVQLKESGPG LVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLE

	Lumican	WMGRMRYDGD TYYN SVLKSRLSISRDT SKNQ VFLKMNSLQTD DTAI YYCTRDGRGDS FDYWGQGVMTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGGTTGS SVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSS VTVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNPCPPLKE CPPCAAPD AAGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPMVT CVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQ TQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNRAL GSP IEKTISKPRGPVRAPQVYVLP PPAEEMTKKEF SLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSK LRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTK TISRSLGKGGGSGGG GSGGGGSQYYDYD IPLFMYGQISPN CAPECNC PHSYPTAMYCDDLK LKSVPMPVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLE NSKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKI SKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQ MSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNEL ADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELE KFDVKSFCCKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPD MYECLRVAN EITVN
150	2C11 LC - kappa murino	DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKL LIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRDS SFTISSLESEDIGSYQCQYY NYPWTFGPGTKLEIKR RADAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSK STYSMSSTLT LTK DEYERHNSYTCEATHKTSTSP IVKSFNRNEC
151	2C11 HC- lumican	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLE SVAYITSSSINIKYADAVKGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSEDTA MYICARFDWDKNYWGQGTMTVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSSV TVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNPCPPLKEC PPCAAPD AAGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPMVT CVVVDVSEDDPD VQISWFVNNVEVHTAQ TQ THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNRAL GSP IEKTISKPRGPVRAPQVYVLP PPAEEMTKKEFS LTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKL RVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTK TISRSLGKGGGSGGGG GSGGGGSQYYDYD IPLFMYGQISPN CAPECNC PHSYPTAMYCDDLK KSVPMPVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLEN SKIKGVFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKIS KLGSFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQM SKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEK FDVKSFCCKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPD MYECLRVANE ITVN
152	Peptídeo T2A (local de clivagem da furina - GSG - T2A)	RRKRGS GEGRGSLLTCGDVEEN PGP
153	CCL3- Lumican	APYGADTP TACCF SYSRKIPRQFIVDYFETSS LC SQPGVIFLT KR N RQICADSKETWVQ EYITDLEL NA GGGSGGGSGGG SQYYDYD IPLFM YGQISPN CAPECNC PHSYPTAMYCDDLK LKSVPMPVPPGIKYLYLRN

		NQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLLENSKIKGKVF SKLKQLKKL HINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNLTFIYLO HNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLD NNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLEL DLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKILGPLSYSK IKHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
154	Lumican - CCL3	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFD GLVNLTFIYLOHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGGG APYGADTPTACCF SYSRKIPRQFIVDYFETSSLC SQ PGVIFLTKRNRQICADSKETWVQ EYITDLELNA GGGSHHHHHH
155	CCL3	APYGADTPTACCF SYSRKIPRQFIVDYFETSSLC SQPGVIFLTKR RQICADSKETWVQ EYITDLELNA GGGSHHHHHH
156	CCL4- lumican	APMGSDPPTSCCF SYTSRQLHRSFVMDYYETSSLC SKPAVVFLTKR GRQICANP SEPWVTEYMSDLELN GGGSGGGSGGGG QYYDYDIPLFM YGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLKSVPMVPPGIKYLYLRN NQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLLENSKIKGKVF SKLKQLKKL HINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNLTFIYLO HNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLD NNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLEL DLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKILGPLSYSK IKHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
157	Lumican - CCL4	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLKSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFD GLVNLTFIYLOHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGGG APMGSDPPTSCCF SYTSRQLHRSFVMDYYETSSLC S KPAVVFLTKRGRQICANP SEPWVTEYMSDLELN GGGSHHHHHH
158	CCL4	APMGSDPPTSCCF SYTSRQLHRSFVMDYYETSSLC SKPAVVFLTKR GRQICANP SEPWVTEYMSDLELN GGGSHHHHHH
159	CCL5- lumican	SPYGSDDTPCCFAYLSLALPRAHVKEYFYTSSKCSNLAVVFVTRRN RQVCANPEKKWVQ EYINYLEMS GGGSGGGSGGGG QYYDYDIPLFMY GQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLKSVPMVPPGIKYLYLRNN QIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLLENSKIKGKVF SKLKQLKKLH INYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNLTFIYLOH NQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDN NKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELD LSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKILGPLSYSKI KHLRLDGNPLTQSSLPDPMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH

160	Lumican - CCL5	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLNTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLOHNQKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGGSSPYGSDTTPCCFAYLSLALPRAHVKEYFYTSSKCSN LAVVFVTRRNQVCANPEKKWVQYINYLEMS GGGSHHHHHH
161	CCL5	SPYGSDTTPCCFAYLSLALPRAHVKEYFYTSSKCSNLAVVFVTRRN RQVCANPEKKWVQYINYLEMS GGGSHHHHHH
162	CCL19-Lumican	GANDAEDCCLSVTQRP IPGNIVKAFRYLLNEDGCRVPAVVF ~~TTLRG~~ YQLCAPPDQPWVDRI IIRLLKKSSAKNKGNS ~~TRRSPVS~~ GGGSGGGSG GGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSV PMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKI KGKVFSLKQLKKLHINYNLNTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNLTFIYLOHNQKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKL PAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSG VPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDV KSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITV NGGGSHHHHHH
163	Lumican - CCL19	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLNTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLOHNQKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGGGANDAEDCCLSVTQRP IPGNIVKAFRYLLNEDGCRV AVVF ~~TTLRG~~ YQLCAPPDQPWVDRI IIRLLKKSSAKNKGNS ~~TRRSPVS~~ GGGSHHHHHH
164	CCL19	GANDAEDCCLSVTQRP IPGNIVKAFRYLLNEDGCRVPAVVF ~~TTLRG~~ YQLCAPPDQPWVDRI IIRLLKKSSAKNKGNS ~~TRRSPVS~~ GGGSHHHHH H
165	CCL21c - Lumican	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEP SLGCP IPAI LFLPRKH SKPELCANPEEGWVQNLMRRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSGKK GKGSGCKRTEQTQPSRG GGGSGGGSGGGSQYYDYDIPLFMYGQIS PNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDH IDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGKVFSLKQLKKLHINYN NLNTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSDGLVNLTFIYLOHNQK EDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKIS NIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYN KLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILGPLSYSKIKHLR LDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGGSHHHHHH
166	Lumican - CCL21c	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLNSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNLNTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSD GLVNLTFIYLOHNQKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG

		NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGGSDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPISLGCPI AAILFLPRKH SKPELCANPEEGWVQNLMMRLDQPPAPGKQSPGCRKN RGTSKSGKKGKSGKCKRTEQTQPSRGGGGSHHHHHH
167	CCL21c	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPISLGCPIAAILFLPRKH SKPELCANPEEGWVQNLMMRLDQPPAPGKQSPGCRKNRGTSKSGK GKSGKSGCKRTEQTQPSRGGGGSHHHHHH
168	Lumican - CCL21c truncado	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPISLGCPIAAILFLPRKH SKPELCANPEEGWVQNLMMRLDQPPAPGKGSGGGSGGGSSQYYDY DIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIK YLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVF SKL KQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNL TFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSL LTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNI SSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKILG PLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSHHH HHH
169	Lumican - CCL21c truncado	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMV PPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGK VFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFD GLVNLTFIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAG LPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPG NSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGG GSGGGSGGGSSDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPISLGCPI PAAILFLPRKH SKPELCANPEEGWVQNLMMRLDQPPAPGKGSGGSHHH HHH
170	CCL21c truncado	SDGGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQEPISLGCPIAAILFLPRKH SKPELCANPEEGWVQNLMMRLDQPPAPGKGSGGSHHHHHH
171	CCL11	HPGSIPTSCCFIMTSKKIPNTLLKSYKRITNNRCTLKAIVFKTRLG KEICADPKKKWVQDATKHLQKLQTPKP GGGSHHHHHH
172	CCL11 - Lumican	HPGSIPTSCCFIMTSKKIPNTLLKSYKRITNNRCTLKAIVFKTRLG KEICADPKKKWVQDATKHLQKLQTPKP GGGSGGGSGGGSSQYYDYD IPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKY LYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGKVF SKL QLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNL FIYLQHNQKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSL TLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNIS SLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCKILGP LSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMECLRVANEITVNGGSHHHH HH
173	CLEC2- MSA- lumican	QQKYLLAEKENLSATLQQLAKKFCQELIRQSEIKTKSTFEHKCSPC ATKWRYHGDSCYGFRRNLTWEEKQYCTEQNATLVKTASQSTLDY IAERITSVRWIGLSRQNSKKDWMWEDSSVLRKNGINLSGNTENMN CAYLHNGKIHPASCKERHYLICERNAGMTRVDQLLGGGSGGGSGGG SEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQE VTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCC TKQEPERNECFLOHKDDNPSLPFFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGH YLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLD

		GVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFA EITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKL QTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAE AKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPP ACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQ KAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR VCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAE TFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQQLKTVMDDF AQFLDTCKAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGSGGGSGYYDY DIPLEMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIK YLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLENSKIKGKVFSL KQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSEFDGLVNL TFIYLOHNQKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSL LTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLOYLRLSHNEADSGVPGNSFNI SSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILG PLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMYECLRVANEITVNGGSHHH HHH
174	CLEC2- MSA	QOKYLLAEKENLSATLQOLAKKFCQELIRQSEIKTKSTFEHKCSPC ATKWRYHGDSCYGGFFRRNLTWEEKQYCTEQNATLVKTASQSTLDY IAERITSVRWIGLSRQNSKKDWMWEDSSVLRKNGINLSGNTENMN CAYLHNGKIH PASCKERHYLICERNAGMTRVDQLLGGGSGGGSGGG SEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQE VTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCC TKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGH YLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLD GVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFA EITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKL QTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAE AKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPP ACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQ KAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR VCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAE TFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQQLKTVMDDF AQFLDTCKAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHH
175	IFNg-MSA-lumican	HGTVIESLESNNFYNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGDMKILQS QIISFYLRLEVLKDNQAISNNISVIESHLITTFFSNSKAKKDAFM SIKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRSRCSGSGGG SEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQE VTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCC TKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGH YLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLD GVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFA EITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKL QTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAE AKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPP ACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQ KAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR VCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAE TFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQQLKTVMDDF AQFLDTCKAADKDTCTFSTEGPNLVTRCKDALAGGSGGGSGYYDY

		DIPLFMYGOISPNCAPCECNCPHSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIK YLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLENSKIKGKVF SKL KQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLG SFDGLVNL TFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTS LTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNI SSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFCILG PLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMYECLRVANEITVNGGSHHH HHH
176	IFNg - IFNg - MSA lumican	HGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNWQKDGMKILQS QIISFYLR LFEVLKDNQAI SNNISVIESHLIT TFFSNSKAKKDAFM SIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRKRKRSRC GGGSG GGGGGGGGGSHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNW QKDGMKILQS QIISFYLR LFEVLKDNQAI SNNISVIESHLIT TFF SNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRK RKRSRC GGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKC SYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNL RENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTS FKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLY YAEQYNEILTQCCAEA DKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVAR LSQTFFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYM CENQATISSKLQTCCKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFV EDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEAT LEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYG FQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPC VEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVD ETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKQTALAELVKHKPKAT AEQLKTVMD DFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGG GSGGGSQYYDYDIP LFM YGOISPNCAPCECNCPHSYPTAMYCDDLK KSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNNLE SKIKGKVF SKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKIS KLG SFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGKLSLEYLDLSFNQ SKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELA DSGVPGNSFNISSSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEK FDVKSFCILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMYECLRVANE ITVNGGSHHHHHH
177	IFNg - IFNg - MSA	HGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNWQKDGMKILQS QIISFYLR LFEVLKDNQAI SNNISVIESHLIT TFFSNSKAKKDAFM SIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRKRKRSRC GGGSG GGGGGGGGGSHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKS LFLDIWRNW QKDGMKILQS QIISFYLR LFEVLKDNQAI SNNISVIESHLIT TFF SNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPES SLRK RKRSRC GGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKC SYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNL RENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTS FKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLY YAEQYNEILTQCCAEA DKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVAR LSQTFFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYM CENQATISSKLQTCCKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFV EDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEAT

		LEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAHHHHHH
178	Lumican - MSA - IFNg	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLI LDHNLLLENSKIKGKVFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSEFGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSECKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSHGTVIESLESNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEFVLKDNQAISSNNISVIESHLITTFSSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQQAFAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKRSRCHHHHHH
179	Lumican - MSA - IFNg - IFNg	QYYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPSYPTAMYCDDLKLSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLI LDHNLLLENSKIKGKVFSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSEFGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGNSFNISLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSECKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPDMECLRVANEITVNGGSGGGGSEAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLOHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKDPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSHGTVIESLESNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGMKILQSQIISFYLRLEFVLKDNQAISSNNISVIESHLITTFSSNSKAKKDAFMSIAK

		FEVNNPQVQROAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKRSRCGGGSGGGSGGGSGGGSGHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRLEVLKDNQAI SNNISVIESHLITTF SNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQROAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKRSRCHHHHHH
180	MSA- IFNg - IFNg	EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEV TDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCT KQEPERNECF LQHKDDNP SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHY LHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDG VKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAE ITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQ TCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPA CYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQK APQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAET FTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTMDDFA QFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRLEVLKDNQAI SNNISVIESHLITTF SNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQROAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKRSRCGGGSGGGSGGGSGGGSGHGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRLEVLKDNQAI SNNISVIESHLITTF SNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQROAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKRSRCHHHHHH
181	LAIR - (H) 6	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVCSYSDKHDLYNMVRLEKDG STFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTSLWKTYSIYHHHHHHH
182	Lumican (murino)	YYDYDIPLFMYGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLKSVPMVP PGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLLENSKIKGV FSKLKQLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSGFDG LVNLTFIYLQHNQLKEDAVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGL PTSLTLTYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLRLSHNELADSGVPGN SFNISSLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSFC KILGPLSYSKIHLRLDGNPLTQSSLPDMYECLRVANEITVN
183	MSA murino	EAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEV TDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCT KQEPERNECF LQHKDDNP SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHY LHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDG VKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAE ITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQ TCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEA KDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPA CYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQK APQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAET FTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTMDDFA QFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA
184	23/03 LC - kappa murino	DTVLTQSPALAVSPGERVTI SCRASESVSTRMHWYQORPGQPPKLLIYVASRLESGVPARFSGGGSGTDFTLTIDPVEANDTATYFCQQSWN

	(3/23 LC em negrito; cadeia kappa murina sublinhada)	DPWTFGGGTKLELKRADAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFI YPKDINVKKIDGSE ~~RQ~~ NGVLNSWTDQDSKDY ~~ST~~ MSSTLT ~~LT~~ KDE YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN ~~RNEC~~
185	3/23 HC-lumican (LALA-PG) (3/23 HC em negrito; sublinhado mIgG2c; mutação de silenciamento LALA-PG sublinhado em negrito; sublinhado pontilhado Lumican)	EVQLVESGGGLVQPG RS LKLS CAAS GFTLSDY MAWVRQ APKKGLE WVASIN YEGS STYYGES VKGR FTISR DN AKSTLYLQ MNS LRSEDTA TYYCVRHDNYFDYW G QGV L TV VSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSGLSSGVHTFPALLQSGLYTLSSSV TVTSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVDKKIEPRVPITQNP ~~CPPLKEC~~ PPCAAPD AAGG SVFIFPPKIKDVLMI SLSP MVTCVVVDVSEDDPD VQISWFWNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKE FKCKVNNRAL GSPI EKTISKPRGPFVRAPQVYVLP PPAE EMTKKEFS LTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKL RVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTKTISRSLGKGGGGSGGGG SGGGGSQYYDYDIPLFMYGQISPNCAP ECNC PHSYPTAMYCDD LKL KSVPMVPPGIKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHN LLEN SKIKGKVF SKLKQL KLHINYN NLTES VGPLPKSLQDLQ LNTNKIS KLGSFDGLVNLTFIYLQHNQLKEDAVSAS LKGLKS LEYLDLSFNQ M SKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYLR LSHNELA DSGVPGNSFNIS SLELD LSYNKLKSIP TVNEN LENYYLEVNE LEK FDVKSFCKILGPLSY SKIKHL RLDGNPLTQSSLP PD MYECLRVAN E ITVN
186	LAIR-MSA-IL2 (LAIR negrito ;-(GGGs) 1 itálico; MSA sublinhado; (GGGs) 1 itálico; IL-2; (H) 6 sublinhado pontilhado)	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGT FVTVVCSYSDKHDL YNMVRLEKDG STFMEK STEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIY SKGITW SERSKT LELKVI KENVIQTPAG P TS SDTSWL KTY SIY GGSEAHKSEIAHRYN DLGEQHF KGLV LIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELAD CCTKQEP ERNECF LQ HKDDNP SLPP FERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFY APELLYYAEQYNEIL TQCC AEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKC SSMQ KFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVN KECCHGDLLECAD DRAELAKY MCENQATISSKLQ TCCDKP LLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAAD FVEDQ EVCKNYAEAKDVFLGTFLY EY SRRHPDYSVSL LLRLAK KYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQ PL VEEPKNLVKTNC DLYE KLGEYGFQNA ILVRY TQKAPQVSTPTLVEA ARNLGRVGT KCCTLP EDQRLPCVEDYLSAILNRVCL LHEK TPVSEH VTKCCSGSLV ERRPCF SALTVDETYVPKEFKAETFTFHS DI CTL PE KEKQIKKQTALAE L VKHKPKATAEQ LKT VMDDFAQFLDT CCKA ADK DTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSAPTSSSTSSSTAE AQ QQQQQQQ QQQ QHL EQLLMDLQELLSRMENYRN LKLPR MLTFKFYLPKQATE LK DLQCLEDELG PLRH VLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVT VVK LKGS DNTFECQF DD ESATVVDFLRRWIAFCQ SIIST SPQH HHHHH
187	LAIR30.w.A	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGT FVTVVACS YSDKHDL YNMVR LEKGG STFMEK STEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIY SKGITW SERSKT LELKVI KENVIQTPAG P TS SDTSWL KTY SIY
188	LAIR30.w.B	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGT FVTVVCSYSDKHDL YNMVRLEKDG STSM EKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIY SKGITW SERSKT LELKVI KENVIQTPAG P TS SDTSWL KTY SIY
189	LAIR30.w.C	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGT FVTVVCSYSDKHDL YNMVRLEKDG STFM GKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIY SKGITW SERSKT LELKVI KENVIQTPAG P TS SDTSWL KTY SIY

190	LAIR30.d.D	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDG STFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
191	LAIR30.w.E	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDG STFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
192	LAIR30.w.F	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDG STFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERAKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY
193	LAIR30.2.K1.B	QEGSLPDITIFPNSSLVISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDG STFMEKSTAPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTLWLKTYSIY
194	LAIR-MSA (LAIR bold; (GGGS)1 italic- IL-2- (H)6 dotted underline)	QEGSLPDITIFPNSSLMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDG STFMEKSTEPYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKT LELKVIKENVIQTPAPGPTSDTSWLKTYSIY GGSEAHKSEIAHRYN DLGEQHFQGLVLIASFQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLO HKDDNPSPPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFY APELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQ RMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVN KECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKPLKKAH CLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEY SRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPL VEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEA ARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEH VTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHS DICTLPE KEKQIKKQTALAEVLVHKPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKKAADK DTCFSTEGPNLVTRCKDALAGGGSHHHHHH
195	4420 HC-LAIR (4420 HC bold; mIgG1; (GGGS)3 italic; LAIR underline)	DVKLDETGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPKGL WVAQIRNKPYNYETYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVED MGIIYCTGSYYGMDYWGQTSVTVS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVPSSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF PAPIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGSGGGSGQEGSLPDITIFPNSS LMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDGSTFMEKSTEPYKTEDE EFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQTPA PGPTSDTSWLKTYSIY
196	3/23 HC-LAIR (3/23 HC bold; mIgG1; (GGGS)3 italic; LAIR underline)	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTLSDYMAWVRQAPKGL WVASINYESSTYYGESVKGRFTISRDNASTLYLQMNLSLRSEDTA TYYCVRHDNYFDYWGQGLVTVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSM VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSV TVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEV SSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE VHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF APIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGSGGGSGQEGSLPDITIFPNSS LMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLAKDGSTFMEKSTEPYKTEDE FEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQTPA PGPTSDTSWLKTYSIY
197	LOB12.3 HC-	DVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFIIFSDFMAWVRQAPTKGLE

	LAIR (LOB12.3 HC bold; mIgG1; (GGGGS)3 italic; LAIR underline)	WVASISPDGSIPYYRDSVKGRFTVSRENAKSSLYLQMDSLRSED TA TYYCARRSYGGYSEIDYWGOQGMVTVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQ TNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTL SSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICT VPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFV DDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNS AAFPAPIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGGSQEGSLPDITIFP NSSLMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEPYK TEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQ TPAPGPTSDTSWLKTYSIY
		QVQLKESGPGLVQPSQTLTLCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLE WMGRMRYDGDYYNSVLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTD TAI YYCTRDGRGDSFDYWGOQGMVTVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSV VTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF PAPIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGGSQEGSLPDITIFPNSS LMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEPYKTED EFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQTPA PGPTSDTSWLKTYSIY
		EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLE SVAYITSSSINIKYADAVKGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSE DTA MYICARFDWDKNYWGQGMVTVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSM VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSV TVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEV SSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE VHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF APIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGGSQEGSLPDITIFPNSSL MISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDE FEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAP GPTSDTSWLKTYSIY
198	OX86 HC-LAIR (OX86 HC bold; mIgG1; (GGGGS)3 italic; LAIR underline)	QVQLKESGPGLVQPSQTLTLCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLE WMGRMRYDGDYYNSVLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTD TAI YYCTRDGRGDSFDYWGOQGMVTVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSV VTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV EVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF PAPIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGGSQEGSLPDITIFPNSS LMISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEPYKTED EFEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQTPA PGPTSDTSWLKTYSIY
199	2C11 HC-LAIR (2C11 HC bold; mIgG1; (GGGGS)3 italic; LAIR underline)	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHWVRQAPGRGLE SVAYITSSSINIKYADAVKGRFTVSRDNAKNLLFLQMNILKSE DTA MYICARFDWDKNYWGQGMVTVSS ATTKGPSVYPLAPGSAAQTNSM VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSV TVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEV SSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE VHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAF APIEKTISKTKGRPKGGGGSGGGGSQEGSLPDITIFPNSSL MISQGTFTVTVVCSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTEPYKTEDE FEIGPVNETITGHYSCIYSGKITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAP GPTSDTSWLKTYSIY

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) um domínio imunomodulador;

(ii) um domínio de ligação ao colágeno, sendo que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e se liga o colágeno tipo I com um $K_D \leq 500$ nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $pI < 10$ e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa; e

(iii) opcionalmente, um ligante,

sendo que o domínio imunomodulador está operacionalmente ligado com ou sem o ligante ao domínio de ligação ao colágeno.

2. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o K_D do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV ser menor que o K_D do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio.

3. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ter um MW de cerca de 5-100 kDa, cerca de 10-80 kDa, cerca de 20-60 kDa, cerca de 30-50 kDa, ou cerca de 10 kDa, cerca de 20 kDa, cerca de 30 kDa, cerca de 40 kDa, cerca de 50 kDa, cerca de 60 kDa, cerca de 70 kDa, cerca de 80 kDa, cerca de 90 kDa ou cerca de 100 kDa.

4. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de o

domínio de ligação ao colágeno compreende uma ou mais repetições ricas em leucina que se ligam ao colágeno.

5. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez repetições ricas em leucina que ligam o colágeno.

6. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma ou mais repetições ricas em leucina de um membro de classe II de proteoglicanos humanos da família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP).

7. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de o SLRP ser selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticin, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e nidogênio.

8. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a SLRP ser lumican.

9. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma SLRP humana.

10. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de o SLRP ser selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticin, osteoglicina/mimecano, podocano, perlecano e

nidogênio.

11. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de a SLRP ser lumican.

12. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de o lumican compreender a sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 107.

13. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma glicoproteína humana tipo I com um domínio semelhante a Ig, ou uma porção extracelular da mesma que se liga ao colágeno.

14. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de a glicoproteína tipo I competir com lumican pela ligação para ligação ao colágeno tipo I.

15. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14, caracterizada pelo fato de a glicoproteína humana tipo I ser selecionada de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV.

16. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de a glicoproteína humana tipo I ser LAIR1.

17. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de a glicoproteína humana tipo I ser LAIR1 e o domínio de ligação ao colágeno compreende os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 98.

18. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer

uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 compreendendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

19. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação aumentada ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

20. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

21. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender um polipeptídeo que ativa, aumenta ou promove uma resposta de uma célula imune.

22. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 20, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender um polipeptídeo que inibe, reduz ou suprime uma resposta de uma célula imune.

23. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 ou 22, caracterizada pelo fato de a célula imune ser uma célula linfóide selecionada a partir de

uma célula linfóide inata, uma célula T, uma célula B, uma célula NK e uma combinação das mesmas.

24. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 23, caracterizada pelo fato de a célula imune ser uma célula mieloide selecionada de um monócito, um neutrófilo, um granulócito, um mastócito, um macrófago, uma célula dendrítica e uma combinação dos mesmos.

25. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 24, caracterizada pelo fato de a resposta da célula imune compreender a produção de citocinas, produção de anticorpos, produção de células imunes específicas de antígeno, função efetora aumentada e/ou citotoxicidade e uma combinação dos mesmos.

26. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 21 a 25, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender um ou mais selecionados a partir de uma citocina, uma quimiocina, um ligante/receptor de ativação, um ligante/receptor inibitório ou uma combinação dos mesmos.

27. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender uma ou mais citocinas.

28. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de a citocina ser uma interleucina de receptor de cadeia comum gama humana selecionada de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-15/IL-15RA, IL-21 e uma combinação dos mesmos.

29. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de a citocina ser IL-2.

30. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de a citocina ser um membro da família IL-12 humana selecionado de IL-12 (p35), IL-12 (p40), IL-12 (p35)/IL-12 (p40), IL-23, IL-27 IL-35 e uma combinação dos mesmos.

31. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de a citocina ser uma fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40).

32. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de a citocina ser um membro da família IL-1 humana selecionado de IL-1, IL-18, IL-33 e uma combinação das mesmas.

33. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 32, caracterizada pelo fato de a citocina ser IL-18.

34. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de a citocina ser selecionada a partir de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF, FLT3L, G-CSF, M-CSF e uma combinação dos mesmos.

35. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender uma ou mais quimiocinas.

36. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de a quimiocina ser selecionada de LIF, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL1, CXCL9, CXCL10, MCP-1, Eotaxina, RANTES, LIX e uma combinação dos mesmos.

37. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de a quimiocina ser selecionada de CCL3, CCL4, CCL5, Eotaxina e uma combinação

dos mesmos.

38. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender um ou mais ligantes/receptores de ativação.

39. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor de ativação ser selecionado a partir de uma superfamília TNF, uma superfamília de receptores CD28, uma família de ligantes B7 e um receptor de células T.

40. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor de ativação ser um ligante da superfamília TNF selecionado a partir de TNF-alfa, CD40L, 4-1BBL, OX40 e uma combinação dos mesmos.

41. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor de ativação ser um receptor da superfamília TNF e o domínio imunomodulador compreender um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-TNFR1, um anticorpo anti-TNFR2, um anti-anticorpo CD40, um anticorpo anti-4-1BB e um anticorpo anti-OX40.

42. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor de ativação ser um membro da superfamília CD28 ou um membro da família B7 selecionado a partir de ligante ICOS, CD80 e CD86 e uma combinação dos mesmos.

43. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de o

ligante/receptor de ativação ser um membro da superfamília CD28 e o domínio imunomodulador compreender um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo selecionado a partir de um anticorpo anti-ICOS e um anticorpo anti-CD28.

44. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que o ligante/receptor de ativação ser um receptor de células T e o domínio imunomodulador compreender um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-CD3 γ , um anticorpo anti-CD3 δ , um anti-anticorpo CD3 ζ e um anticorpo anti-CD3 ϵ .

45. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador compreender um ou mais ligantes/receptores inibitórios.

46. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor inibitório ser selecionado a partir de uma superfamília de receptores CD28, uma superfamília TNF e um inibidor de checkpoint.

47. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor inibitório ser um membro da superfamília CD28 e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-PD-L1, um anticorpo anti-PD-L2, um anticorpo anti-CTLA4.

48. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor inibitório ser um membro da superfamília TNF

e o domínio imunomodulador compreender um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado a partir de um anticorpo anti-TIGIT e um anticorpo anti-BTLA.

49. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de o ligante/receptor inibitório ser um inibidor de checkpoint e o domínio imunomodulador compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno selecionado de um anticorpo anti-VISTA, um anticorpo anti-TIM-3, um anti-Anticorpo LAG-3, um anticorpo anti-CD47 e um anticorpo anti-SIRP α .

50. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 49, caracterizada pelo fato de o domínio imunomodulador estar operacionalmente ligado ao domínio de ligação ao colágeno por meio de um ligante.

51. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de o ligante ter comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno.

52. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de o ligante fornecer peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido.

53. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de o ligante permitir a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o engajamento receptor/ligante.

54. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 51 a 53, caracterizada pelo fato de o ligante ser um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N"

aminoácidos de comprimento, em que 1-1000, 10-900, 30-800, 40-700, 50- 600, 100-500 ou 200-400.

55. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de o ligante ser albumina de soro humano ou fragmento da mesma.

56. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de o ligante compreender um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

57. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 56, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção mediante administração *in vivo*.

58. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ser ≥ 60 kDa.

59. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão se ligar ao colágeno tipo I e/ou tipo IV mediante administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

60. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

- (i) pelo menos uma citocina;
- (ii) um domínio de ligação ao colágeno, sendo que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um $K_D \leq 500$ nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $pI < 10$ e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa; e

(iii) um ligante, sendo que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

sendo que a citocina está operacionalmente ligada por meio do ligante ao domínio de ligação ao colágeno e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

61. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de o K_D do domínio de ligação ao colágeno para o colágeno tipo I e/ou tipo IV ser menor que o K_D do domínio de ligação ao colágeno para um componente da matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio.

62. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 60 ou 61, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocan, perlecan e nidogen.

63. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 62, caracterizada pelo fato de a SLRP ser lumican.

64. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de lumican compreender a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 107.

65. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 61, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser selecionado de LAIR1,

LAIR2 e Glicoproteína IV.

66. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 65, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser LAIR1.

67. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 98.

68. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 compreendendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

69. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação aumentada ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

70. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

71. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer

uma das reivindicações de 60 a 70, caracterizada pelo fato de a citocina ser uma interleucina de receptor de cadeia comum gama humana selecionada de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-15/IL-15RA, IL-21 e uma combinação dos mesmos.

72. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 71, caracterizada pelo fato de a citocina ser IL-2.

73. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 70, caracterizada pelo fato de a citocina ser um membro da família IL-12 humana selecionado de IL-12 (p35), IL-12 (p40), IL-12 (p35)/IL-12 (p40), IL-23, IL-27, IL-35 e uma combinação dos mesmos.

74. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 73, caracterizada pelo fato de a citocina ser uma fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40).

75. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de compreender uma segunda citocina, em que a segunda citocina é IL-2.

76. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 70, caracterizada pelo fato de a citocina ser um membro da família IL-1 humana selecionado de IL-1, IL-18, IL-33 e uma combinação das mesmas.

77. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 70, caracterizada pelo fato de que a citocina ser selecionada a partir de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF, FLT3L, G-CSF, M-CSF e uma combinação dos mesmos.

78. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 77, caracterizada pelo fato de o ligante ter comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno

e/ou fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido e/ou permite a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o envolvimento receptor/ligante.

79. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 77, caracterizada pelo fato de o ligante ser albumina de soro humano ou fragmento da mesma.

80. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 77, caracterizada pelo fato de o ligante compreender um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

81. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 80, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção mediante administração *in vivo*.

82. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 60 a 80, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão se liga ao colágeno tipo I e/ou tipo IV mediante administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

83. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) pelo menos uma quimiocina;

(ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um $K_D \leq 500$ nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $pI < 10$ e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa; e

(iii) um ligante, sendo que o ligante é um polipeptídeo

hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

sendo que a quimiocina está operacionalmente ligada através do ligante ao domínio de ligação ao colágeno e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

84. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 83, caracterizada pelo fato de o K_D do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o K_D do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio.

85. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 ou 84, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglycan, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocan, perlecan e nidogen.

86. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de a SLRP ser lumican.

87. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 86, caracterizada pelo fato de lumican compreender a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 107.

88. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 83 ou 84, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser selecionado de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV.

89. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 88, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser LAIR1.

90. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 89, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 98.

91. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 89, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 compreendendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

92. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 89, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação aumentada ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

93. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 89, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

94. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 93, caracterizada pelo fato de

a quimiocina ser selecionada de LIF, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL1, CXCL9, CXCL10, MCP-1, Eotaxina, RANTES, LIX, e uma combinação dos mesmos.

95. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 93, caracterizada pelo fato de a quimiocina ser selecionada a partir de CCL3, CCL4, CCL5, Eotaxina e uma combinação dos mesmos.

96. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 95, caracterizada pelo fato de o ligante ter comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno e/ou fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido e/ou permite a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o envolvimento receptor/ligante.

97. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 95, caracterizada pelo fato de o ligante é albumina de soro humano ou fragmento da mesma.

98. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 95, caracterizada pelo fato de o ligante compreender um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

99. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 98, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção mediante administração in vivo.

100. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 83 a 98, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão se ligar ao colágeno tipo I

e/ou tipo IV após administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

101. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) um anticorpo agonista que se liga a um ligante/receptor de ativação compreendendo um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida; e

(ii) um domínio de ligação ao colágeno, sendo que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um $K_D \leq 500$ nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $pI < 10$ e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa, sendo que o domínio de ligação ao colágeno está operacionalmente ligado ao C-terminal do domínio Fc ou domínio Fc mutante.

102. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 101, caracterizada pelo fato de o K_D do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor que o K_D do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio.

103. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 ou 102, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglican, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina/osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocan, perlecan e nidogen.

104. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a

reivindicação 103, caracterizada pelo fato de a SLRP ser lumican.

105. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 104, caracterizada pelo fato de lumican compreender a sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 107.

106. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 101 ou 102, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser selecionado a partir de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV.

107. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 106, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser LAIR1.

108. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 107, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 98.

109. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 107, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 compreendendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

110. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 107, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação aumentada ao colágeno em relação a uma

afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

111. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 107, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

112. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 101 a 111, caracterizada pelo fato de o anticorpo agonista ser selecionado a partir de um anticorpo anti-TNFR1, um anticorpo anti-TNFR2, um anticorpo anti-CD40, um anticorpo anti-4-1BB e um anti-OX40 anticorpo.

113. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 101 a 111, caracterizada pelo fato de o anticorpo agonista ser selecionado a partir de um anticorpo anti-ICOS e um anticorpo anti-CD28.

114. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 101 a 111, caracterizada pelo fato de o anticorpo ser selecionado a partir de um anticorpo anti-CD3 γ , um anticorpo anti-CD3 δ , um anticorpo anti-CD3 ζ e um anticorpo anti-CD3 ϵ .

115. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 101 a 114, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção mediante administração *in vivo*.

116. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 101 a 114, caracterizada

pelo fato de a proteína de fusão se ligar ao colágeno tipo I e/ou tipo IV após administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

117. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

- (i) um anticorpo antagonista que se liga a um ligante/receptor inibitório compreendendo um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida; e
- (ii) um domínio de ligação ao colágeno, em que o domínio de ligação ao colágeno se liga especificamente ao colágeno tipo I e/ou tipo IV e liga o colágeno tipo I com um $K_D \leq 500$ nM, e em que o domínio de ligação ao colágeno tem um ponto isoelétrico $pI < 10$ e um peso molecular (MW) de ≥ 5 kDa, sendo que o domínio de ligação ao colágeno está operacionalmente ligado ao C-terminal do domínio Fc ou domínio Fc mutante.

118. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 117, caracterizada pelo fato de o K_D do domínio de ligação ao colágeno para colágeno tipo I e/ou tipo IV é menor do que o K_D do domínio de ligação ao colágeno para um componente de matriz extracelular selecionado de fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C ou fibrinogênio.

119. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117 ou 118, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender um SLRP humano selecionado de lumican, decorina, biglican, fibromodulina, condroaderina, asporina, PRELP, osteoaderina / osteomodulina, opticina, osteoglicina/mimecano, podocan, perlecan e nidogen.

120. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 119, caracterizada pelo fato de a SLRP ser lumican.

121. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 120, caracterizada pelo fato de lumican compreender a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 107.

122. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 117 ou 118, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser selecionado de LAIR1, LAIR2 e Glicoproteína IV.

123. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 122, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno ser LAIR1.

124. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 111, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender os resíduos de aminoácidos 22-122 da sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 98.

125. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 123, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 compreendendo uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

126. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 123, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com

afinidade de ligação aumentada ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

127. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 123, caracterizada pelo fato de o domínio de ligação ao colágeno compreender uma variante LAIR1 com afinidade de ligação diminuída ao colágeno em relação a uma afinidade de ligação ao colágeno de uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 98.

128. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 117 a 127, caracterizada pelo fato de que o anticorpo antagonista ser selecionado a partir de um anticorpo anti-PD-1, um anticorpo anti-PD-L1, um anticorpo anti-PD-L2, um anticorpo anti-CTLA4 anticorpo, um anticorpo anti-TIGIT, um anticorpo anti-BTLA, um anticorpo anti-VISTA, um anticorpo anti-TIM-3, um anticorpo anti-LAG-3, um anticorpo anti-CD47 e um anticorpo anti-SIRP α .

129. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 117 a 128, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção mediante administração *in vivo*.

130. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 117 a 128, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão se ligar ao colágeno tipo I e/ou tipo IV mediante administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

131. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) IL-2 humana;

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
(iii) um ligante, sendo que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

sendo que IL-2 está operacionalmente ligada por meio do ligante a Lumican ou LAIR1, e sendo que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

132. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) uma fusão de cadeia única de IL-12 humana (p35)/IL-12 (p40);

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
(iii) um ligante, sendo que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N = 1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$,

sendo que a fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40) está operacionalmente ligada por meio do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

133. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) CCL-3 humano;

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
(iii) um ligante, sendo que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, sendo que CCL-3 está operacionalmente ligado através do ligante a lumican ou LAIR1, e sendo que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

134. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

- (i) CCL-4 humano;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, sendo que CCL-4 está operacionalmente ligado através do ligante a lumican ou LAIR1, e onde a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

135. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

- (i) CCL-5 humano;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana;
- (iii) um ligante, sendo que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, sendo que CCL-5 está operacionalmente ligado através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

136. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

- (i) Eotaxina humana;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e
- (iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, sendo que a eotaxina está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

137. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 131 a 136, caracterizada pelo fato de o lumican compreender a sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 107.

138. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 131 a 136, caracterizada pelo fato de LAIR1 compreender a sequência de aminoácidos como representado na SEQ ID NO: 98, ou compreende uma ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos, opcionalmente dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais substituições, adições ou deleções de aminoácidos em relação a uma proteína LAIR1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 98.

139. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 131 a 138, caracterizada pelo fato de o ligante tem comprimento ou massa suficiente para reduzir a adsorção do domínio imunomodulador em fibrilas de colágeno e/ou fornece peso molecular suficiente para a proteína de fusão reduzir a difusão de um tecido e/ou permite a separação estérica do domínio imunomodulador de fibrilas de colágeno para promover o envolvimento receptor/ligante.

140. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 131 a 138, caracterizada pelo fato de o ligante ser albumina de soro humano ou fragmento da mesma.

141. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 131 a 138, caracterizada pelo fato de o ligante compreender um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida.

142. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com

qualquer uma das reivindicações de 131 a 141, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção após administração *in vivo*.

143. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 131 a 142, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão se ligar ao colágeno tipo I e/ou tipo IV mediante administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

144. Proteína de fusão imunomoduladora, caracterizada pelo fato de compreender:

(i) um anticorpo agonista compreendendo um domínio Fc ou um domínio Fc mutante com interação FcR reduzida, em que o anticorpo agonista é selecionado a partir de um anticorpo anti-CD3, um anticorpo anti-4-1-BB, um anticorpo anti-CD40 e um anticorpo anti-OX40; e

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; em que lumican ou LAIR1 está operacionalmente ligado ao C-terminal do domínio Fc ou domínio Fc mutante.

145. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com a reivindicação 144, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão ter massa suficiente para reduzir o escape dependente do tamanho por difusão ou convecção mediante administração *in vivo*.

146. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações 144 ou 145, caracterizada pelo fato de a proteína de fusão se ligar ao colágeno tipo I e/ou tipo IV mediante administração *in vivo*, reduzindo assim a exposição sistêmica da proteína de fusão imunomoduladora.

147. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de

compreender uma proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

148. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146.

149. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender o ácido nucleico, conforme definido na reivindicação 148.

150. Célula transformada, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 149.

151. Método para a produção de uma proteína de fusão imunomoduladora, o método caracterizado pelo fato de compreender a manutenção de uma célula transformada, conforme definida na reivindicação 150, sob condições que permitem a expressão da proteína de fusão imunomoduladora.

152. Método, de acordo com a reivindicação 151, caracterizado pelo fato de compreender ainda obter a proteína de fusão imunomoduladora.

153. Método para ativar, aumentar ou promover uma resposta por uma célula imune em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147.

154. Método para inibir, reduzir ou suprimir uma resposta por uma célula imune em um sujeito, caracterizado pelo fato de

compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147.

155. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153 ou 154, caracterizado pelo fato de a célula imune ser uma célula linfoide selecionada a partir de uma célula linfóide inata, uma célula T, uma célula B, uma célula NK e uma combinação das mesmas.

156. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 153 ou 154, caracterizado pelo fato de a célula imune ser uma célula mieloide selecionada de um monócito, um neutrófilo, um granulócito, um mastócito, um macrófago, uma célula dendrítica e uma combinação dos mesmos.

157. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 153 a 156, caracterizado pelo fato de que a resposta da célula imune compreende a produção de citocinas, produção de anticorpos, produção de células imunes específicas para antígenos, função efetora aumentada e/ou citotoxicidade e uma combinação dos mesmos.

158. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 153 a 157, caracterizado pelo fato de a resposta da célula imune ocorrer em um microambiente tumoral.

159. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147.

160. Método para tratar câncer em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147.

161. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 159 ou 160, caracterizado pelo fato de uma resposta imune antitumoral é induzida no sujeito após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica.

162. Método, de acordo com a reivindicação 161, caracterizado pelo fato de a resposta imune antitumoral ser uma resposta de células T que compreende a produção de IFN γ e/ou IL-2 por uma ou ambas as células T CD4 + e células T CD8 +.

163. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 159 a 162, caracterizado pelo fato de a infiltração de células imunes em um microambiente tumoral ser aumentada após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica.

164. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 159 a 163, caracterizado pelo fato de a quantidade de células T reguladoras (Treg) ser reduzida em um microambiente tumoral ou a exaustão de células T é reduzida em um microambiente tumoral após a administração da proteína de fusão imunomoduladora ou da composição farmacêutica.

165. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 153 a 164, caracterizado pelo fato de a proteína de fusão imunomoduladora ou composição farmacêutica ser administrada por via intratumoral.

166. Kit, caracterizado pelo fato de compreender um recipiente compreende uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, e um carreador farmacêuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, e uma bula que compreende instruções para a administração da proteína de fusão ou produto farmacêutico composição, para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito em necessidade.

167. Kit, caracterizado pelo fato de compreender um recipiente que compreende uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, e um carreador farmacêuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, e uma bula que compreende instruções para a administração do anticorpo ou composição farmacêutica sozinha ou em combinação com outro agente, para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito em necessidade.

168. Uso de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, e um carreador farmacêuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, caracterizado pelo fato de dirigido à fabricação de um medicamento para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir crescimento do tumor em um sujeito com necessidade do mesmo.

169. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, e um carreador

farmaceuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, caracterizada pelo fato de ser dirigida à fabricação de um medicamento para tratar ou retardar a progressão do câncer ou reduzir ou inibir o crescimento do tumor em um sujeito com necessidade disso.

170. Proteína de fusão imunomoduladora, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, e um carreador farmaceuticamente aceitável opcional, ou uma composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, caracterizada pelo fato de ser dirigida ao uso como um medicamento.

171. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método sendo caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo um anticorpo direcionado ao antígeno tumoral, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

172. Método, de acordo com a reivindicação 156, caracterizado pelo fato de o antígeno tumoral ser um antígeno associado ao tumor (TAA), um antígeno específico do tumor (TSA) ou um neo-antígeno tumoral.

173. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 171 ou 172, caracterizado pelo fato de o anticorpo direcionado ao antígeno tumoral se ligar especificamente a

HER-2/neu, EGFR, VEGFR, CD20, CD33 ou CD38 humano.

174. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo uma vacina contra o câncer, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

175. Método, de acordo com a reivindicação 174, caracterizado pelo fato de a vacina contra o câncer ser uma população de células imunizadas in vitro com um antígeno tumoral e administrada ao sujeito.

176. Método, de acordo com a reivindicação 174, caracterizado pelo fato de a vacina contra o câncer ser um peptídeo que compreende um ou mais antígenos associados a tumores.

177. Método, de acordo com a reivindicação 174, caracterizado pelo fato de a vacina contra o câncer ser um conjugado de peptídeo anfifílico que compreende um antígeno associado a tumor, um lipídeo e, opcionalmente, um ligante, em que o conjugado de peptídeo anfifílico se liga a albumina em condições fisiológicas.

178. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 174 a 177, caracterizado pelo fato de a vacina contra o câncer compreender ainda um adjuvante.

179. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em

necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo um inibidor do ponto de controle imunológico, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

180. Método, de acordo com a reivindicação 179, caracterizado pelo fato de o inibidor do ponto de verificação imunológico compreender um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 ou TIM3.

181. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 146, ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 147, e uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo uma terapia celular adotiva, reduzindo ou inibindo o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

182. Método, de acordo com a reivindicação 181, caracterizado pelo fato de a terapia com células adotivas compreender uma célula imune efetora compreendendo uma molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a um antígeno tumoral.

183. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 181 ou 182, caracterizado pelo fato de a molécula de CAR compreender um domínio de ligação ao antígeno, um domínio transmembrana e um domínio intracelular que compreende um

domínio coestimulador e/ou um domínio de sinalização primário.

184. Método, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de o domínio de ligação ao antígeno se ligar ao antígeno tumoral associado à doença.

185. Método, de acordo com a reivindicação 183, caracterizado pelo fato de o antígeno tumoral ser selecionado a partir de CD19, EGFR, Her2/neu, CD30 e BCMA.

186. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 182 a 185, caracterizado pelo fato de a célula imune efetora ser uma célula T, como uma célula T CD8+.

187. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 182 a 185, caracterizado pelo fato de a célula imune efetora ser uma célula assassina natural (NK).

188. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 182 a 185, caracterizado pelo fato de a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica serem administradas por via intratumoral.

189. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 171 a 188, caracterizado pelo fato de a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica e a segunda composição serem administradas simultaneamente ou sequencialmente.

190. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de proteína de fusão imunomoduladora compreendendo:

- (i) IL-2 humana;
- (ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, sendo que IL-2 está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa, reduzindo ou inibindo assim o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

191. Método para reduzir ou inibir o crescimento do tumor ou tratar o câncer em um sujeito, o método caracterizado pelo fato de compreender a administração a um sujeito em necessidade de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora que compreende:

(i) uma fusão de cadeia única de IL-12 humana (p35)/IL-12 (p40);

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, sendo que a fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40) está operacionalmente ligada através do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa, reduzindo ou inibindo assim o crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

192. Método, de acordo com a reivindicação 190, caracterizado pelo fato de compreender ainda a administração de uma segunda composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão imunomoduladora compreendendo:

(i) uma fusão de cadeia única de IL-12 humana (p35)/IL-12 (p40);

(ii) lumican humano, LAIR1 humano ou variante LAIR1 humana; e

(iii) um ligante, em que o ligante é um polipeptídeo hidrofílico que compreende "N" aminoácidos de comprimento, em que $N=1-1000$, $10-900$, $30-800$, $40-700$, $50-600$, $100-500$ ou $200-400$, em que a fusão de cadeia única de IL-12 (p35)/IL-12 (p40) está operacionalmente ligada por meio do ligante a lumican ou LAIR1, e em que a proteína de fusão é ≥ 60 kDa.

193. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 190 a 192, caracterizado pelo fato de compreender ainda a administração de uma segunda composição que compreende uma quantidade eficaz de um anticorpo direcionado ao antígeno tumoral ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

194. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 190 a 193, caracterizado pelo fato de compreender ainda a administração de uma segunda composição que compreende uma quantidade eficaz de composição que compreende uma vacina contra o câncer.

195. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 190 a 194, caracterizado pelo fato de compreender ainda a administração de uma segunda composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo um inibidor do ponto de controle imunológico.

196. Método, de acordo com a reivindicação 195, caracterizado pelo fato de o inibidor do ponto de controle imunológico compreender um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3 ou TIM3.

197. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 190 a 196, caracterizado pelo fato de compreender ainda a administração de uma segunda composição compreendendo uma quantidade eficaz de uma segunda composição compreendendo uma terapia celular adotiva, reduzindo ou inibindo assim o

crescimento do tumor ou tratando o câncer no sujeito.

198. Método, de acordo com a reivindicação 197, caracterizado pelo fato de a terapia com células adotivas compreender uma célula imune efetora compreendendo uma molécula de receptor de antígeno quimérico (CAR) que se liga a um antígeno tumoral.

199. Método, de acordo com a reivindicação 198, caracterizado pelo fato de a célula imune efetora ser uma célula T, como uma célula T CD8 + ou uma célula NK.

200. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 190 a 199, caracterizado pelo fato de a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica serem administradas por via intratumoral.

201. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 190 a 200, caracterizado pelo fato de a proteína de fusão imunomoduladora ou a composição farmacêutica e a segunda composição serem administradas simultaneamente ou sequencialmente.

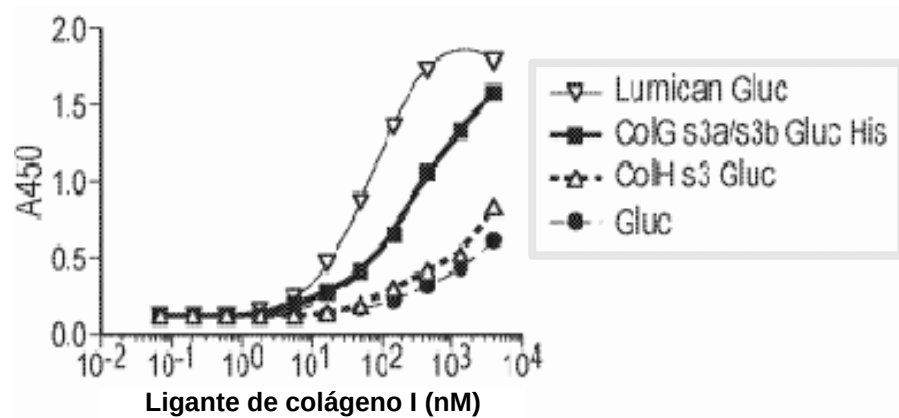


FIG.1A

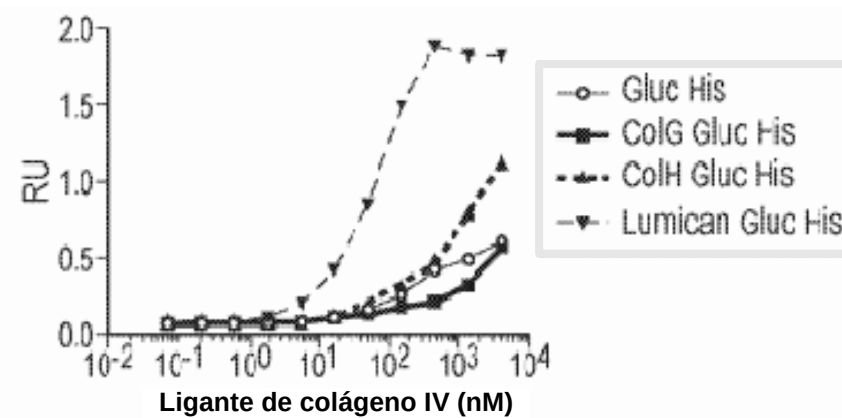


FIG.1B

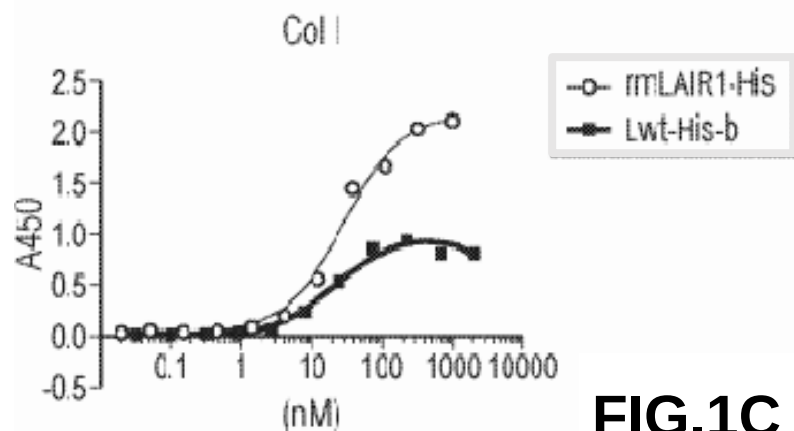


FIG.1C

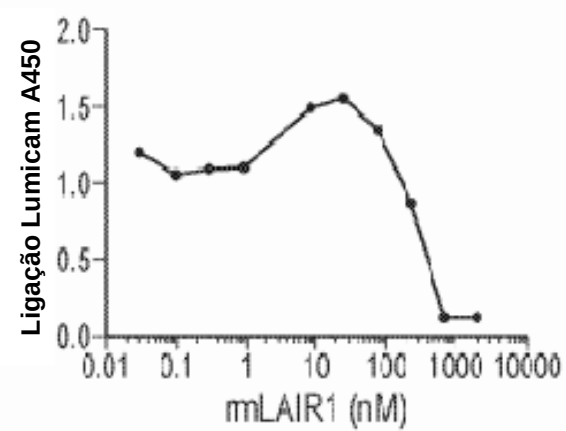


FIG.1D

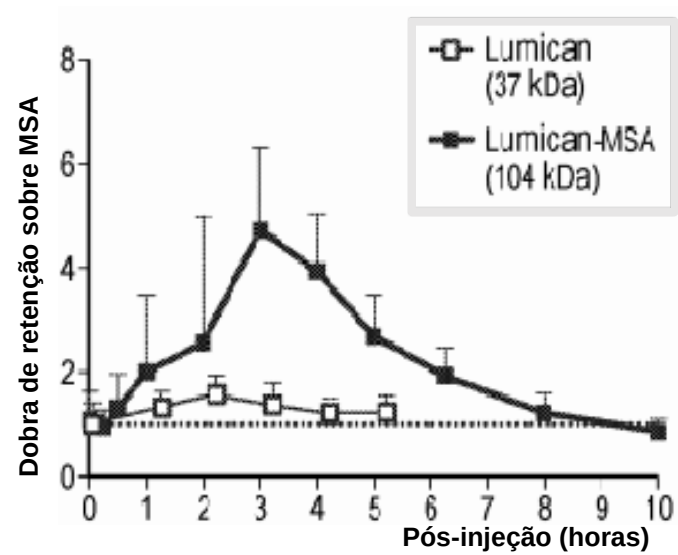


FIG.2A

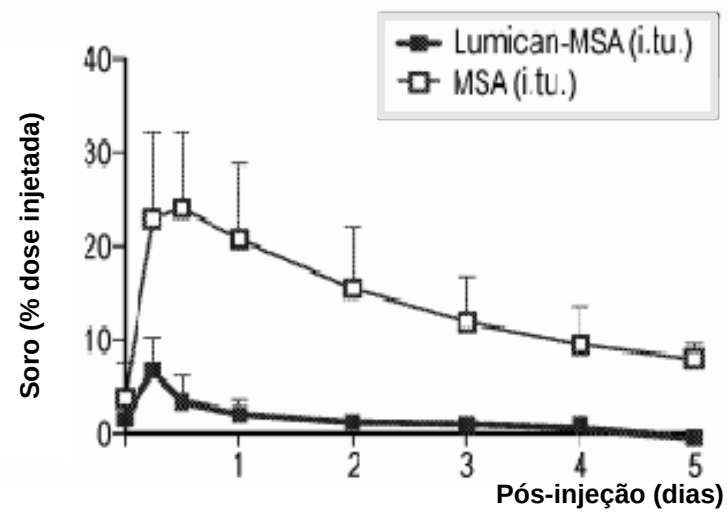


FIG.2B

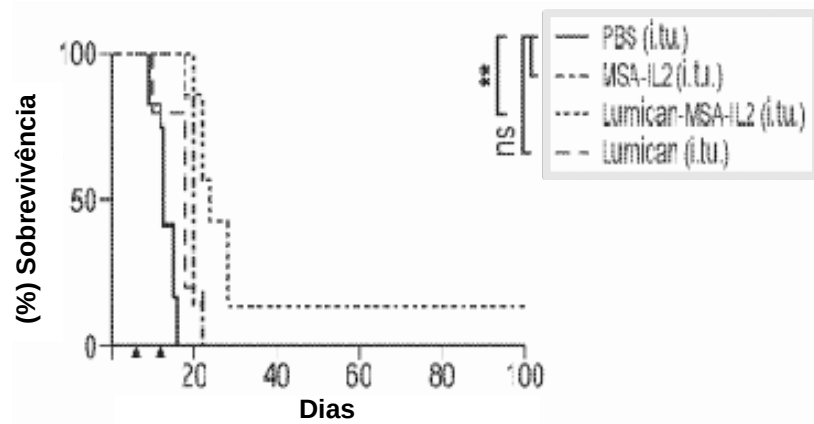


FIG.3A

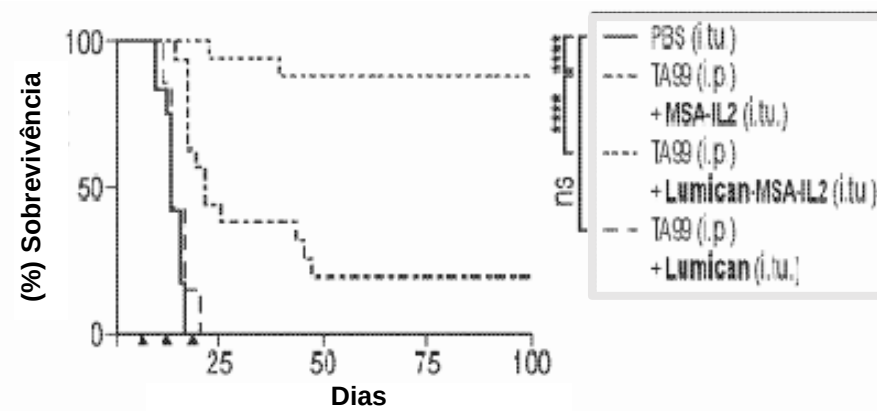


FIG.3B

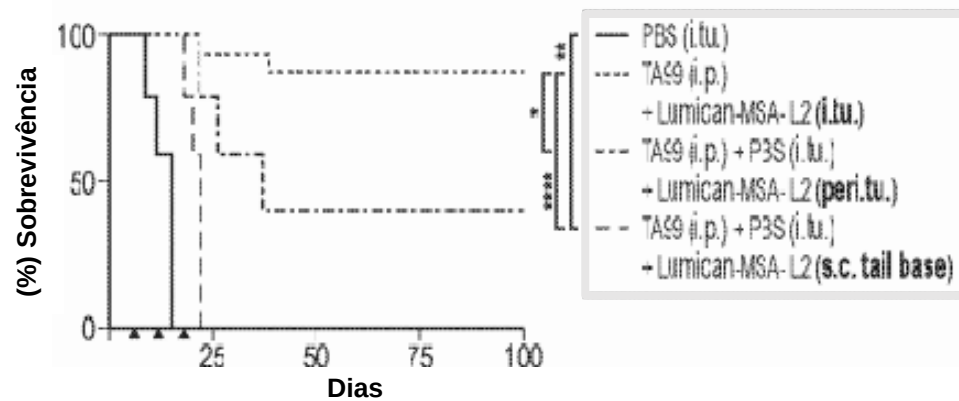


FIG.3C

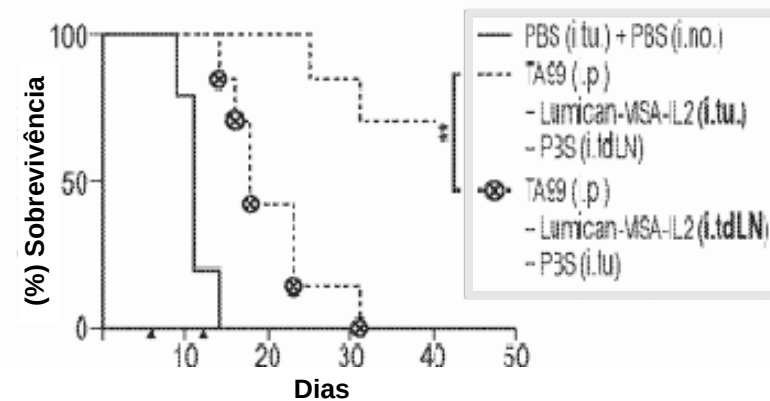


FIG.3D

3/26

3/26

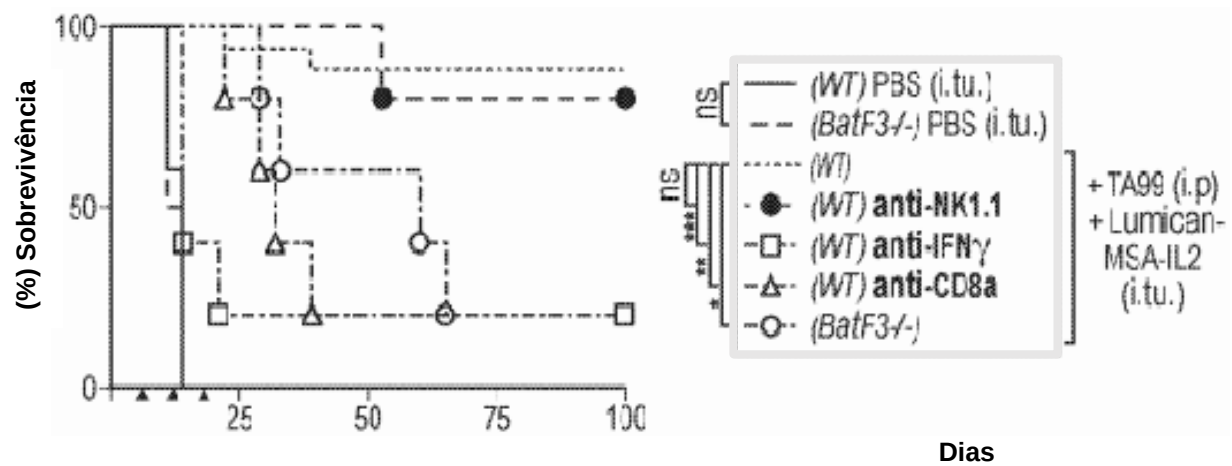


FIG.4

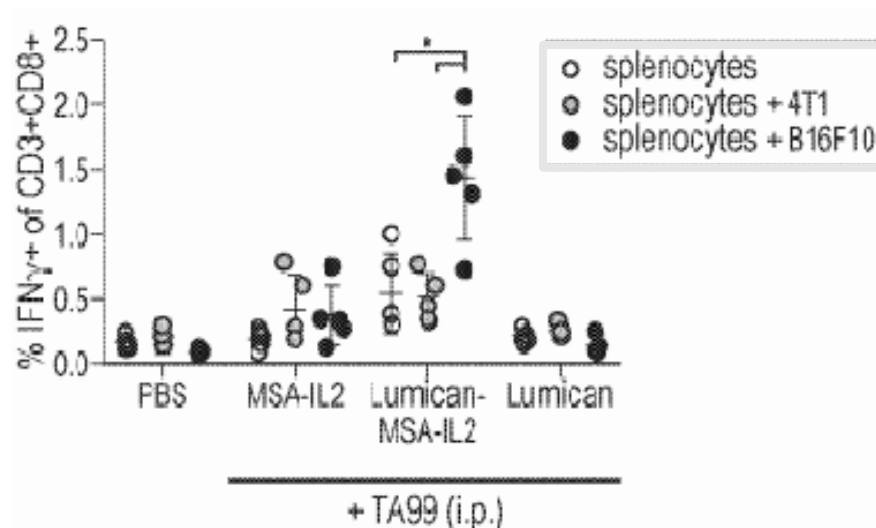


FIG.5A

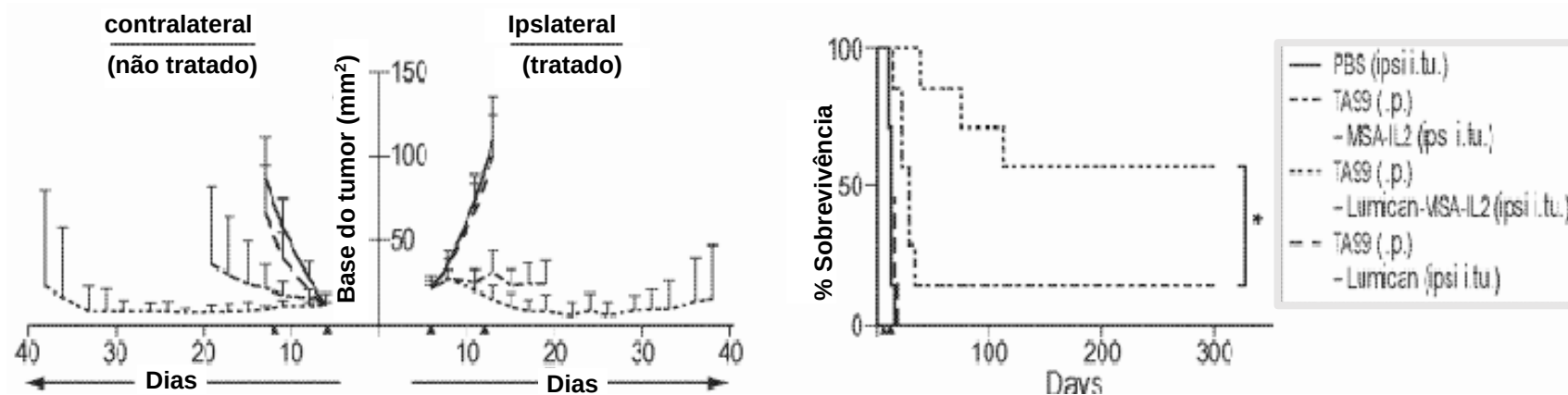


FIG.5B

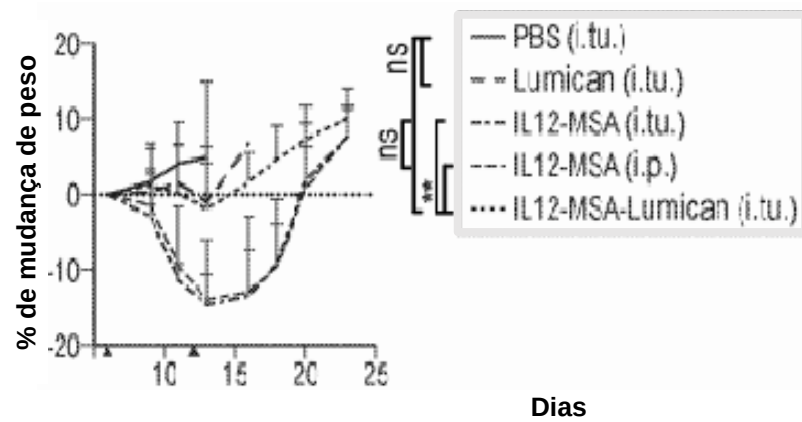


FIG.6A

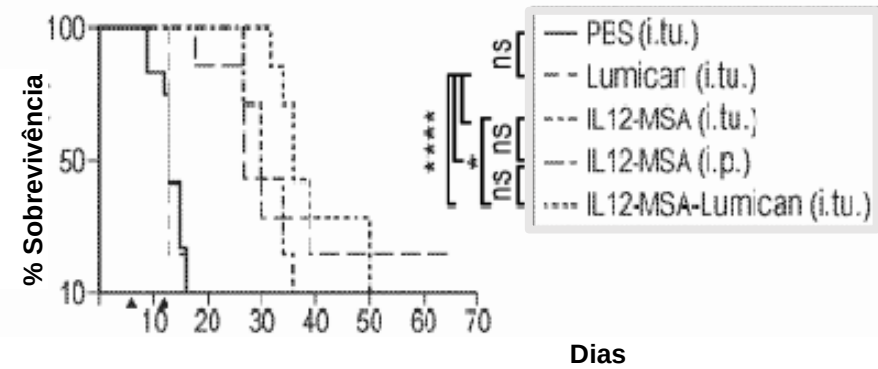


FIG.6B

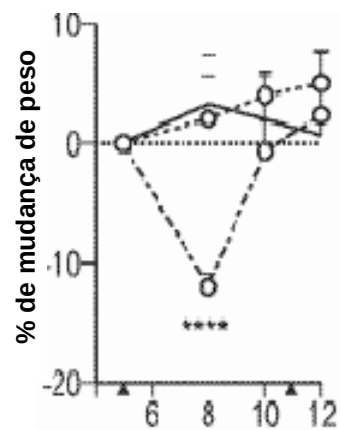


FIG.7A

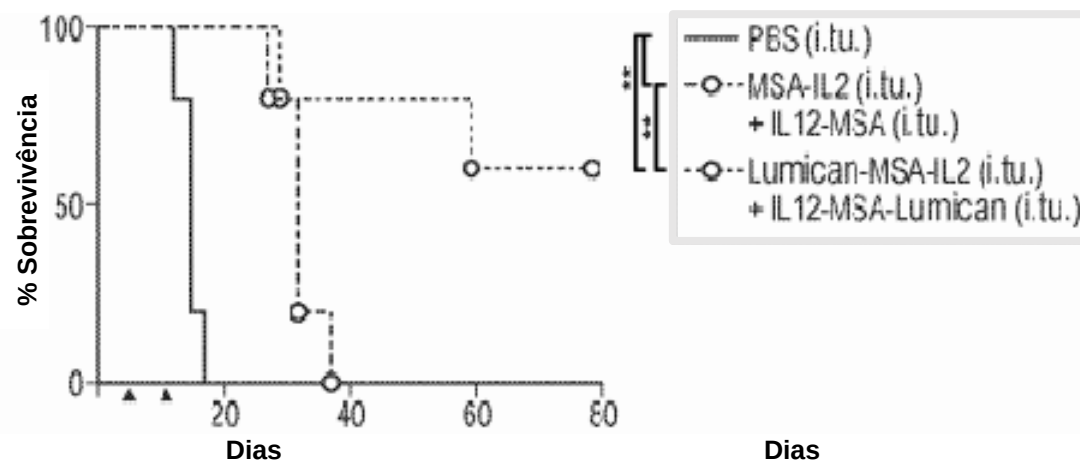


FIG.7B

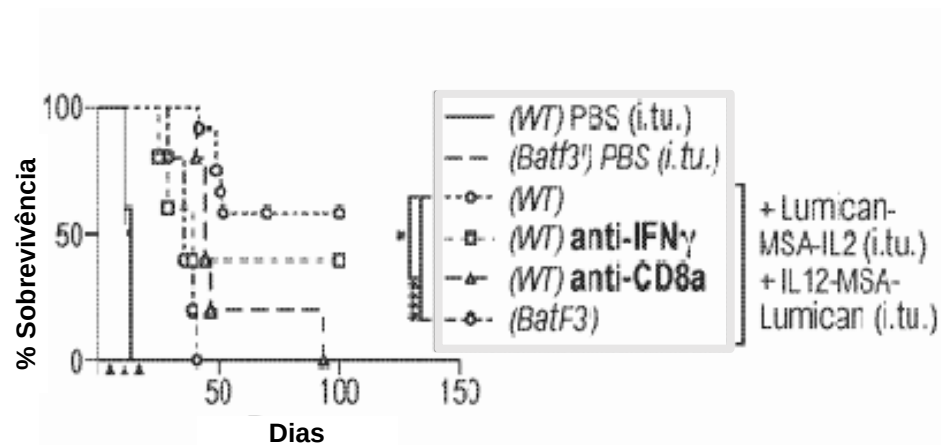


FIG.8A

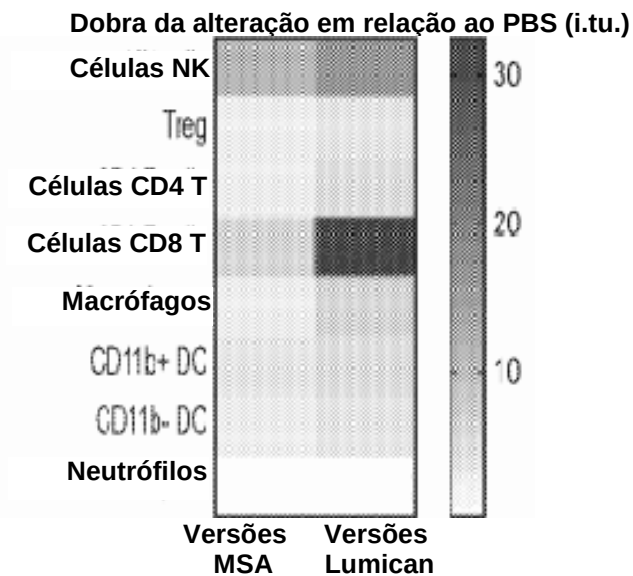


FIG.8C

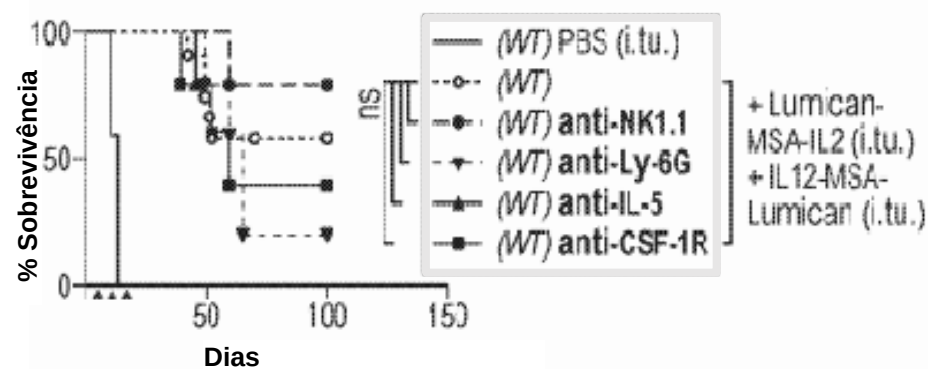


FIG.8B

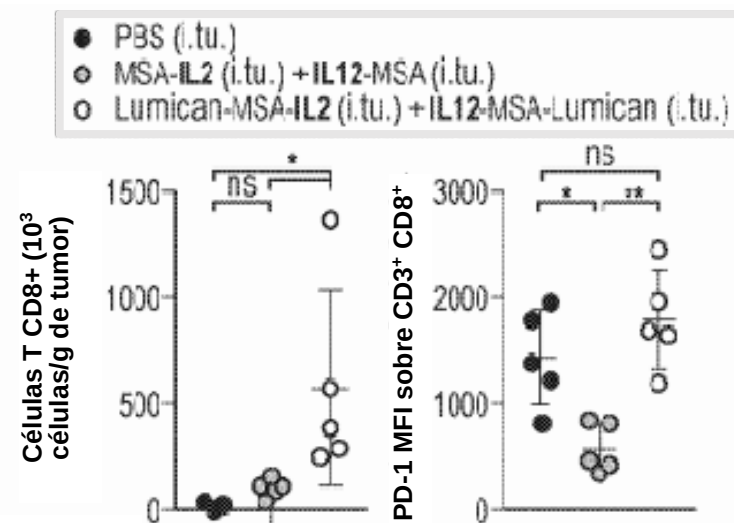


FIG.8D

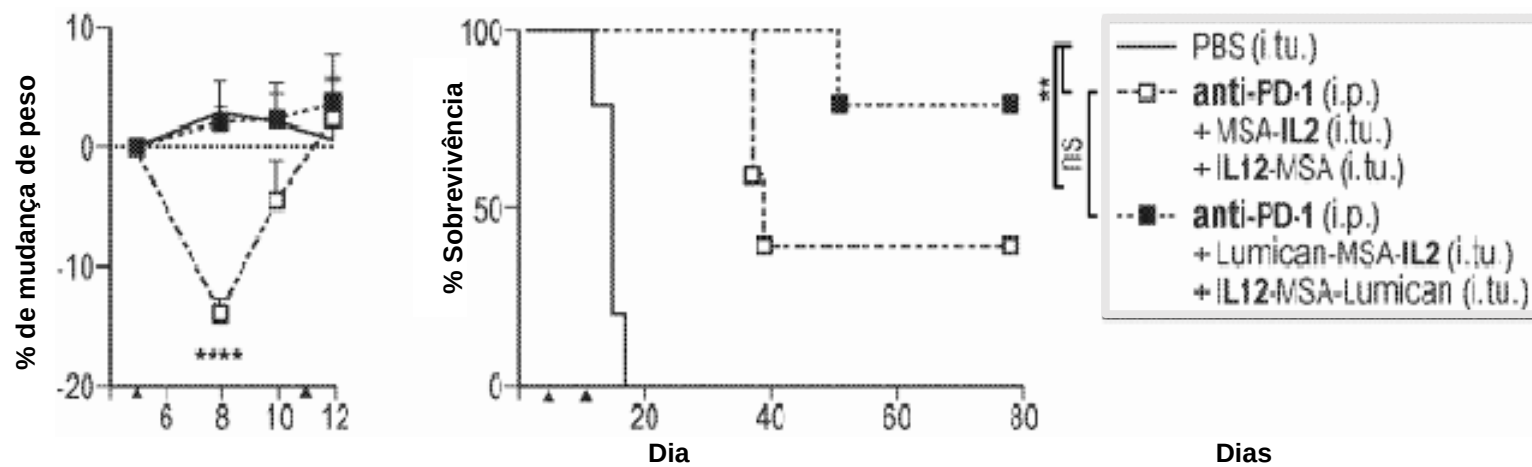


FIG.9

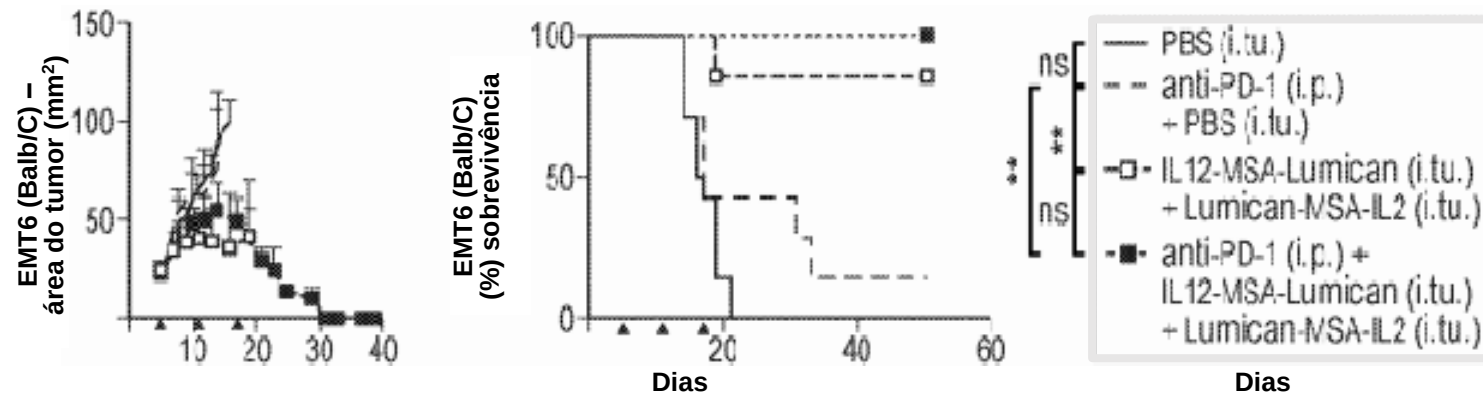


FIG.10A

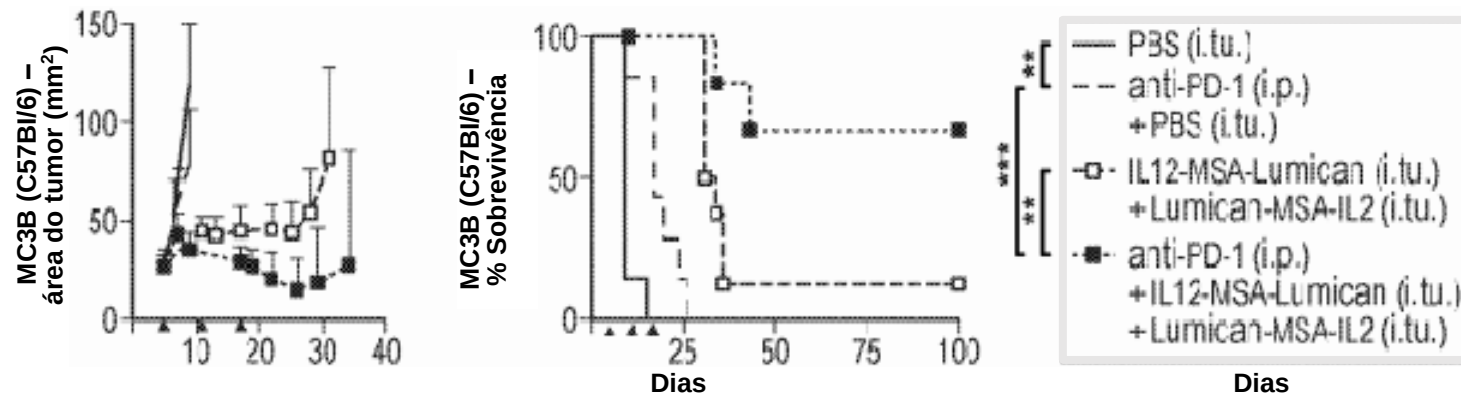


FIG.10B

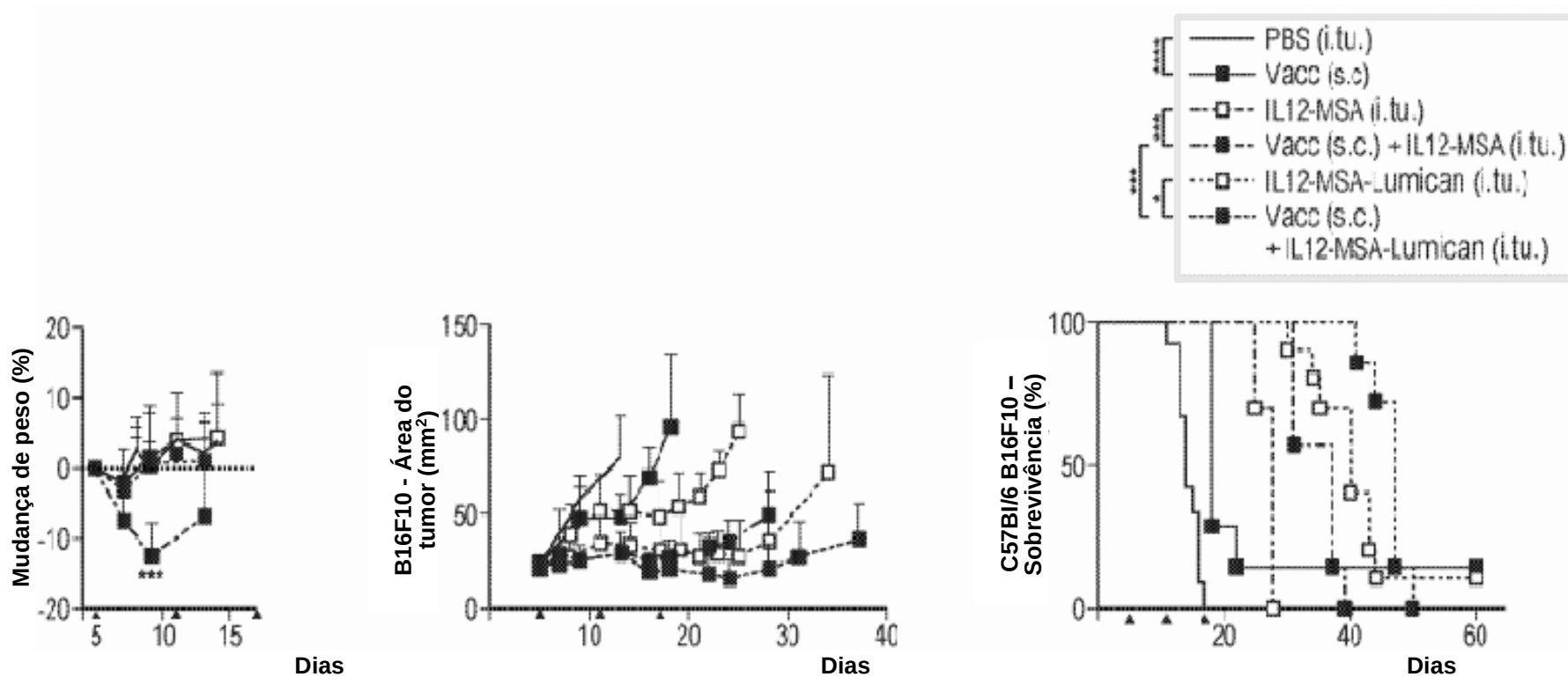


FIG.11

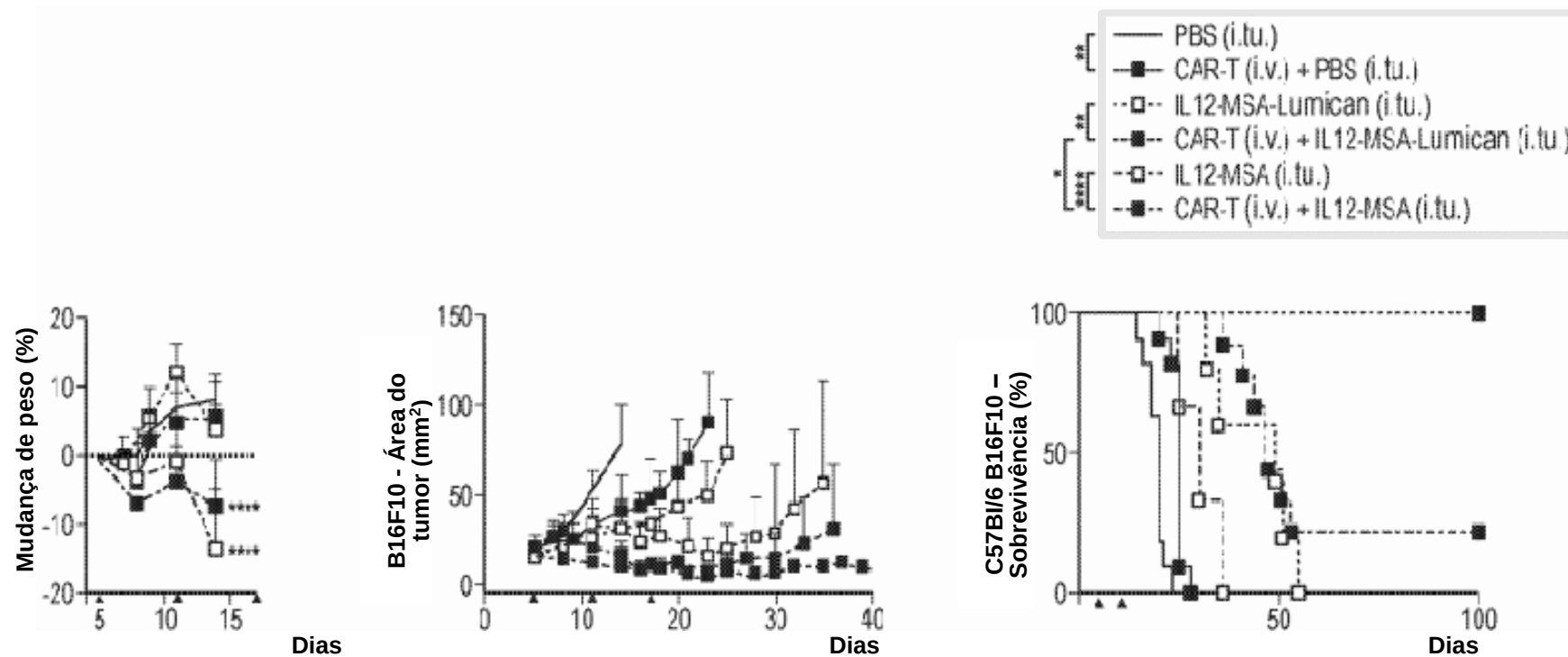


FIG.12

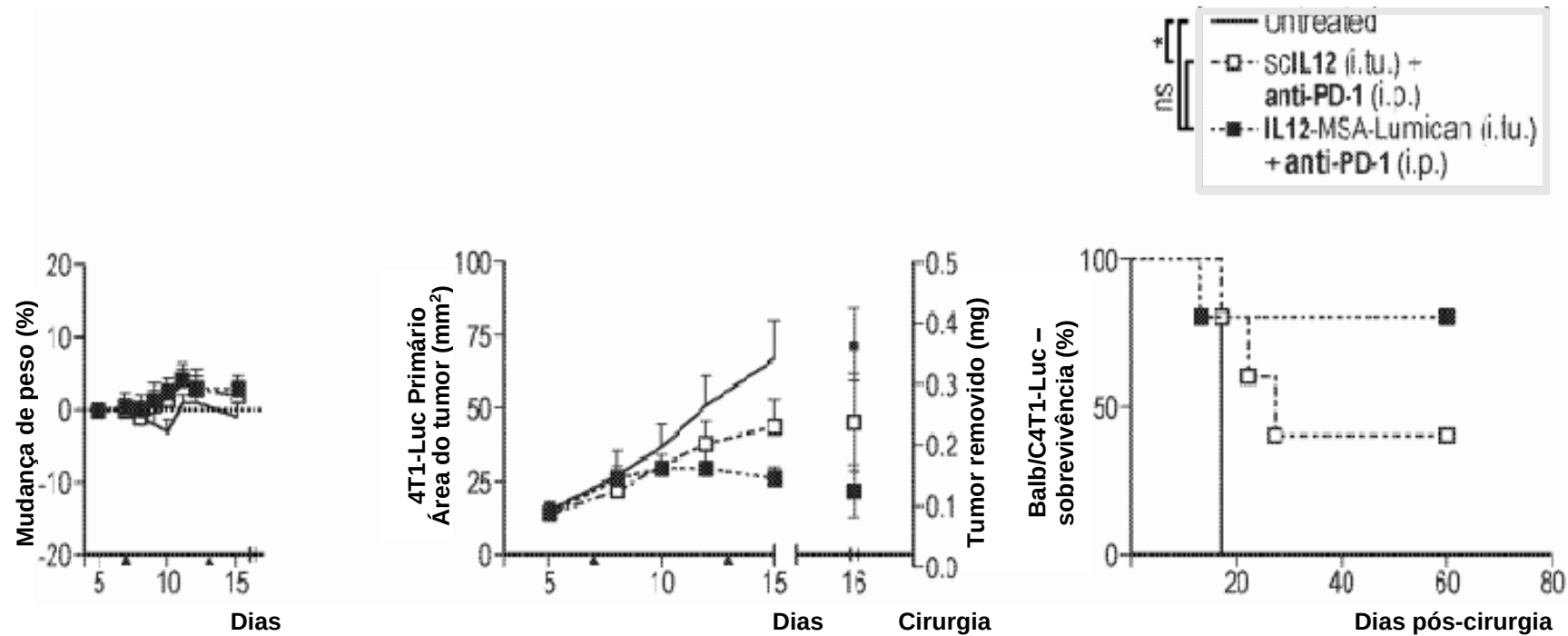


FIG.13

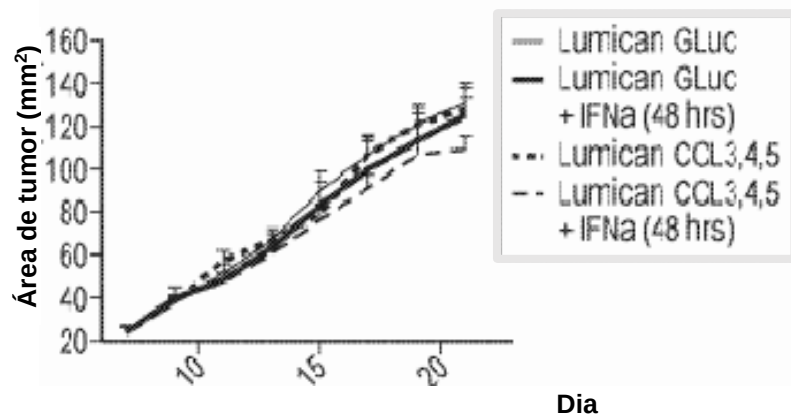


FIG.14A

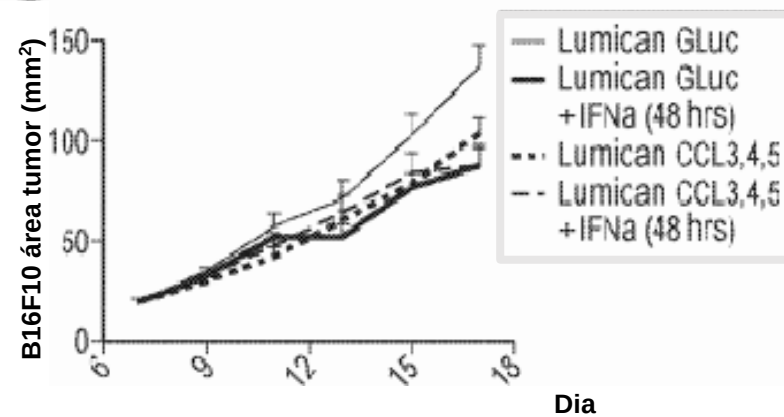


FIG.14B

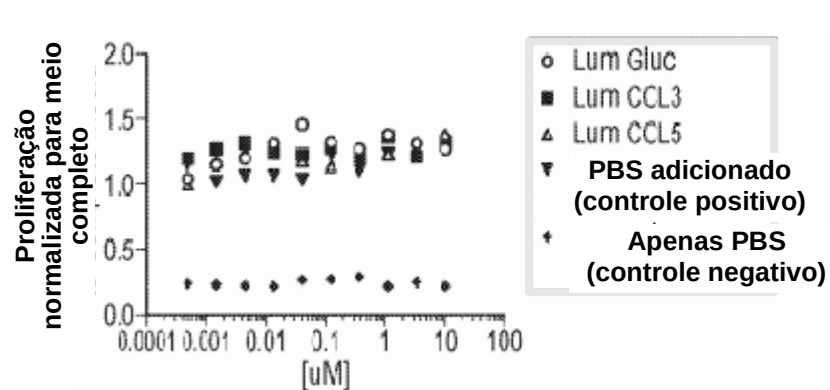


FIG.14C

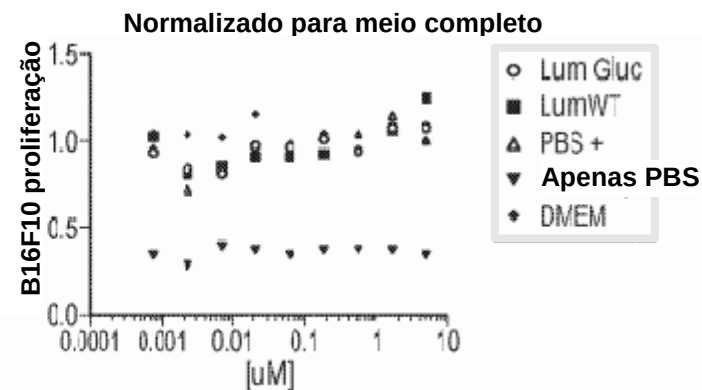


FIG.14D

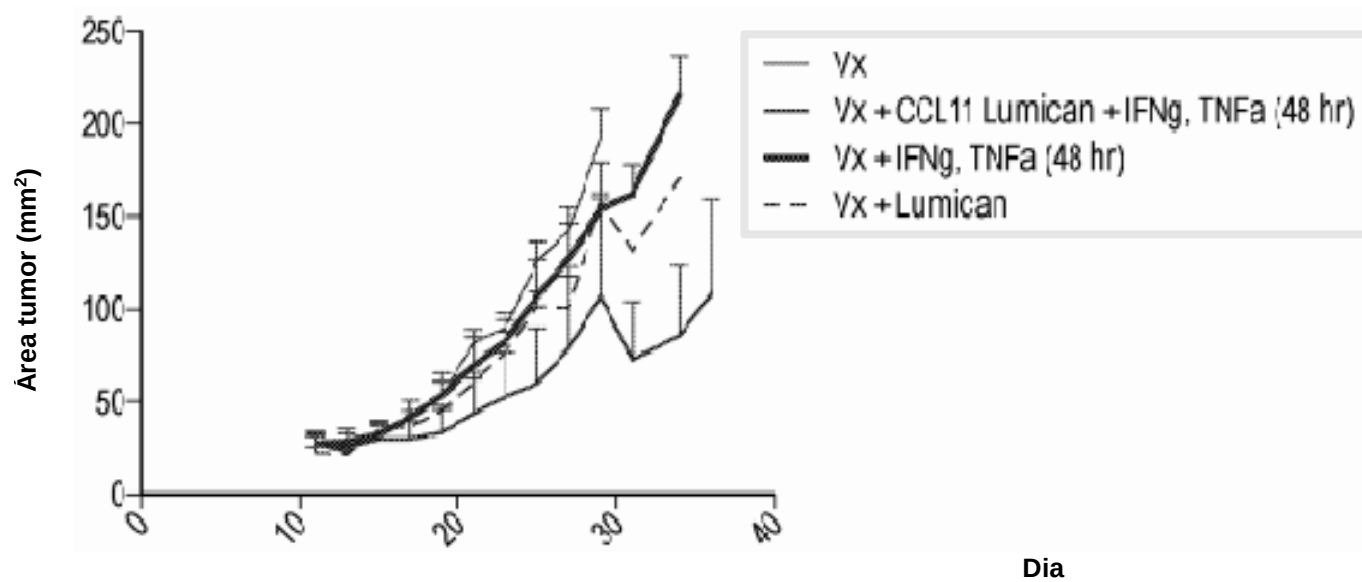


FIG.15

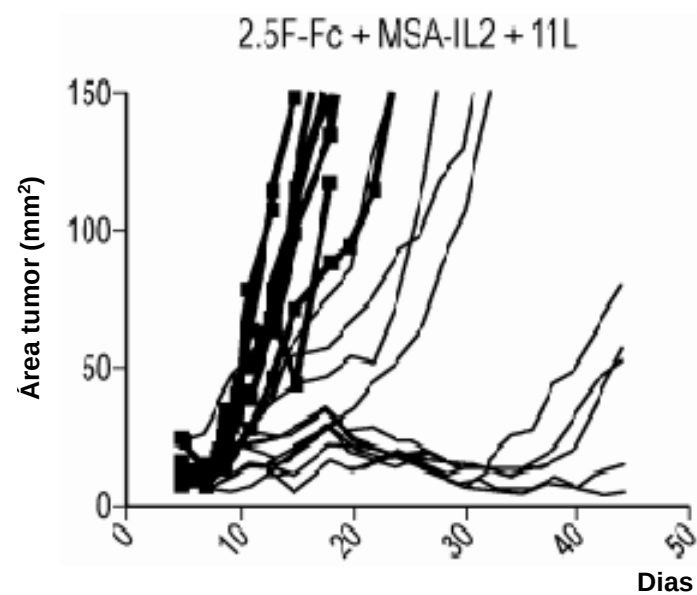


FIG.16A

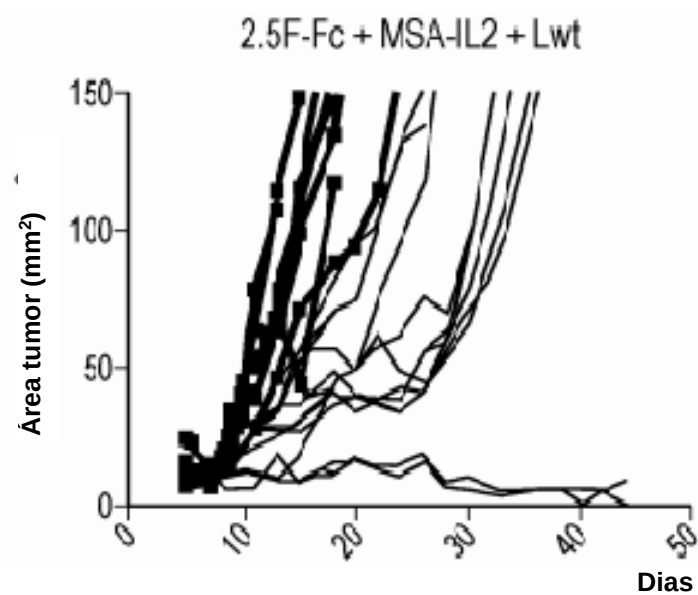


FIG.16B

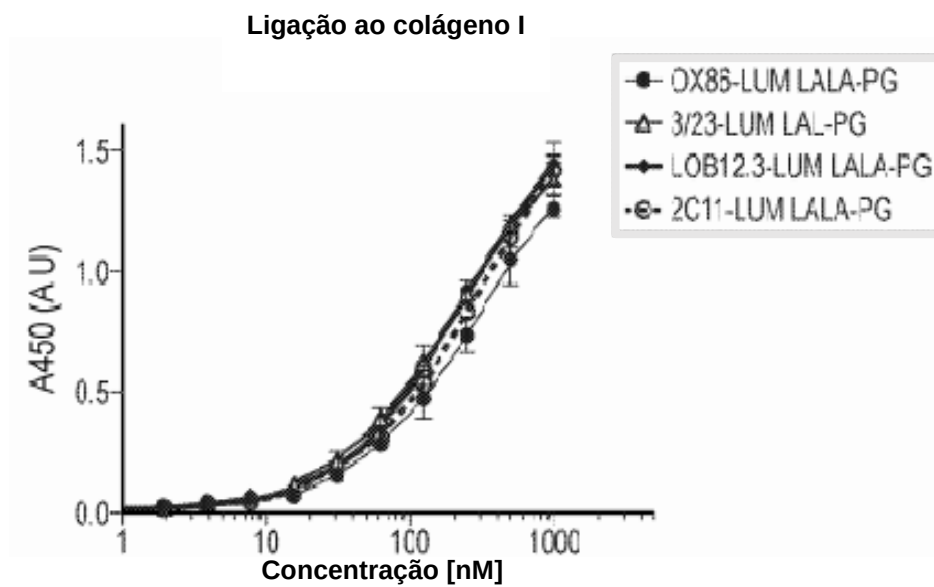


FIG.17A

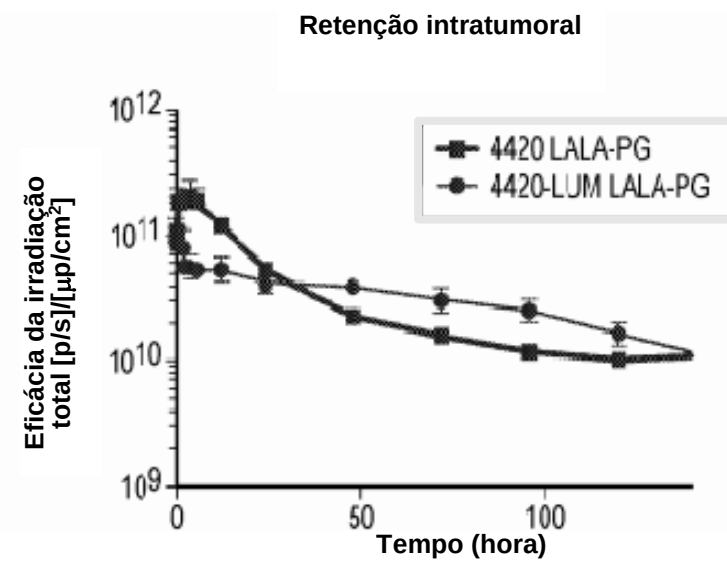


FIG.17B

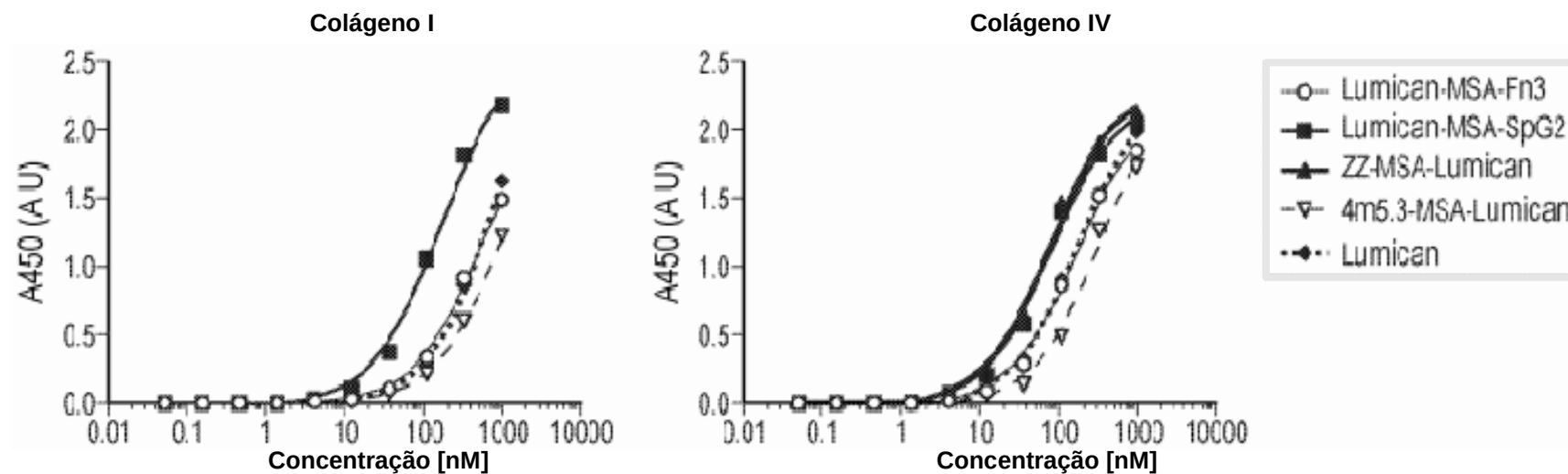


FIG.18A

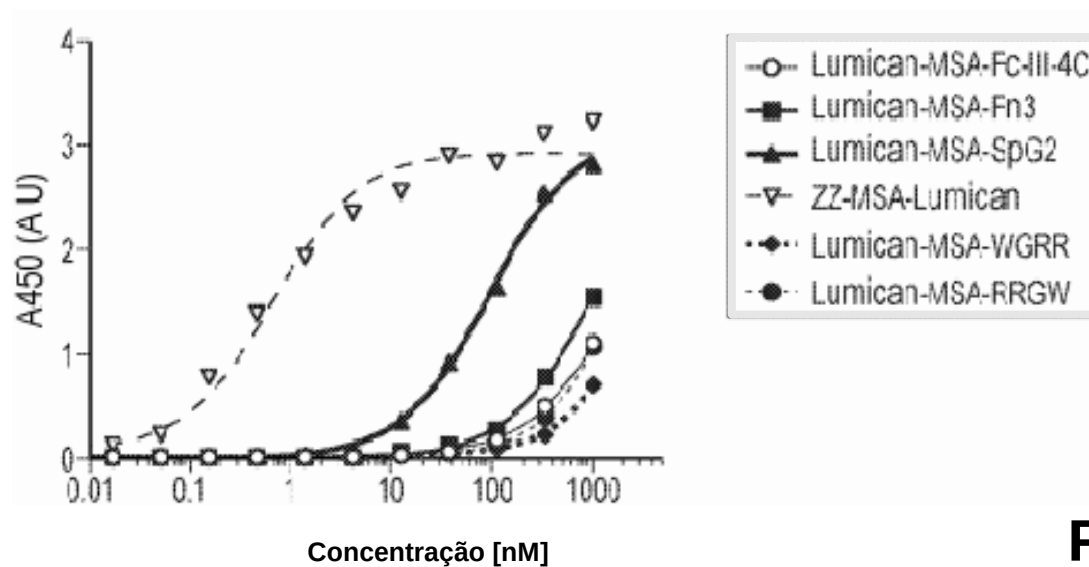
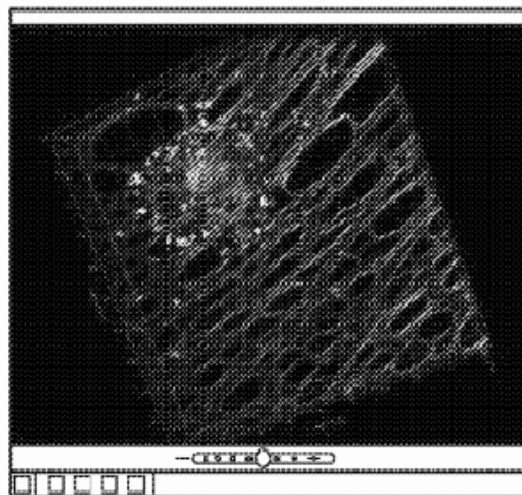
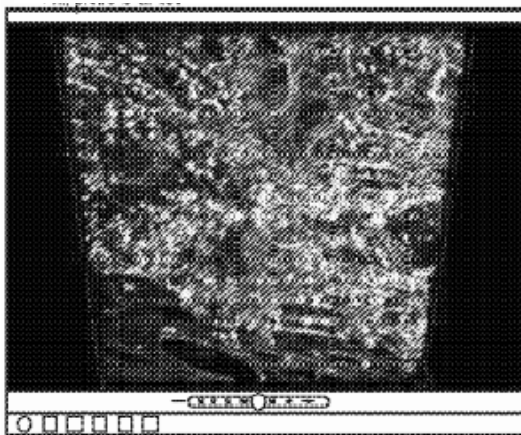


FIG.18B

1 hora, sonda é difusa



24 horas,
tumor
grande

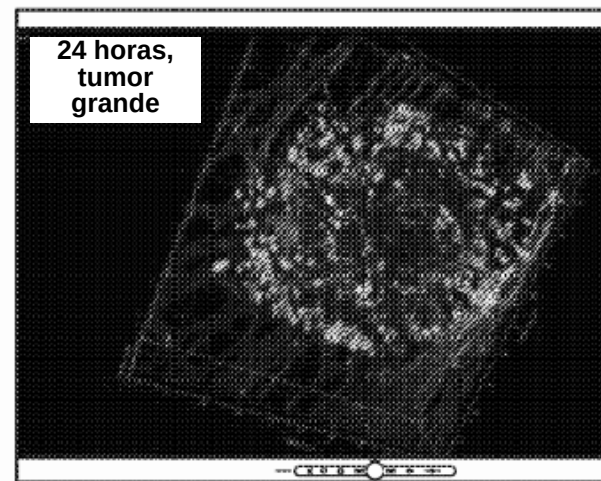


FIG.19

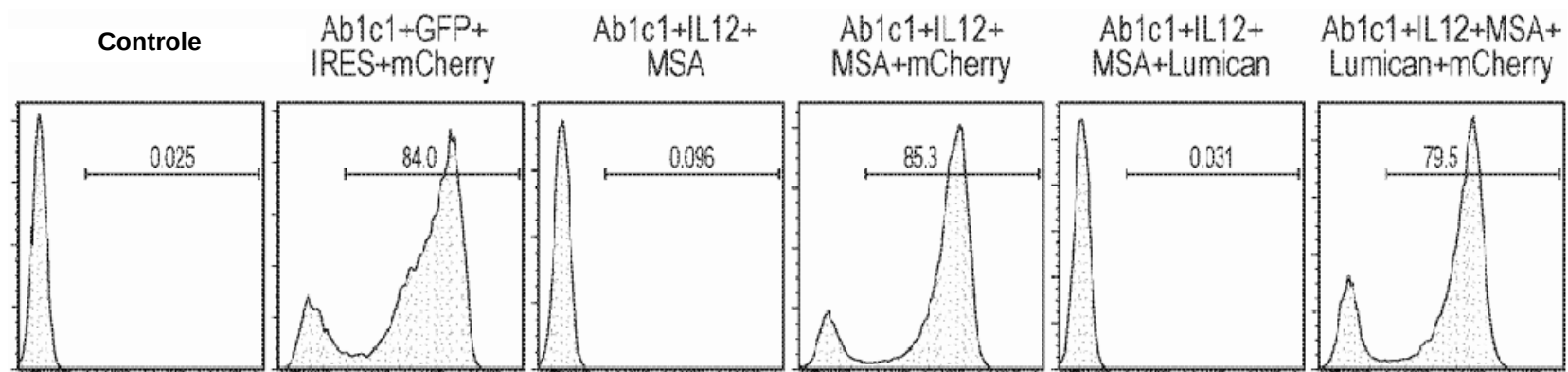


FIG.20A

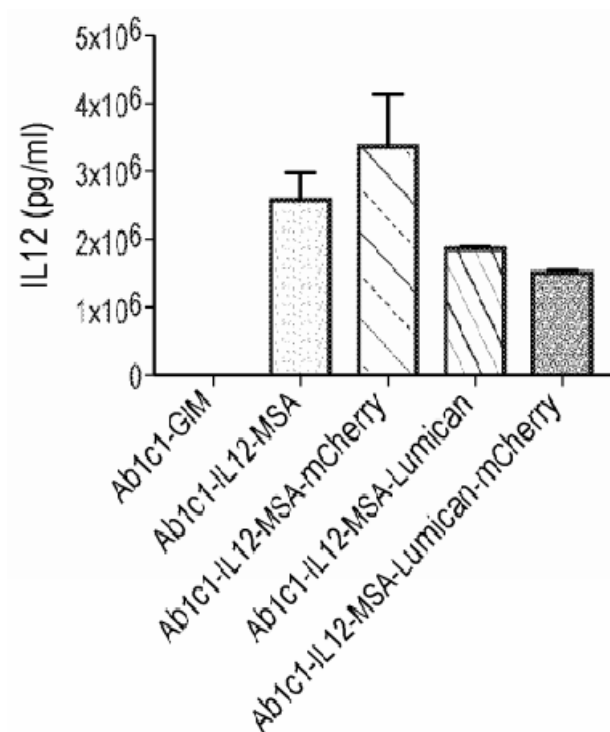


FIG.20B

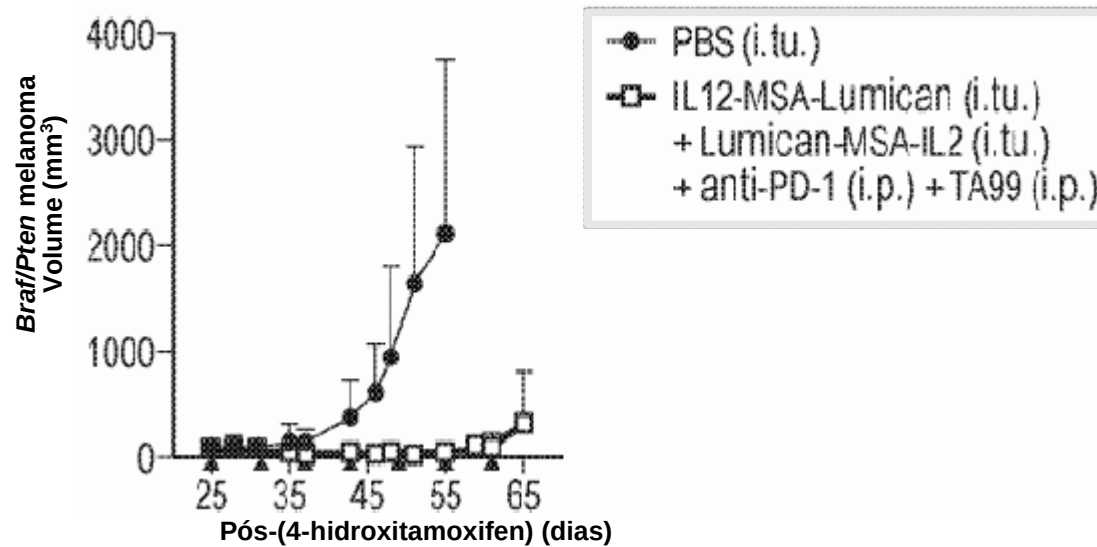


FIG.21A

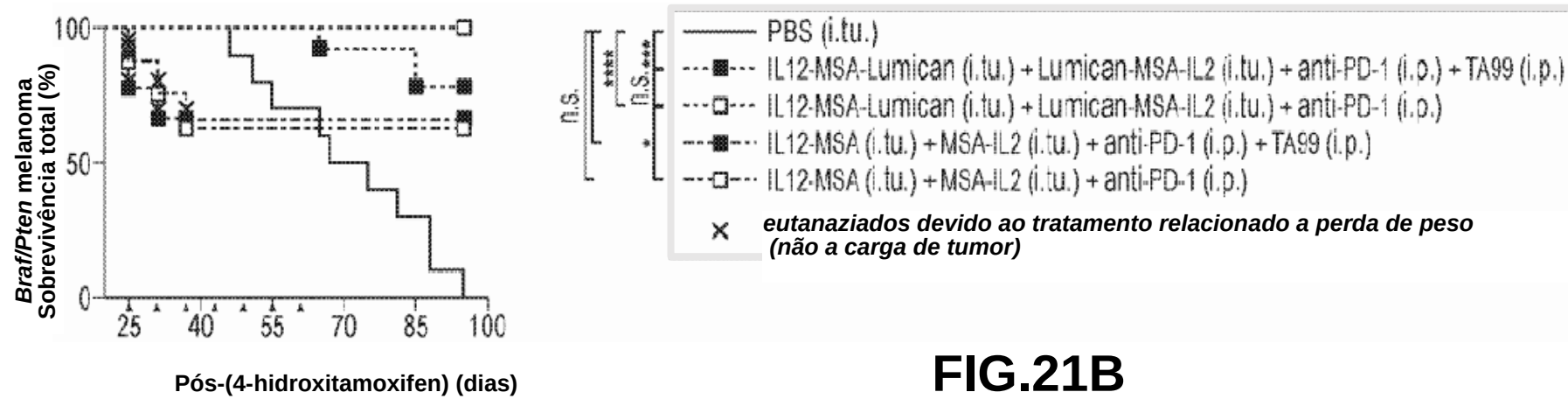


FIG.21B

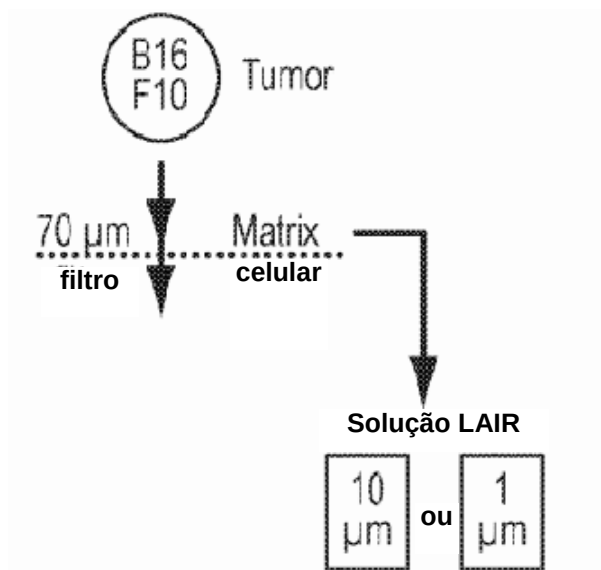


FIG.22A

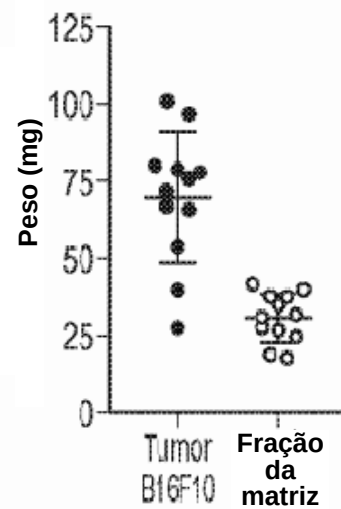


FIG.22B

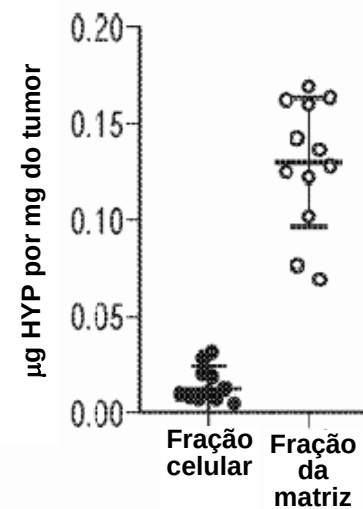


FIG.22C

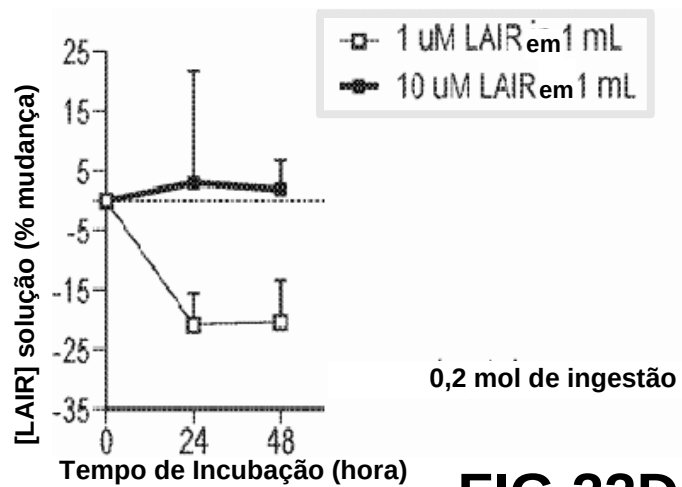


FIG.22D

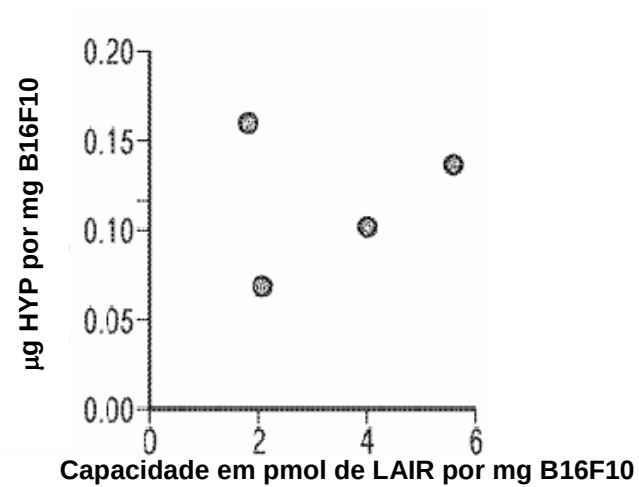


FIG.22E

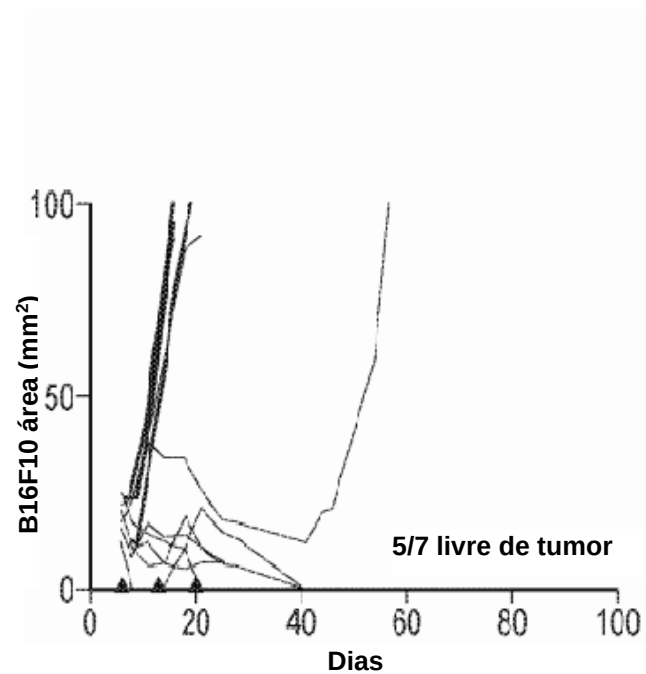


FIG.23A

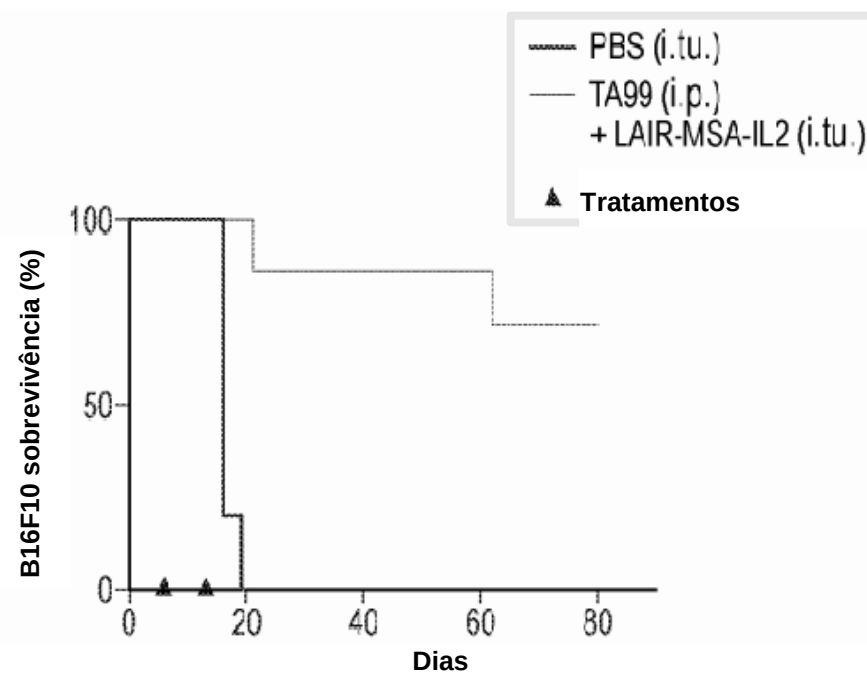


FIG.23B

		27	43 45	49 51
LAIR30.w.A	QEGSLPDITIFPNSSLIM	ISQGTFTV	ACSYSDKHDLYNMVRL	EKGGSFMEKSTE
LAIR30.w.B	QEGSLPDITIFPNSSLIM	ISQGTFTV	VCSYSDKHDLYNMVRL	EKGGSFMEKSTE
LAIR30.w.C	QEGSLPDITIFPNSSLIM	ISQGTFTV	VCSYSDKHDLYNMVRL	EKGGSFMEKSTE
LAIR30.d.D	QEGSLPDITIFPNSSLIM	ISQGTFTV	VCSYSDKHDLYNMVRL	EKGGSFMEKSTE
LAIR	QEGSLPDITIFPNSSLIM	ISQGTFTV	VCSYSDKHDLYNMVRL	EKGGSFMEKSTE
LAIR30.w.A	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSE	RSKTELEKVIKENVIQTFAPGFTSD		
LAIR30.w.B	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSE	RSKTELEKVIKENVIQTFAPGFTSD		
LAIR30.w.C	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSE	RSKTELEKVIKENVIQTFAPGFTSD		
LAIR30.d.D	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSE	RSKTELEKVIKENVIQTFAPGFTSD		
LAIR	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSGITWSE	RSKTELEKVIKENVIQTFAPGFTSD		
LAIR30.w.A	TSWLKTSYI			
LAIR30.w.B	TSWLKTSYI			
LAIR30.w.C	TSWLKTSYI			
LAIR30.d.D	TSWLKTSYI			
LAIR	TSWLKTSYI			

FIG.24A

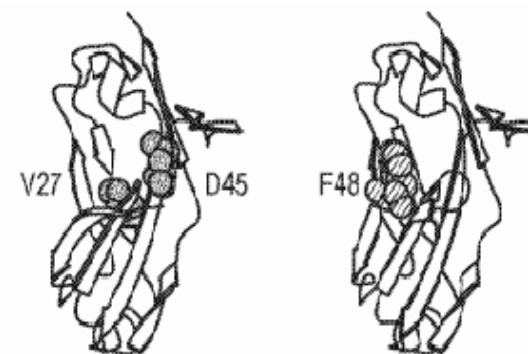


FIG.24B FIG.24C

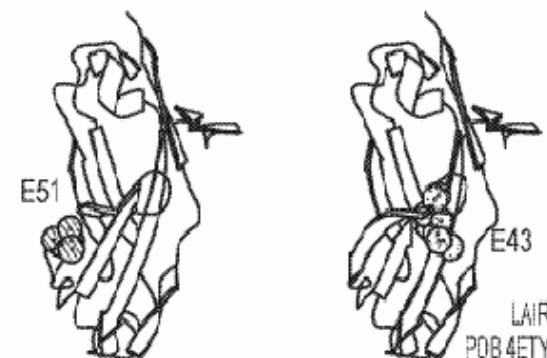


FIG.24D FIG.24E

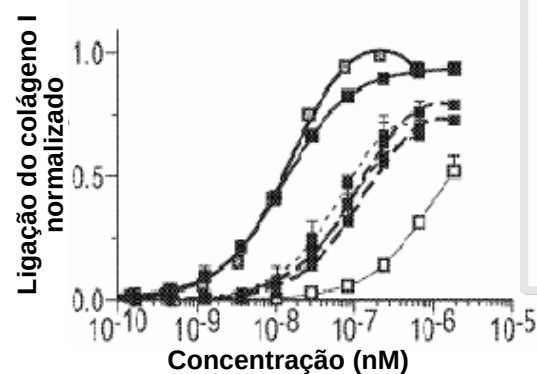


FIG.24F

LAIR30.w.E	QEGSLPDITIFPNSSLM ISQGTFTVWCSYSDKHDLNMMVRLEKDGSTFMEKSTE
LAIR30.w.F	QEGSLPDITIFPNSSLM ISQGTFTVWCSYSDKHDLNMMVRLEKDGSTFMEKSTE
LAIR	QEGSLPDITIFPNSSLM ISQGTFTVWCSYSDKHDLNMMVRLEKDGSTFMEKSTE
	63 90
LAIR30.w.E	PYKTEDELEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSESSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD
LAIR30.w.F	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSESAKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD
LAIR	PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSESSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD
LAIR30.w.E	TSWLKTYSIY
LAIR30.w.F	TSWLKTYSIY
LAIR	TSWLKTYSIY

FIG.25A

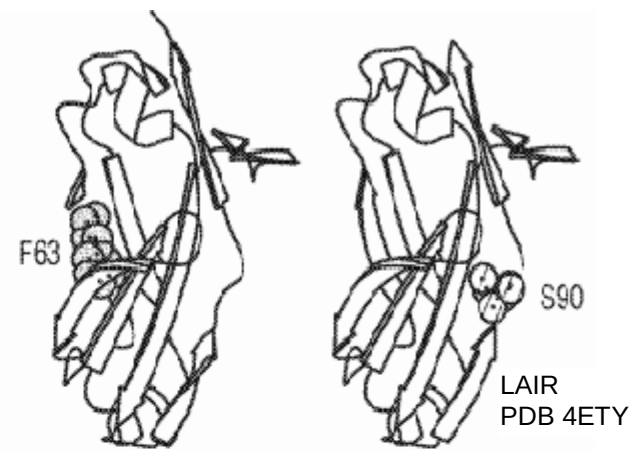


FIG.25B

FIG.25C

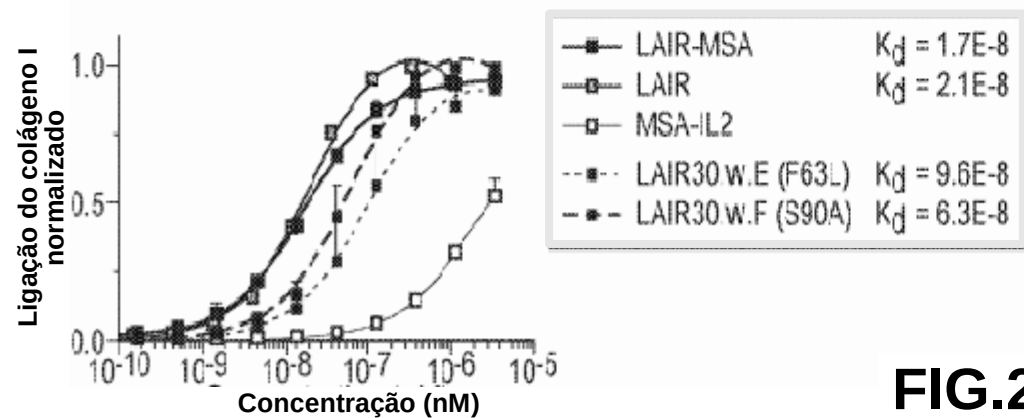


FIG.25D

LAIR30.2.K1.B
LAIR

17
QEGSLPDITIFPNSSLV ISQGTFTVVCSSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTA
QEGSLPDITIFPNSSL ISQGTFTVVCSSYSDKHDLYNMVRLEKDGSTFMEKSTE

LAIR30.2.K1.B
LAIR

PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD
PYKTEDEFEIGPVNETITGHYSCIYSKGITWSERSKTLELKVIKENVIQTPAPGPTSD

115
LAIR30.2.K1.B
LAIR

TLWLKTYSIY
TSWLKTYSIY

FIG.26A

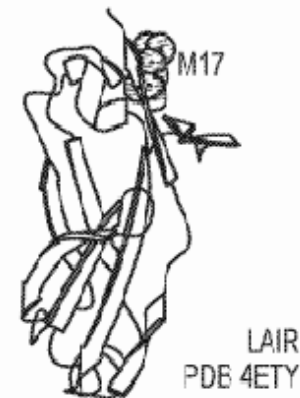


FIG.26B

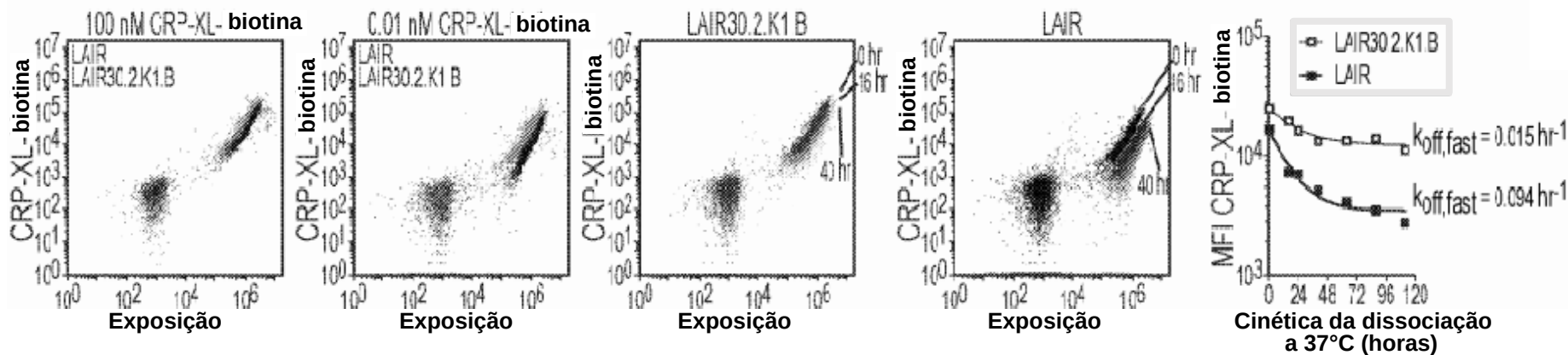


FIG.26C

FIG.26D

FIG.26E

FIG.26F

FIG.26G

RESUMO

"PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, ÁCIDO NUCLEICO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA, MÉTODO PARA ATIVAR, AUMENTAR OU PROMOVER UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA INIBIR, REDUZIR OU SUPRIMIR UMA RESPOSTA POR UMA CÉLULA IMUNE EM UM SUJEITO, MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER EM UM SUJEITO, KIT, USO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO IMUNOMODULADORA E MÉTODO PARA REDUZIR OU INIBIR O CRESCIMENTO DO TUMOR OU TRATAR O CÂNCER EM UM SUJEITO"

A presente divulgação fornece proteínas de fusão imunomoduladoras compreendendo um domínio de ligação ao colágeno operacionalmente ligado a um domínio imunomodulador. A divulgação também apresenta composições e métodos de uso das mesmas, por exemplo, para tratar o câncer.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: MASSA004.txt
- Data de Geração do Código: 09/03/2021
- Hora de Geração do Código: 08:40:38
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1684B0942540D65B
 - Campo 2: 504BD22CB10530A5