



(21) BR 112019017298-0 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 7 2 9 8 A 2 *

(22) Data do Depósito: 27/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

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

(54) Título: PROTEÍNAS QUIMÉRICAS À BASE DE TIGIT E LIGHT

(51) Int. Cl.: A61K 38/17; A61K 38/19; C07K 14/525.

(30) Prioridade Unionista: 27/02/2017 US 62/464.002.

(71) Depositante(es): SHATTUCK LABS, INC..

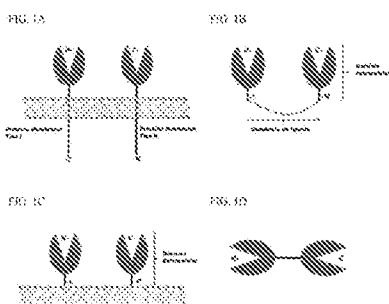
(72) Inventor(es): TAYLOR SCHREIBER; GEORGE FROMM; SURESH DE SILVA.

(86) Pedido PCT: PCT US2018020037 de 27/02/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/157162 de 30/08/2018

(85) Data da Fase Nacional: 20/08/2019

(57) Resumo: A presente invenção se refere, inter alia, a composições e métodos, incluindo proteínas quiméricas à base de TIGIT e LIGHT, que encontram uso no tratamento de doenças, tais como câncer e uma doença inflamatória.



“PROTEÍNAS QUIMÉRICAS À BASE DE TIGIT E LIGHT”

PRIORIDADE

[001] Este pedido reivindica o benefício e a prioridade do Pedido Provisório US 62/464.002, depositado em 27 de fevereiro de 2017, cujo conteúdo é incorporado ao presente pela referência em sua totalidade.

DESCRICAÇÃO DO ARQUIVO DE TEXTO ENVIADO ELETRONICAMENTE

[002] Este aplicativo contém uma listagem de sequências. Foi submetido eletronicamente via EFS-Web como um arquivo de texto ASCII intitulado “SHK-001PC1_SequenceListing_ST25”. A listagem de sequências tem 141.613 bytes de tamanho e foi criada em 27 de fevereiro de 2018 ou aproximadamente. A listagem de sequências é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

[003] A presente invenção se refere a composições e métodos *inter alia*, incluindo proteínas quiméricas que encontram uso no tratamento de doenças, tais como imunoterapias para câncer e autoimunidade.

FUNDAMENTOS

[004] O sistema imunológico é central para a resposta do corpo a entidades estrangeiras que podem causar doenças. No entanto, muitos cânceres desenvolveram mecanismos para evitar o sistema imunológico, por exemplo, distribuindo ou propagando sinais inibitórios imunes. Assim, permanece a necessidade de desenvolver terapêuticas que sejam dotadas de múltiplas funcionalidades - por exemplo, invertendo o sinal imunoinibitório e estimulando uma resposta imune anticâncer.

SUMÁRIO

[005] Por conseguinte, em vários aspectos, a presente invenção proporciona composições e métodos que são úteis para imunoterapia de câncer. Por exemplo, a presente invenção, em partes, se refere a proteínas quiméricas específicas que invertem ou suprimem sinais inibitórios imunes

enquanto fornecem sinais de ativação ou coestimulatórios imunes. Importante, *inter alia*, a presente invenção proporciona proteínas químéricas melhoradas que podem manter um estado multimérico estável e reproduzível com base na, sem pretender estar ligado pela teoria, estabilização numa região de ligante incluindo uma ou mais ligações dissulfeto. Por conseguinte, as presentes composições e métodos ultrapassam várias deficiências na produção de agentes bi-específicos.

[006] Em alguns aspectos, a proteína químérica é de uma estrutura geral de: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, onde (a) é um primeiro domínio que comprehende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, (b) é um ligante comprendendo, pelo menos, um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto (incluindo, sem limitação, dobradiça-CH₂-CH₃ domínio Fc é derivado de IgG4 humana), e (c) é um segundo domínio que comprehende um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, em que o ligante liga o primeiro domínio e o segundo domínio e, opcionalmente, comprehende um ou mais ligantes de junção, tal como aqui descrito.

[007] Por exemplo, em modalidades, o domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I é de TIGIT (VSIG9, VSTM3).

[008] Em modalidades, a proteína químérica é de uma estrutura geral de: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, onde (a) é um primeiro domínio que comprehende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, a proteína transmembranar sendo TIGIT, (b) é um ligante comprendendo, pelo menos, um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto (incluindo, sem limitação, dobradiça-CH₂-CH₃ domínio Fc é derivado de IgG4 humana), e (c) é um segundo domínio comprehendendo um domínio extracelular da proteína transmembranar sendo selecionada de 4-1BBL (TNFSF9), GITRL (TNFSF18), TL1A (TNFSF15), e LIGHT (TNFSF14), em que o ligante liga o primeiro

domínio e o segundo domínio e, opcionalmente, compreende um ou mais ligantes de junção como aqui descrito.

[009] Por exemplo, em modalidades, o domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II é de LIGHT.

[0010] Em algumas modalidades, a proteína quimérica é de uma estrutura geral de: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, onde (a) é um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, a proteína transmembranar sendo selecionada de PD-1, CD172a (SIRP α) e TIGIT, (b) é um ligante compreendendo, pelo menos, um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto (incluindo, sem limitação, dobradiça-CH₂-CH₃ domínio Fc é derivado de IgG4 humana), e (c) é um segundo domínio que compreende um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar sendo LIGHT, em que o ligante liga o primeiro domínio e o segundo domínio e, opcionalmente, compreende um ou mais ligantes de junção, tal como aqui descrito.

[0011] Em alguns aspectos, é proporcionado um método para tratar câncer ou uma doença inflamatória compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica das proteínas químéricas acima mencionadas. Em modalidades, as células T do sujeito são ativadas quando ligadas pelo segundo domínio da proteína químérica e (a) one ou more tumor cells are prevented from transmitting an immunosuppressive signal when bound by the first domain of the chimeric protein, (b) uma resposta quantificável de citocinas no sangue periférico do sujeito é alcançada, e/ou (c) o crescimento do tumor é reduzido no sujeito com necessidade do mesmo, em comparação com um indivíduo tratado com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou os seus respectivos ligandos ou receptores. Em modalidades, o método estimula a sinalização de um ou mais de LIGHT, 4-1BBL, GITRL e TL1A e ativa células apresentadoras de抗ígenos. Em modalidades, o método reduz a quantidade ou atividade de

células T regulatórias (Tregs) em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos tratados com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou os seus respectivos ligandos ou receptores. Em modalidades, o método aumenta a iniciação de células T efetoras na drenagem de nódulos linfáticos do sujeito, em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos tratados com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou os seus respectivos ligandos ou receptores. Em modalidades, o método causa uma diminuição global em células imunossupressoras e uma mudança para um ambiente mais inflamatório do tumor, em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos tratados com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou seus respectivos ligandos ou receptores.

[0012] Qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita pode ser combinada com qualquer outro aspecto ou modalidade, como aqui divulgado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] As **FIG. 1A** a **FIG. 1D** mostram ilustrações esquemáticas de como uma proteína membranar Tipo I e Tipo II (**FIG. 1A** e **FIG. 1C**) pode ser engenheirada com domínios transmembranares e intracelulares removidos e ligados usando uma sequência de ligante (**FIG. 1B**) para gerar uma única proteína quimérica em que os domínios extracelulares das proteínas membranares Tipo I e Tipo II, cada um, está voltado para fora em uma única proteína quimérica. A **FIG. 1B** representa a ligação de uma proteína membranar Tipo I e Tipo II por remoção dos domínios transmembranares e intracelulares de cada proteína, e onde os domínios extracelulares liberados (ECD) de cada proteína foram unidos por uma sequência de ligante. O ECD nesta descrição pode incluir toda a sequência de aminoácidos de uma proteína candidata Tipo I ou Tipo II que está tipicamente localizada fora da membrana celular, ou qualquer porção desta que retém a ligação ao receptor ou ligando pretendido. A **FIG. 1D** representa domínios extracelulares adjuntos num construto linear em que o domínio extracelular da

proteína membranar Tipo I está voltado para o lado "esquerdo" do construto e o domínio extracelular da proteína membranar Tipo II está voltado para o lado "direito" do construto.

[0014] **A FIG. 2A**, usando uma proteína quimérica PD-1-Fc-OX40L como um exemplo, mostra que as células tumorais podem expressar PD-L1 na superfície celular, que pode se ligar a PD-1 expressa por uma célula T (**FIG. 2B**). Essa interação suprime a ativação de células T. Uma proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de PD-1, ligado ao domínio extracelular de OX40L pode se ligar a PD-L1 na superfície de uma célula tumoral, impedindo a ligação a PD-1 na superfície de uma célula T (**FIG. 2C**). A proteína quimérica pode então "balançar" a partir da superfície da célula tumoral, e a porção OX40L da proteína quimérica pode então se ligar a OX40 expressa na superfície da célula T. Isso resultaria na substituição de um sinal PD-L1 inibitório por um sinal OX40L coestimulatório para aumentar a atividade antitumoral das células T. **A FIG. 2D** mostra uma sinapse que se formou por uma proteína quimérica entre uma célula tumoral e uma célula T. **As FIG. 2A a FIG. 2C** ilustram os mecanismos através dos quais uma proteína quimérica PD-1-Fc-OX40L se liga às suas moléculas alvo para criar uma sinapse entre as células; assim, PD-1-Fc-OX40L é ilustrativo do mecanismo através do qual as proteínas químéricas da presente invenção operam.

[0015] **A FIG. 3A** mostra Western blots de proteínas químéricas TIGIT-Fc-OX40L murinas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação N+O e/ou após ebullição.

[0016] **A FIG. 3B** mostra Western blots de proteínas químéricas TIGIT-Fc-OX40L humanas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação N+O, e/ou após ebullição. Em ambos os casos, a detecção específica de cada domínio é indicada pelos blots anti-TIGIT, anti-Fc e anti-OX40L.

[0017] **A FIG. 4A** são gráficos mostrando ELISAs de

proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L murinas realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda superior), CD155/PVR-His capturada e detectada com IgG (direita superior), OX40-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mOX40L (esquerda inferior) e OX40-Fc capturada e detectada com um CD155 recombinante (direita inferior).

[0018] A **FIG. 4B** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L humanas realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda superior), CD155/PVR-His capturada e detectada com IgG (direita inferior), OX40-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mOX40L (esquerda inferior) e OX40-Fc capturada e detectada com uma proteína CD155, CD112 ou CD113 recombinante (direita inferior).

[0019] A **FIG. 5A** mostra linhagens celulares geradas para sobre-expressar PVR humana (CHOK1/PVR), que pode ser utilizada para detectar ligação através de um construto contendo TIGIT (na **FIG. 5A**, não manchado e isotipo estão sobrepostos).

[0020] A **FIG. 5B** mostra linhagens celulares geradas para sobre-expressar Nectinaa-2 (CHOK1/Nectinaa2), que podem ser utilizadas para detectar ligação através de um construto contendo TIGIT.

[0021] A **FIG. 5C** mostra linhagens celulares geradas para sobre-expressar Nectinaa-3 (CHOK1/Nectinaa3), que podem ser utilizadas para detectar ligação através de um construto contendo TIGIT (na **FIG. 5C**, não manchado, isotipo e detecção Ab estão sobrepostos).

[0022] A **FIG. 6** são gráficos que mostram a ligação de TIGIT-Fc-OX40L e camundongo a células CHO-K1 que expressam PVR de camundongo (esquerda superior), às células CHO-K1 parentais que não têm PVR (esquerda inferior) ou a células CHO-K1 que expressam OX40 de camundongo (direita).

[0023] A **FIG. 7** é uma tabela de resultados que

mostram os parceiros de ligação identificados de TIGIT-Fc-OX40L humana de uma micromatriz contendo cerca de 6000 proteínas membranares humanas. Em cada caso, os parceiros de ligação esperados para cada molécula candidata foram identificados pelo rastreio. Não houve evidência de ligação não específica a outras proteínas humanas e a ligação a Galectina-1 é observada no rastreio de todas as proteínas de fusão contendo Fc.

[0024] **A FIG. 8A** mostra Western blots de proteínas químéricas mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT murinas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação de N+O e/ou após ebulição.

[0025] **A FIG. 8B** mostra Western blots de proteínas químéricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humanas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação de N+O, e/ou após ebulição.

[0026] **A FIG. 9A** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas químéricas mCD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT murinas realizado sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda superior), CD47-His capturada e detectada com IgG (direita superior), mLBR-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mLIGHT (esquerda inferior) e LTBR His+GST capturada e detectada com um anticorpo dirigido para SIRP α (direita inferior). **A FIG. 9B** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas químéricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humanas realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda superior), CD47-His capturada e detectada com IgG (direita superior), LTBR-His humano capturada e detectada com um anticorpo dirigido para LIGHT humana (esquerda inferior), e LTBR His+GST capturada e detectada com um anticorpo dirigido para SIRP α (direita inferior).

[0027] **A FIG. 10A** são gráficos mostrando a ligação de células CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT de camundongo a células CHO-K1 que

expressam CD47 de camundongo (esquerda) ou a células CHO-K1 que expressam LTbR de camundongo (direita). **A FIG. 10B** são gráficos que mostram a ligação de CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humano a células CHO-K1 que expressam CD47 de camundongo (pico Somente de Controle de Detecção Ab está longe à esquerda, o restante do pico distribui da esquerda para a direita aumentando a concentração (isto é, 250 está mais à direita)).

[0028] **A FIG. 11A** são gráficos que mostram a ligação de CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e CD172a(SIRP α)-Fc-CD40L humano a glóbulos vermelhos de macacos cynomolgus em comparação com anticorpos específicos de CD47 (clone CC2C6 ou CC900002), esquerda superior. A lise de glóbulos vermelhos de macaco cynomolgus após cada tratamento é mostrada ao longo de uma curva de titulação na esquerda inferior e uma placa de exemplo é mostrada à direita. Triton-X foi usado como um controle positivo para causar lise de glóbulos vermelhos de macaco cynomolgus (para referência, no painel superior, no eixo X, ponto 2 nM, as curvas de cima para baixo são anti-CD47/IgG-APC, anti-CD47-FITC, SIRP α -Fc-LIGHT e SIRP α -Fc-CD40L, enquanto no painel inferior no ponto 2 do eixo X, as curvas de cima para baixo são Triton-X100, anti-CD47 (CC2C6) e anti-CD47 (CC9002), SIRP α -Fc-LIGHT e SIRP α -Fc-CD40L todos sobrepostos). **A FIG. 11B** são gráficos mostrando a ligação de CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e CD172a(SIRP α)-Fc-CD40L humanos a glóbulos vermelhos humanos em comparação com anticorpos específicos para CD47 (clone CC2C6 ou CC900002), de cada um dos 3 diferentes doadores de sangue humano. **A FIG. 11C, a** lise de glóbulos vermelhos humanos após cada tratamento é mostrada ao longo de uma curva de titulação à esquerda e uma placa de exemplo é mostrada à direita. Triton-X foi usado como um controle positivo para causar lise de glóbulos vermelhos de macacos cynomolgus. Os dados são apresentados para 3 doadores de glóbulos vermelhos humanos.

[0029] **A FIG. 12A** mostra Western blots de proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT murinas executados em SDS-PAGE sob

condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação de N+O e/ou após ebulação. **A FIG. 12B** mostra Western blots de proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT humanas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação de N+O, e/ou após ebulação.

[0030] **A FIG. 13A** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT murino realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda), mLTBR-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mLIGHT (meio) e mPD-L1 capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mLIGHT (direita). **A FIG. 13B** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT humanas realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda), hLTBR-Fc His capturada e detectada com hLIGHT biotinilado (meio) e hPDL1-Fc capturada e detectada com hLTBR-His/6x His-HRP (direita).

[0031] **A FIG. 14A** são gráficos mostrando a ligação de células PD-1-Fc-LIGHT de camundongo a células CHO-K1 que expressam PD-L1 de camundongo (esquerda) ou a células CHO-K1 que expressam LTbR de camundongo (direita). **A FIG. 14B** são gráficos mostrando a ligação de PD-1-Fc-LIGHT humana a células CHO-K1 que expressam PD-L1 humana.

[0032] **A FIG. 15A** mostra Western blots de proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT murinas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação de N+O e/ou após ebulação. **A FIG. 15B** mostra Western blots de proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT humanas executados em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com enzima de desglicosilação de N+O, e/ou após ebulação.

[0033] **A FIG. 16A** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT murinas realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP

(esquerda), CD155/PVR capturada e detectada com Fc-HRP (meio), e mLTBR-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mLIGHT (direita). **A FIG. 16B** são gráficos mostrando ELISAs de proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGH humanas realizados sob as seguintes condições: Cadeia Pesada+Leve capturada e detectada com Fc-HRP (esquerda), CD155-His capturada e detectada com IgG (meio) e hCD155-Fc capturada e detectada com hLTBR-His/6x His-HRP (direita).

[0034] **A FIG. 17** são gráficos mostrando a ligação de células TIGIT-Fc-LIGHT de camundongo a células CHO-K1 que expressam PVR de camundongo (esquerda) ou a células CHO-K1 que expressam LTbR de camundongo (direita).

[0035] **A FIG. 18A** são gráficos mostrando medições de afinidade de ligação coletadas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet demonstrando ligação de TIGIT-Fc-LIGHT, CD172a (SIRPa)-Fc-LIGHT e PD-1-Fc-LIGHT humana a LTbR humana (todos os painéis, de cima para baixo: 30, 10, 3,3, 0). **A FIG. 18B** são medições de afinidade de ligação coletadas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet demonstrando a ligação de PD-1-Fc-LIGHT humana a PD-L1 e PD-L2 humana recombinante em uma faixa de concentrações (de cima para baixo: 500 nM ARC x PD-L1, 500 nM ARC x PD-L2, 166 nM ARC x PD-L1, 166 nM ARC x PD-L2, 56 nM ARC x PD-L1, 56 nM ARC x PD-L2, No ARC).

[0036] **A FIG. 19A** são gráficos mostrando medições de afinidade de ligação coletadas por interferometria biolayer usando um sistema Octet demonstrando ligação de TIGIT-Fc-OX40L e TIGIT-Fc-LIGHT humanas a CD155/PVR humana recombinante em comparação com um controle de proteína de fusão TIGIT-Fc unilateral de cima para baixo: TIGIT-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-Ox40L, TIGIT-Fc). **A FIG. 19B** são medições de afinidade de ligação coletadas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet demonstrando a ligação de CD172a (SIRPa)-Fc-LIGHT humana a CD47 humana recombinante em comparação com um controle CD172a(SIRPa)-Fc

unilateral, ou um dos dois controles de anticorpo específico CD47 (de cima para baixo: SIRPa-Fc-LIGHT, anti-CD47, anti-CD47 CC2C6, e SIRP-Fc). A **FIG. 19C** são medições de afinidade de ligação coletadas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet demonstrando a ligação de PD-1-Fc-LIGHT humana a PD-L1 humana recombinante em comparação com um controle PD-1-Fc de lado único ou um controle anti-PD-L1 (Atezolizumabe) (de cima para baixo: PD-1-Fc-LIGHT, anti-PDL1, e PD-1-Fc). A **FIG. 19D** são medições de afinidade de ligação coletadas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet demonstrando ligação de CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT ou PD-1-Fc-LIGHT humana a LTbR humana recombinante em comparação a um controle de proteína de fusão LIGHT-Fc de lado único ou um anticorpo anti-LTbR (de cima para baixo: TIGIT-Fc-LIGHT, Sirp1a-Fc-LIGHT, anti-LTbR, PD-1-Fc-LIGHT, e LIGHT-Fc).

[0037] As **FIG. 20A** e **FIG. 20B** mostram ensaios de liberação de citocina de superantígenos que demonstram os efeitos dos vários anticorpos, TIGIT-Fc-OX40L de camundongo, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT de camundongo, TIGIT-Fc-LIGHT de camundongo, e proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT de camundongo em leucócitos de sangue periférico de camundongos ativados por enterotoxina de estafilococo B (SEB). A **FIG. 20A** analisa a secreção de IL2 e a **FIG. 20B** determina a secreção de TNF α . Para a **FIG. 20A** e **FIG. 20B**, a ordem das condições para cada concentração de SEB espelha da esquerda para a direita, as condições listadas nas legendas de cima para baixo (*por exemplo*, α -PD-1 (RMP1-14) é a terceira a partir do topo nas legendas e é portanto, a terceira da esquerda nos gráficos, PD-1-Fc-LIGHT (10 nM) é a terceiro da parte inferior nas legendas e é, portanto, a terceiro da direita nos gráficos, e assim por diante). A **FIG. 20C** mostra uma compilação dos dados através de múltiplas concentrações de superantígenos (SEB) (novamente, a ordem das condições para cada concentração de SEB espelha da esquerda para a direita, as condições listadas nas legendas de cima para baixo).

[0038] As FIG. 21A a FIG. 21C mostram ensaios de liberação de citocina de superantígenos que demonstram os efeitos dos vários anticorpos, TIGIT-Fc-LIGHT humana (FIG. 21A), TIGIT-Fc-OX40L humana (FIG. 21B), PD-1-Fc-LIGHT humana e proteínas quiméricas CD172a (SIRPa)-Fc-LIGHT humanas (FIG. 21C) em leucócitos de sangue periférico humano ativados por enterotoxina B de estafilococos (SEB).

[0039] As FIG. 22A a FIG. 22B mostram resultados de estudos de tumor *in vivo* demonstrando a eficácia anti-tumor de mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRPa)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, e proteínas quiméricas MPD-1-Fc-LIGHT em comparação com anticorpos monoclonais para TIGIT, CD47, OX40, PD-1 ou uma combinação de TIGIT e OX40. Um tumor CT26 foi implantado em camundongos Balb/c antes do tratamento com os regimes indicados. A FIG. 22A mostra a evolução do tamanho do tumor ao longo de quarenta dias após a inoculação do tumor para cada grupo. A FIG. 22B mostra a percentagem de sobrevida global de camundongos através de quarenta dias após a inoculação do tumor e o número de rejeitores de tumor completos é indicado na tabela incorporada. Na FIG. 22A e FIG. 22B, as condições de tratamento são identificadas por letras.

[0040] A FIG. 23 mostra, sem querer estar limitado pela teoria, quatro configurações potenciais de proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L.

[0041] A FIG. 24 mostra Western blots de proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L executados em SDS-PAGE sob uma condição não redutora, uma condição redutora e uma condição redutora e após tratamento com Peptídeo-N-Glicosidase F (PNGaseF).

[0042] A FIG. 25 mostra um cromatograma para proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L executadas em Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC).

[0043] A FIG. 26 mostra géis PAGE SDS-PAGE e nativa (não SDS) para proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L executados sob

uma condição não redutora (“-”) ou uma condição redutora (“+”).

[0044] **A FIG. 27** mostra um gel PAGE nativo (não SDS) para proteínas quiméricas PD-1-Sem Fc-OX40L que não têm um domínio Fc.

[0045] **A FIG. 28** mostra, sem querer estar limitado pela teoria, um modelo de como um hexâmero e concatêmeros se formam a partir de proteínas quiméricas da presente invenção.

[0046] **As FIG. 29A a FIG. 29Q** mostram caracterização de proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L com diferentes sequências de ligantes de junção por análise de Western blot. Sequências dos diferentes ligantes de junção são fornecidas abaixo na seção Exemplos. Especificamente, cada domínio individual do construto de fusão foi sondado usando um anticorpo α -PD-1, α -Fc, ou α -OX40L. Em cada figura, amostras não tratadas da proteína químérica PD-1-Fc-OX40L, *por exemplo*, controle, foram carregadas na faixa 1 em todas as transferências (sem β -mercaptoetanol ou PNGase). As amostras na faixa 2 foram tratadas com o agente redutor, β -mercaptoetanol, enquanto as amostras na faixa 3 foram tratadas com PNGase.

[0047] **A FIG. 30** mostra caracterização de proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L com diferentes sequências de ligantes de junção por ensaio de captura e detecção com base em ELISA contra a região Fc central da proteína. Determinou-se a concentração proteica de cada proteína químérica PD-1-Fc-OX40L com diferentes sequências de ligantes de junção (#1 a #17).

[0048] **As FIG. 31A a FIG. 31P** mostram os perfis de citometria de fluxo de proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L com diferentes sequências de ligantes de junção por análise FACS para PD-L1 ou OX40. Os valores de EC₅₀ foram calculados para cada proteína químérica PD-1-Fc-OX40L com diferentes sequências de ligantes de junção (#2 a #17 – veja o rótulo e o gráfico do eixo X nos Exemplos abaixo para a identidade do ligante).

[0049] **A FIG. 32** é uma tabela mostrando ligantes

de junção e ligantes Fc que podem ser combinados em ligantes modulares ilustrativos. Os ligantes modulares ilustrativos mostrados podem ser combinados com quaisquer proteínas Tipo I e Tipo II proteínas e/ou domínios extracelulares aqui descritos de proteínas Tipo I e Tipo II aqui descritas para formar uma proteína quimérica da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0050] A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta de que proteínas quiméricas podem ser manipuladas a partir das regiões extracelulares, ou efetoras, de proteínas transmembranares de modulação imune de um modo que explora as orientações destas proteínas (*por exemplo*, Tipo I versus Tipo II) e, portanto, permite a distribuição de sinais imunoestimulatórios e/ou imunoinibitórios, incluindo, por exemplo, mascarar um sinal imunoinibitório e substituí-lo por um sinal imune estimatório no tratamento do câncer, especificamente, que as proteínas quiméricas à base de LIGHT e/ou TIGIT têm usos médicos.

Proteínas quiméricas

[0051] Em alguns aspectos, a proteína quimérica é de uma estrutura geral de: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, onde (a) é um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, (b) é um ligante tendo, pelo menos, um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto (incluindo, sem limitação, dobradiça-CH₂-CH₃ domínio Fc é derivado de IgG4 humana), e (c) é um segundo domínio que compreende um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, em que o ligante liga o primeiro domínio e o segundo domínio e, opcionalmente, compreende um ou mais ligantes de junção, tal como aqui descrito, onde um do primeiro e do segundo domínios extracelulares é um sinal imunoinibitório e um do primeiro e do segundo domínios extracelulares é um sinal imunoestimulatório.

[0052] Em modalidades, a proteína quimérica se refere a uma proteína de fusão recombinante, *por exemplo*, um polipeptídeo

simples possuindo os domínios extracelulares aqui descritos. Por exemplo, em modalidades, a proteína quimérica é traduzida como uma unidade única numa célula. Em modalidades, proteína quimérica se refere a uma proteína recombinante de múltiplos polipeptídeos, *por exemplo*, domínios extracelulares múltiplos aqui descritos, que estão ligados para produzir uma única unidade, *por exemplo, in vitro* (*por exemplo*, com um ou mais ligantes sintéticos aqui descritos).

[0053] Em modalidades, a proteína quimérica é quimicamente sintetizada como um polipeptídeo ou cada domínio pode ser quimicamente sintetizado separadamente e depois combinado. Em modalidades, uma porção da proteína quimérica é traduzida e uma porção é quimicamente sintetizada.

[0054] Em modalidades, um domínio extracelular se refere a uma porção de uma proteína transmembranar que é capaz de interagir com o ambiente extracelular. Em modalidades, um domínio extracelular se refere a uma porção de uma proteína transmembranar que é suficiente para se ligar a um ligando ou receptor e transmitir de forma eficaz um sinal a uma célula. Em modalidades, um domínio extracelular é a sequência de aminoácidos completa de uma proteína transmembranar que é externa de uma célula ou da membrana celular. Em modalidades, um domínio extracelular é a porção de uma sequência de aminoácidos de uma proteína transmembranar que é externa de uma célula ou da membrana celular e é necessária para a transdução de sinal e/ou ligação de ligando como pode ser testado usando métodos conhecidos na técnica (*por exemplo, in vitro* ensaios de ligação ao ligando e/ou de ativação celular).

[0055] Em modalidades, um sinal imunoinibitório se refere a um sinal que diminui ou elimina uma resposta imune. Por exemplo, no contexto da oncologia, esses sinais podem diminuir ou eliminar a imunidade antitumoral. Em condições fisiológicas normais, sinais inibitórios são úteis na manutenção da autotolerância (*por exemplo, prevenção de autoimunidade*) e

também para proteger os tecidos contra danos quando o sistema imunológico está respondendo à infecção patogênica. Por exemplo, sem limitação, o sinal imunoimunoinibitório pode ser identificado pela detecção de um aumento na proliferação celular, produção de citocinas, atividade de morte celular ou atividade fagocitária quando tal sinal inibitório é bloqueado.

[0056] Em modalidades, um sinal imunoestimulatório se refere a um sinal que aumenta uma resposta imune. Por exemplo, no contexto da oncologia, esses sinais podem melhorar a imunidade antitumoral. Por exemplo, sem limitação, o sinal imunoestimulatório pode ser identificado estimulando diretamente a proliferação, a produção de citocinas, a atividade letal ou a atividade fagocitária dos leucócitos. Exemplos específicos incluem a estimulação direta de receptores da superfamília de TNF, tais como OX40, LTbR, 4-1BB ou TNFRSF25 utilizando anticorpos agonistas do receptor ou utilizando proteínas quiméricas codificando os ligandos para tais receptores (OX40L, LIGHT, 4-1BBL, TL1A, respectivamente). A estimulação de qualquer um desses receptores pode estimular diretamente a proliferação e a produção de citocinas de subconjuntos de células T individuais. Outro exemplo inclui estimulação direta de uma célula inibitória imune através de um receptor que inibe a atividade de tal célula supressora imune. Isto incluiria, por exemplo, a estimulação de células T reguladoras CD4+ FoxP3+ com um anticorpo agonista GITR ou proteína químérica contendo GITRL, o que reduziria a capacidade dessas células T reguladoras de suprimirem a proliferação de células T CD4+ ou CD8+ convencionais. Noutro exemplo, isso incluiria a estimulação do CD40 na superfície de uma célula apresentadora de antígeno usando um anticorpo agonista CD40 ou uma proteína químérica contendo CD40L, causando ativação de células apresentadoras de antígeno incluindo capacidade aumentada dessas células para apresentar o antígeno no contexto de moléculas coestimulatórias nativas apropriadas, incluindo aquelas na superfamília B7 ou TNF. Em outro exemplo, isso incluiria a estimulação de LTBR na superfície de uma célula linfoide ou estromal usando uma proteína

quimérica contendo LIGHT, causando ativação da célula linfoide e/ou produção de citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias para estimular ainda mais uma resposta imune, opcionalmente dentro de um tumor.

[0057] As proteínas membranares consistem tipicamente em um domínio extracelular, um ou uma série de domínios transmembranares e um domínio intracelular. Sem querer estar limitado pela teoria, o domínio extracelular de uma proteína membranar é responsável por interagir com um receptor ou ligando solúvel ou ligado à membrana. Sem querer estar limitado pela teoria, os domínios transmembranares são responsáveis pela localização de uma proteína na membrana plasmática. Sem querer estar limitado pela teoria, o domínio intracelular de uma proteína membranar é responsável por coordenar interações com moléculas de sinalização celular para coordenar respostas intracelulares com o ambiente extracelular (ou vice-versa). Existem dois tipos de proteínas membranares de passagem única, aquelas com um terminal amino extracelular e C terminalarboxil intracelular (Tipo I) e aquelas com um C terminalarboxil extracelular e terminal amino intracelular (Tipo II). Ambas as proteínas membranares Tipo I e Tipo II podem ser receptores ou ligandos. Para proteínas membranares Tipo I, o terminal amino da proteína está voltado para fora da célula e, portanto, contém os domínios funcionais responsáveis pela interação com outros parceiros de ligação (ligandos ou receptores) no ambiente extracelular. Para proteínas membranares Tipo II, o C terminalarbóxi da proteína está voltado para fora da célula e, portanto, contém os domínios funcionais responsáveis pela interação com outros parceiros de ligação (ligandos ou receptores) no ambiente extracelular. Assim, esses dois tipos de proteínas têm orientações opostas entre si.

[0058] Como os domínios voltados para o exterior das proteínas membranares Tipo I e Tipo II são opostos, é possível ligar os domínios extracelulares de uma proteína membranar Tipo I e Tipo II de tal forma que os domínios "voltados para fora" das moléculas também estejam em

orientação oposta uns aos outros (**FIG. 1D**). O construto resultante consistiria, portanto, no domínio extracelular de uma proteína membranar Tipo I no lado 'esquerdo' da molécula, conectada ao domínio extracelular de uma proteína membranar Tipo II no lado 'direito' da molécula usando uma sequência ligante. Este construto poderia ser produzido por clonagem destes três fragmentos (o domínio extracelular de uma proteína Tipo I, seguido de uma sequência ligante seguido pelo domínio extracelular de uma proteína Tipo II) em um vetor (plasmídeo, viral ou outro) em que o terminal amino da sequência completa correspondia ao lado "esquerdo" da molécula contendo a proteína Tipo I e o C terminal arbóxi da sequência completa correspondia ao lado "direito" da molécula contendo a proteína Tipo II. Por conseguinte, em modalidades, as presentes proteínas químéricas são concebidas como tal.

[0059] Em modalidades, o domínio extracelular pode ser utilizado para produzir uma proteína solúvel para inibir competitivamente a sinalização pelo ligando desse receptor. Em modalidades, o domínio extracelular pode ser utilizado para fornecer sinalização artificial.

[0060] Em modalidades, o domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I é um sinal imunoinibitório. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II é um sinal imunoestimulatório.

[0061] Em modalidades, as presentes proteínas químéricas compreendem um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, ou um fragmento funcional desta. Em modalidades, as presentes proteínas químéricas compreendem um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II, ou um fragmento funcional da mesma. Em modalidades, as presentes proteínas químéricas compreendem um domínio extracelular de uma proteína transmembrana Tipo I ou um fragmento funcional desta e um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II, ou um fragmento funcional desta.

[0062] Em modalidades, as presentes proteínas

quiméricas podem ser engenheirada para direcionar uma ou mais moléculas que residem em leucócitos humanos incluindo, sem limitação, os domínios extracelulares (quando aplicável) de SLAMF4, IL-2 R α , 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R β , ALCAM, BTLA, B7-1, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMFS, CEACAM1, IL-6 R, IL-7 R α , IL-10R α , IL-10 R β , IL-12 R β 1, IL-12 R β 2, CD2, IL-13 R α 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CDS5j, ILT3/CDS5k, ILT4/CDS5d, ILT5/CDS5a, lutegrina α 4/CD49d, CDS, Integrina α E/CD103, CD6, Integrina α M/CD 11 b, CDS, Integrina α X/CD11c, Integrina β 2/CD16, KIR/CD15S, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD2S, KIR2DL3, CD30/TNFRSF5, KIR2DL4/CD15Sd, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, CD40 Ligando/TNFSF5, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CDS3, Leucotrieno B4-R1, CDS4/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, Cadeia γ comum/IL-2 R γ , Osteopontina, CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-Selectina, SIRP β 1, SLAM, TCCR/WSX-1, DNAM-1, Timopoitina, EMMPRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, Ligando Fas/TNFSF6, TIM-4, Fc γ RIII/CD16, TIM-6, TNFR1/TNFRSF1A, Granulisina, TNF RIII/TNFRSF1B, TRAIL RI/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAILR3/TNFRSF10C, IFN- γ R1, TRAILR4/TNFRSF10D, IFN- γ R2, TSLP, IL-1 R1, LIGHT, LTBR (TNFRSF3) e TSLP R.

[0063] A ativação de células T reguladoras é criticamente influenciada por sinais coestimulatórios e coinibitórios. Duas grandes famílias de moléculas coestimulatórias incluem as famílias B7 e fator de necrose tumoral (TNF). Estas moléculas ligam-se a receptores nas células T pertencentes às famílias de receptores CD28 ou TNF, respectivamente. Muitos coinibidores bem definidos e seus receptores pertencem às famílias B7 e CD28.

[0064] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem ser engenheiradas para direcionar uma ou mais moléculas

envolvidas na inibição imunológica, incluindo, por exemplo: TIGIT.

[0065] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de um agente imunoinibitório, incluindo, por exemplo, TIGIT.

[0066] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de uma proteína membranar Tipo I que tem propriedades imunoinibitórias. Em modalidades, a proteína quimérica é engenheirada para interromper, bloquear, reduzir e/ou inibir a transmissão de um sinal imunoinibitório.

[0067] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de um sinal imunoestimulatório é LIGHT (CD258).

[0068] Em modalidades, a proteína quimérica simula a ligação de um ligando de sinal inibitório ao seu receptor cognato (*por exemplo*, TIGIT a CD155/PVR, Nectina-2, Nectina-3 e/ou Nectina-4) mas inibe a transmissão do sinal inibitório para uma célula imune (*por exemplo*, uma célula T, macrófago ou outro leucócito).

[0069] Em modalidades, a proteína quimérica compreende um domínio extracelular do receptor imunoinibitório e um domínio extracelular do ligando imunoestimulatório que pode, sem limitação, distribuir uma estimulação imune a uma célula T enquanto mascara os sinais inibitórios imunes de uma célula tumoral. Em modalidades, a proteína quimérica fornece um sinal que tem o resultado líquido da ativação de células T.

[0070] Em modalidades, a proteína quimérica compreende um sinal imunoinibitório que é um ECD de um receptor de um sinal imunoinibitório e isso age em uma célula tumoral que possui um ligante cognato do sinal imunoinibitório. Em modalidades, a proteína quimérica compreende um sinal imunoestimulatório que é um ECD de um ligando de um sinal imunoestimulatório e este age em uma célula T que possui um receptor cognato do sinal imunoestimulatório. Em algumas modalidades, a proteína

quimérica compreende tanto (i) um sinal imunoinibitório que é um receptor de um sinal imunoinibitório e isso age em uma célula tumoral que possui um ligante cognato do sinal imunoinibitório e (ii) um sinal imunoestimulatório que é um ligando de um sinal imunoestimulatório e isso atua em uma célula T que possui um receptor cognato do sinal imunoestimulatório.

[0071] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de um ou mais dos agentes imunomoduladores descritos em Mahoney, *Nature Reviews Drug Discovery* 2015;14; 561-585, cujo conteúdo total é aqui incorporado por referência.

[0072] Em modalidades, uma proteína quimérica é capaz de ligação ao ligando(s)/receptor(es) murino(s).

[0073] Em modalidades, uma proteína quimérica é capaz de se ligar ao(s) ligando(s)/receptor(es) humano(s)

[0074] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de uma proteína membranar Tipo II que tem propriedades imunoestimulatórias. Em modalidades, a proteína quimérica é engenheirada para intensificar, aumentar e/ou estimular a transmissão de um sinal imunoestimulatório.

[0075] Por exemplo, em modalidades, o domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I é de TIGIT.

[0076] TIGIT é um receptor de poliovírus (PVR) - como proteína, um imunoreceptor expresso em células T que contém imunoglobulina e imunorreceptores baseados em motivos inibitórios da tirosina (ITIM). Como tal, o TIGIT atua como um ponto de verificação imunoinibitório em ambas as células T e células natural killer (NK), proporcionando uma oportunidade de direcionar os braços adaptativos e inatos do sistema imunológico.

[0077] TIGIT é expresso em células NK e subconjuntos de células T ativadas, de memória e regulatórias, e

particularmente em células T auxiliares foliculares dentro de órgãos linfoides secundários CD155/PVR é suprarregulado nas células endoteliais por IFN-gama e é altamente expresso em timócitos imaturos, células dendríticas de linfonodos e células tumorais de origem epitelial e neuronal. Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o TIGIT ECD) modulam qualquer uma das células descritas imediatamente acima (*por exemplo*, no contexto de uma sinapse imune).

[0078] O TIGIT liga-se a CD155/PVR, Nectinaa-2, Nectinaa-3 e Nectinaa-4. Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o TIGIT ECD) modulam a ligação de TIGIT a CD155/PVR (*por exemplo*, reduzem ou interrompem a ligação ou a transmissão do sinal). Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o TIGIT ECD) modulam a ligação de TIGIT a Nectina-2 (*por exemplo*, reduzem ou interrompem a ligação ou a transmissão do sinal). Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o TIGIT ECD) modulam a ligação de TIGIT a Nectina-3 (*por exemplo*, reduzem ou interrompem a ligação ou a transmissão do sinal). Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o TIGIT ECD) modulam a ligação de TIGIT a Nectina-4 (*por exemplo*, reduzem ou interrompem a ligação ou a transmissão do sinal).

[0079] Em modalidades, a proteína químérica é de uma estrutura geral de: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, onde (a) é um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, a proteína transmembranar sendo TIGIT, (b) é um ligante compreendendo, pelo menos, um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto (incluindo, sem limitação, dobradiça-CH₂-CH₃ domínio Fc é derivado de IgG4 humana), e (c) é um segundo domínio compreendendo um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar sendo selecionada de 4-1BBL, GITRL, TL1A, e LIGHT, em que o ligante liga o primeiro domínio e o segundo domínio e, opcionalmente,

compreende um ou mais ligantes de junção como aqui descrito.

[0080] Em modalidades, a proteína quimérica compreende o domínio extracelular do agente imunoinibitório TIGIT e está pareada com um agente imunoestimulatório como se segue: TIGIT/OX-40L; TIGIT/4-1BBL, TIGIT/LIGHT; TIGIT/GITRL; TIGIT/CD70; TIGIT/CD30L; TIGIT/CD40L; TIGIT/CD137L; TIGIT/TL1A; e TIGIT/OX40L. Em modalidades, a proteína quimérica é TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-OX40L, ou TIGIT-Fc-TL1A, em que o Fc representa um ligante que compreende pelo menos uma porção de um domínio Fc de um anticorpo e que compreende pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto.

[0081] Por exemplo, em modalidades, o domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II é de LIGHT.

[0082] LIGHT (HVEM-L, TNFSF14 ou CD258), uma entidade homóloga a linfotoxinas, com natureza indutível, e capaz de competir com a glicoproteína D do vírus herpes simplex para o mediador de entrada do vírus do herpes (HVEM)/fator de necrose tumoral (TNF) 2 é um membro da superfamília do TNF. É uma proteína transmembranar Tipo II de 29 kDa, expressa como um homotrímero em células T ativadas, bem como DCs, e possui três receptores, a saber: HVEM, receptor LT-β (LT β R, TNFRSF3) e receptor chamariz 3 (DcR3). Sem querer estar limitado pela teoria, sabe-se que três receptores com padrões de expressão celular distintos interagem com LIGHT: HVEM (TNFRSF14, CD270) detectado em células DCs, T e B ativadas, células NK, monócitos e células endoteliais; LT β R encontrado em DCs foliculares e células do estroma e liga LIGHT; e o receptor chamariz de entidade solúvel 3 (DcR3) detectado em diversas células cancerígenas, tais como mieloma múltiplo e linfoma difuso de células B grandes. Em modalidades, as presentes proteínas químéricas podem romper ou diminuir a interação de LIGHT com um ou mais destes três receptores.

[0083] LIGHT liga LTBR e, potencialmente, HVEM,

bem como DcR3. Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o LIGHT ECD) modulam a ligação de LIGHT a LTBR (*por exemplo*, aumentam ou promovem a ligação ou a transmissão do sinal). A LTBR é expressa por estroma visceral, linfoide e outros, epitélios e células mieloides, mas não por linfócitos. Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o LIGHT ECD) modulam um ou mais dos estroma viscerais, linfoides e outros, epitélios e células mieloides. Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o LIGHT ECD) modulam a ligação de LIGHT a HVEM (*por exemplo*, aumentam ou promovem a ligação ou a transmissão do sinal). Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes (*por exemplo*, compreendendo o LIGHT ECD) modulam a ligação de LIGHT a DcR3 (*por exemplo*, aumentam ou promovem a ligação ou a transmissão do sinal).

[0084] Em modalidades, a proteína químérica é de uma estrutura geral de: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, onde (a) é um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, a proteína transmembranar sendo selecionada de PD-1, CD172a(SIRP α) e TIGIT, (b) é um ligante compreendendo, pelo menos, um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto (incluindo, sem limitação, dobradiça-CH2-CH3 domínio Fc é derivado de IgG4 humana), e (c) é um segundo domínio compreendendo um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar sendo LIGHT, em que o ligante liga o primeiro domínio e o segundo domínio e, opcionalmente, compreende um ou mais ligantes de junção como aqui descrito.

[0085] Em modalidades, a proteína químérica compreende o domínio extracelular do agente imunoestimulatório LIGHT e está pareada com um agente imunoinibitório como se segue: PD-1/LIGHT, CD172a(SIRP α)/LIGHT, e TIGIT/LIGHT. Em modalidades, a proteína químérica é PD-1-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, e TIGIT-Fc-LIGHT, em que o Fc representa um ligante que compreende pelo menos uma porção de um domínio

Fc de um anticorpo e que compreende pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto.

[0086] Numa modalidade, a proteína quimérica compreende o domínio extracelular do agente imunoinibitório e é pareado com o agente imunoestimulatório. Em modalidades, a proteína quimérica liga-se a um receptor ou ligando cognato com um K_D de cerca de 1 nM a cerca de 5 nM, por exemplo, cerca de 1 nM, cerca de 1,5 nM, cerca de 2 nM, cerca de 2,5 nM, cerca de 3 nM, cerca de 3,5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 4,5 nM ou cerca de 5 nM. Em modalidades, a proteína quimérica liga a um receptor ou ligando cognato com um K_D de cerca de 5 nM a cerca de 15 nM, por exemplo, cerca de 5 nM, cerca de 5,5 nM, cerca de 6 nM, cerca de 6,5 nM, cerca de 7 nM, cerca de 7,5 nM, cerca de 8 nM, cerca de 8,5 nM, cerca de 9 nM, cerca de 9,5 nM, cerca de 10 nM, cerca de 10,5 nM, cerca de 11 nM, cerca de 11,5 nM, cerca de 12 nM, cerca de 12,5 nM, cerca de 13 nM, cerca de 13,5 nM, cerca de 14 nM, cerca de 14,5 nM ou cerca de 15 nM.

[0087] Em modalidades, a proteína quimérica exibe estabilidade aumentada e meia vida de proteína. Em modalidades, a proteína quimérica liga-se a FcRn com alta afinidade. Em modalidades, a proteína quimérica pode ligar-se a FcRn com um K_D de cerca de 1 nM a cerca de 80 nM. Por exemplo, a proteína quimérica pode se ligar a FcRn com um K_D de cerca de 1 nM, cerca de 2 nM, cerca de 3 nM, cerca de 4 nM, cerca de 5 nM, cerca de 6 nM, cerca de 7 nM, cerca de 8 nM, cerca de 9 nM, cerca de 10 nM, cerca de 15 nM, cerca de 20 nM, cerca de 25 nM, cerca de 30 nM, cerca de 35 nM, cerca de 40 nM, cerca de 45 nM, cerca de 50 nM, cerca de 55 nM, cerca de 60 nM, cerca de 65 nM, cerca de 70 nM, cerca de 71 nM, cerca de 72 nM, cerca de 73 nM, cerca de 74 nM, cerca de 75 nM, cerca de 76 nM, cerca de 77 nM, cerca de 78 nM, cerca de 79 nM ou cerca de 80 nM. Numa modalidade, a proteína quimérica pode se ligar a FcRn com um K_D de cerca de 9 nM. Em modalidades, a proteína quimérica não se liga substancialmente a outros receptores Fc (*isto* é outro que não seja FcRn) com função efetora.

[0088] Em modalidades, é fornecido um método de tratamento de um câncer e/ou doença inflamatória (*por exemplo*, qualquer um dos descritos aqui em outro local) administrando a um sujeito um ou mais de uma proteína quimérica PD-1-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, e TIGIT-Fc-LIGHT, em que o Fc representa um ligante que compreende pelo menos uma porção de um domínio Fc de um anticorpo e que compreende pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto. Em modalidades, o método gera uma resposta de memória que pode, *por exemplo*, ser capaz de prevenir a recaída. Em modalidades, o método inclui um efeito terapêutico sustentado de um ou mais de PD-1-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, e TIGIT-Fc-LIGHT, *por exemplo*, devido à ligação dos componentes do domínio extracelular aos seus respectivos parceiros de ligação com taxas de desassociação (K_d ou K_{off}) para fornecer opcionalmente efeito de mascaramento de sinal negativo sustentado e/ou um efeito de sinal positivo mais longo, *por exemplo*, para permitir que uma célula efetora para ser adequadamente estimulado para um efeito antitumoral.

[0089] Em modalidades, é fornecido um método de tratamento de um câncer ou uma doença inflamatória (*por exemplo*, qualquer um dos descritos aqui em outro local) administrando a um sujeito um ou mais de uma proteína quimérica TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A, e TIGIT-Fc-LIGHT, em que o Fc representa um ligante que compreende pelo menos uma porção de um domínio Fc de um anticorpo e que compreende pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto. Em modalidades, o método gera uma resposta de memória que pode, *por exemplo*, ser capaz de prevenir a recaída. Em modalidades, o método inclui um efeito terapêutico sustentado de um ou mais de TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A, e TIGIT-Fc-LIGHT, *por exemplo*, devido à ligação dos componentes do domínio extracelular aos seus respectivos parceiros de ligação com taxas de desassociação (K_d ou K_{off}) para fornecer opcionalmente efeito de mascaramento de sinal negativo sustentado e/ou um efeito de sinal

positivo mais longo, *por exemplo*, para permitir que uma célula efetora para ser adequadamente estimulado para um efeito antitumoral.

[0090] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem compreender variantes dos domínios extracelulares aqui descritos, por exemplo, uma sequência tendo pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 61%, ou pelo menos cerca de 62%, ou pelo menos cerca de 63%, ou pelo menos cerca de 64%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 66%, ou pelo menos cerca de 67%, ou pelo menos cerca de 68%, ou pelo menos cerca de 69%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 71%, ou pelo menos cerca de 72%, ou pelo menos cerca de 73%, ou pelo menos cerca de 74%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 76%, ou pelo menos cerca de 77%, ou pelo menos cerca de 78%, ou pelo menos cerca de 79%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 81%, ou pelo menos cerca de 82%, ou pelo menos cerca de 83%, ou pelo menos cerca de 84%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86%, ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92%, ou pelo menos cerca de 93%, ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96%, ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido ou de ácido nucleico conhecida de qualquer um dos domínios extracelulares divulgados, *por exemplo*, domínios extracelulares humanos, *por exemplo*, uma ou mais de SEQ IDs NOs: 2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 27, 29, 31, 37 ou 41.

[0091] Em modalidades, a proteína químérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT (SEQ ID NO: 2).

[0092] Em modalidades, a proteína químérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de PD-1 (SEQ ID NO:

4).

[0093] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10).

[0094] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CD172a(SIRPa) (SEQ ID NO: 7).

[0095] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT (SEQ ID NO: 2) e do domínio extracelular de PD-1 (SEQ ID NO: 4).

[0096] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT (SEQ ID NO: 2) e do domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10).

[0097] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT (SEQ ID NO: 2) e do domínio extracelular de CD172a(SIRPa) (SEQ ID NO: 7).

[0098] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana (SEQ ID NO: 46, 47, ou 48).

[0099] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana (SEQ ID NO: 46, 47, ou 48) e esta sequência é acompanhada por pelo menos um ligante de junção selecionado de SKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 49), SKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 50), IEGRMD SEQ ID NO: 52 (opcionalmente SKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 49) ou SKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 50) é um N terminal e um de IEGRMD SEQ ID NO: 52 é um C terminal).

[0100] Em modalidades, uma proteína quimérica compreende um ligante modular, tal como mostrado na **FIG. 32**.

[0101] Em modalidades, a proteína quimérica da

presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT e o domínio extracelular de PD-1, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera PD-1-Fc-LIGHT é a SEQ ID NO:5).

[00102] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT e o domínio extracelular de TIGIT, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera TIGIT-Fc-LIGHT é a SEQ ID NO: 11).

[00103] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT e o domínio extracelular de CD172a(SIRP α), usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT é a SEQ ID NO:8).

[00104] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10).

[00105] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de 4-1BBL (SEQ ID NO: 13).

[00106] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de GITRL (SEQ ID NO: 16).

[00107] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TL1A (SEQ ID NO: 19).

[00108] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT (SEQ ID NO: 2).

[00109] Em modalidades, a proteína quimérica da

presente invenção compreende um domínio extracelular de OX40L (SEQ ID NO: 22).

[00110] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10) e do domínio extracelular de 4-1BBL (SEQ ID NO: 13).

[00111] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10) e do domínio extracelular de GITRL (SEQ ID NO: 16).

[00112] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10) e do domínio extracelular de TL1A (SEQ ID NO: 19).

[00113] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10) e do domínio extracelular de LIGHT (SEQ ID NO: 2).

[00114] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT (SEQ ID NO: 10) e do domínio extracelular de OX40L (SEQ ID NO: 22).

[00115] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana (SEQ ID NO: 46, 47, ou 48).

[00116] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana (SEQ ID NO: 46, 47, ou 48) e esta sequência é acompanhada por pelo menos um ligante de junção selecionado de SKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 49), SKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 50), IEGRMD SEQ ID NO: 52 (opcionalmente SKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 49) ou SKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 50) é um N terminal e um de IEGRMD SEQ ID NO: 52 é um C terminal).

[00117] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT e o domínio

extracelular de 4-1BBL, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera TIGIT-Fc-4-1BBL é a SEQ ID NO: 14).

[00118] Em modalidades, a proteína químérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT e o domínio extracelular de GITRL, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera TIGIT-Fc-GITRL é a SEQ ID NO: 17).

[00119] Em modalidades, a proteína químérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT e o domínio extracelular de TL1A, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera TIGIT-Fc-TL1A é a SEQ ID NO: 20).

[00120] Em modalidades, a proteína químérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de LIGHT e o domínio extracelular de TIGIT, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera TIGIT-Fc-LIGHT é a SEQ ID NO: 11).

[00121] Em modalidades, a proteína químérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de TIGIT e o domínio extracelular de OX40L, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera TIGIT-Fc-OX40L é a SEQ ID NO: 23).

[00122] Em modalidades, uma proteína químérica pode compreender um domínio extracelular de uma sequência aqui identificada combinada com um domínio extracelular de outra sequência aqui identificada. Por exemplo, a sequência de uma proteína químérica TIGIT-Fc-TL1A pode incluir o domínio extracelular de TIGIT como divulgado acima em SEQ ID NO:10 e o domínio extracelular de TL1A como divulgado acima em SEQ ID NO:19.

[00123] Em modalidades, proteínas quiméricas adicionais e métodos usando as proteínas quiméricas adicionais (*por exemplo*, no tratamento de um câncer e/ou tratamento de uma doença inflamatória): TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-CD30L, TIGIT-Fc-FasL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A, e TIGIT-Fc-TRAIL. A sequência de aminoácidos para 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL, respectivamente, compreende a SEQ ID NO: 12, 26, 30, 15, 18 e 40. A sequência de aminoácidos para o domínio extracelular de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL, respectivamente, é SEQ ID NO: 13, 27, 31, 16, 19 e 41.

[00124] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem ser variantes aqui descritas, por exemplo, as presentes proteínas quiméricas podem ter uma sequência possuindo pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 61%, ou pelo menos cerca de 62%, ou pelo menos cerca de 63%, ou pelo menos cerca de 64%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 66%, ou pelo menos cerca de 67%, ou pelo menos cerca de 68%, ou pelo menos cerca de 69%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 71%, ou pelo menos cerca de 72%, ou pelo menos cerca de 73%, ou pelo menos cerca de 74%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 76%, ou pelo menos cerca de 77%, ou pelo menos cerca de 78%, ou pelo menos cerca de 79%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 81% ou pelo menos cerca de 82%, ou pelo menos cerca de 83%, ou pelo menos cerca de 84%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86%, ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92%, ou pelo menos cerca de 93%, ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96%, ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos das presentes proteínas quiméricas, *por exemplo*, uma ou mais de SEQ IDs NOs: 5, 8, 11, 14, 17, 20,

23, 42, 43, 44 ou 45.

[00125] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas compreendem um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I humana, como descrito na TABELA 1 de PCT/US2016/054598, ou um fragmento funcional da mesma. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas compreendem um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II humana, como descrito na TABELA 2 de PCT/US2016/054598, ou um fragmento funcional da mesma. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas compreendem um domínio extracelular de uma proteína transmembrana Tipo I como descrito na TABELA 1 de PCT/US2016/054598 ou um fragmento funcional da mesma e um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II como descrito na TABELA 2 de PCT/US2016/054598, ou um fragmento funcional do mesmo. Todo o conteúdo de PCT/US2016/054598 é aqui incorporado por referência.

[00126] Em modalidades, a proteína químérica pode compreender uma sequência de aminoácidos possuindo uma ou mais mutações de aminoácidos em relação a qualquer das sequências proteicas aqui descritas. Em modalidades, as mutações de um ou mais aminoácidos podem ser independentemente selecionadas de substituições, inserções, deleções e truncagens.

[00127] Em modalidades, as mutações de aminoácidos são substituições de aminoácidos e podem incluir substituições conservativas e/ou não conservativas.

[00128] As "substituições conservativas" podem ser feitas, por exemplo, com base na semelhança em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofilicidade e/ou na natureza anfipática dos resíduos de aminoácidos envolvidos. Os 20 aminoácidos de ocorrência natural podem ser agrupados nos seguintes seis grupos de aminoácidos padrão: (1) hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) acídico: Asp, Glu; (4) básico: His, Lys, Arg; (5) resíduos que

influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[00129] Tal como aqui utilizado, "substituições conservativas" são definidas como permutas de um aminoácido por outro aminoácido listado dentro do mesmo grupo dos seis grupos de aminoácido padrão mostrados acima. Por exemplo, a permuta de Asp por Glu mantém uma carga negativa no polipeptídeo assim modificado. Além disso, a glicina e a prolina podem ser substituídas entre si com base na sua capacidade de interromper as hélices α .

[00130] Tal como aqui utilizadas, "substituições não conservativas" são definidas como trocas de um aminoácido por outro aminoácido listado em um grupo diferente dos seis grupos de aminoácidos padrão (1) a (6) mostrados acima.

[00131] Em modalidades, as substituições podem também incluir aminoácidos não-clássicos (*por exemplo*, selenocisteína, pirrolisina, *N*-formilmetionina- β -alanina, GABA e ácido δ -amino-levulínico, ácido 4-aminobenzoico (PABA), isômeros D dos aminoácidos comuns, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, Ácido 2-amino-butírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiônico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosme, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, T-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclo-hexilanina, β -alanina, Fluoro-aminoácidos, aminoácidos criadores, como β aminoácidos de metil, aminoácidos de C-ametil, aminoácidos de N- α -metil e análogos de aminoácidos em geral).

[00132] Também podem ser feitas mutações nas sequências nucleotídicas das proteínas quiméricas presentes por referência ao código genético, incluindo a tomada em consideração da degeneração de códons.

[00133] Em modalidades, a proteína químérica compreende um ligante. Em modalidades, o ligante comprendendo pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto. Como

descrito aqui em outro local, tal pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto é, sem pretender estar ligado pela teoria, responsável por manter um estado multimérico apropriado da proteína quimérica e permitir a produção eficiente.

[00134] Em modalidades, o ligante pode ser derivado de proteínas de vários domínios de ocorrência natural ou são ligantes empíricos, como descrito, por exemplo, em Chichili *et al.*, (2013), Protein Sci. 22(2):153-167, Chen *et al.*, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65 (10): 1357-1369, cujo conteúdo completo é aqui incorporado por referência. Em algumas modalidades, o ligante pode ser projetado utilizando-se bancos de dados de projeção de ligantes e programa de computador, como os descritos em Chen *et al.*, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369 e Crasto *et. al.*, (2000), Protein Eng. 13(5):309-312, cujo conteúdo completo é aqui incorporado por referência.

[00135] Em modalidades, o ligante é um ligante sintético, como PEG.

[00136] Em modalidades, o ligante é um polipeptídeo. Em modalidades, o ligante é inferior a cerca de 500 aminoácidos de comprimento, cerca de 450 aminoácidos de comprimento, cerca de 400 aminoácidos de comprimento, cerca de 350 aminoácidos de comprimento, cerca de 300 aminoácidos de comprimento, cerca de 250 aminoácidos de comprimento, cerca de 200 aminoácidos de comprimento, cerca de 150 aminoácidos de comprimento, ou cerca de 100 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, o ligante pode ser inferior a cerca de 100, cerca de 95, cerca de 90, cerca de 85, cerca de 80, cerca de 75, cerca de 70, cerca de 65, cerca de 60, cerca de 55, cerca de 50, cerca de 45, cerca de 40, cerca de 35, cerca de 30, cerca de 25, cerca de 20, cerca de 19, cerca de 18, cerca de 17, cerca de 16, cerca de 15, cerca de 14, cerca de 13, cerca de 12, cerca de 11, cerca de 10, cerca de 9, cerca de 8, cerca de 7, cerca de 6, cerca de 5, cerca de 4, cerca de 3 ou cerca de 2 aminoácidos de comprimento. Em modalidades, o

ligante é flexível. Em outra modalidade, o ligante é rígido.

[00137] Em modalidades, o ligante é substancialmente constituído por resíduos de glicina e serina (*por exemplo*, cerca de 30%, ou cerca de 40%, ou cerca de 50%, ou cerca de 60%, ou cerca de 70%, ou cerca de 80%, ou cerca de 90%, ou cerca de 95%, ou cerca de 97%, ou cerca de 98%, ou cerca de 99%, ou cerca de 100% de glicinas e serinas).

[00138] Em modalidades, o ligante é uma região de dobradiça de um anticorpo (*por exemplo*, de IgG, IgA, IgD, e IgE, inclusive de subclasses (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e IgA1 e IgA2)). A região de dobradiça, encontrada nos anticorpos de classe IgG, IgA, IgD e IgE, atua como um espaçador flexível, permitindo que a porção Fab se mova livremente no espaço. Em contraste com as regiões constantes, os domínios de dobradiça são estruturalmente diversos, variando tanto em sequência quanto em comprimento entre classes. Por exemplo, o comprimento e a flexibilidade da região de dobradiça variam entre as subclasses da IgG. A região de dobradiça de IgG1 engloba os aminoácidos 216-231 e, por ser livremente flexível, os fragmentos Fab podem girar em torno de seus eixos de simetria e se mover dentro de uma esfera centrada na primeira das duas pontes de dissulfureto da inter-cadeia pesada. A IgG2 tem uma dobradiça mais curta do que a IgG1, com 12 resíduos de aminoácidos e quatro pontes de dissulfureto. A região de dobradiça da IgG2 não possui um resíduo de glicina, é relativamente curta e contém uma dupla hélice rígida de poli-prolina, estabilizada por pontes de dissulfureto de inter-cadeia pesada extra. Essas propriedades restringem a flexibilidade da molécula da IgG2. A IgG3 difere das outras subclasses pela sua única região de dobradiça estendida (cerca de quatro vezes maior que a dobradiça da IgG1) contendo 62 aminoácidos (incluindo 21 prolinas e 11 cisteínas), formando uma dupla hélice de polipropilina inflexível. Na IgG3, os fragmentos Fab são relativamente distantes do fragmento Fc, proporcionando à molécula maior flexibilidade. A dobradiça alongada da IgG3 também é

responsável pelo seu peso molecular mais elevado em comparação com as outras subclasses. A região de dobradiça da IgG4 é mais curta do que a da IgG1 e sua flexibilidade é intermediária entre a da IgG1 e da IgG2. A flexibilidade das regiões de dobradiça declina alegadamente na ordem IgG3> IgG1> IgG4> IgG2. Em modalidades, pode ser derivado de IgG4 humana e conter uma ou mais mutações para aumentar a dimerização (incluindo S228P) ou a ligação de FcRn

[00139] De acordo com estudos cristalográficos, a região de dobradiça da imunoglobulina pode ser ainda subdividida funcionalmente em três regiões: a região de dobradiça superior, a região do núcleo e a região de dobradiça inferior. Ver Shin *et al.*, 1992 *Immunological Reviews* 130:87. A região de dobradiça superior inclui aminoácidos da extremidade carboxil de C_{H1} para o primeiro resíduo na dobradiça que restringe o movimento, geralmente o primeiro resíduo de cisteína que forma uma ligação dissulfeto intercadeia entre as duas cadeias pesadas. O comprimento da região de dobradiça superior correlaciona-se com a flexibilidade segmentar do anticorpo. A região de dobradiça do núcleo contém as pontes de dissulfeto inter-cadeias pesadas, e a região de dobradiça inferior une-se à extremidade do terminal amino do domínio C_{H2} e inclui resíduos em C_{H2} . *Id.* A região de dobradiça central da IgG1 humana de tipo selvagem contém a sequência Cys-Pro-Pro-Cys que, quando dimerizada por formação de ligações dissulfeto resulta em um octapeptídeo cíclico que acredita-se que atua como um pivô, conferindo flexibilidade. Em modalidades, o presente ligante comprehende, um ou dois, ou três da região de dobradiça superior, a região do núcleo e a região de dobradiça inferior de qualquer anticorpo (*por exemplo*, IgG, IgA, IgD e IgE, inclusive de subclasses (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e IgA1 e IgA2)). A região de dobradiça também pode conter um ou mais sítios de glicosilação, que incluem vários tipos de sítios estruturalmente distintos para anexos de carboidratos. Por exemplo, IgA1 contém cinco sítios de glicosilação dentro de um segmento de 17 aminoácidos da região de dobradiça, conferindo

resistência do polipeptídeo da região de dobradiça a proteases intestinais, considerada uma propriedade vantajosa para uma imunoglobulina secretória. Em modalidades, o ligante da presente invenção compreende um ou mais sítios de glicosilação

[00140] Em modalidades, o ligante compreende um domínio Fc de um anticorpo (*por exemplo*, de IgG, IgA, IgD, e IgE, inclusive de subclasses (*por exemplo* IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e IgA1 e IgA2)). Em modalidades, o ligante compreende um domínio de dobradiça CH2-CH3Fc derivado de um anticorpo de IgG4 humana. Em modalidades, o ligante compreende um domínio CH2-CH3Fc de dobradiça derivado de um anticorpo de IgG1 humana. Em modalidades, o domínio Fc exibe afinidade aumentada e ligação aumentada ao receptor Fc neonatal (FcRn). Em modalidades, o domínio Fc inclui uma ou mais mutações que aumentam a afinidade e aumentam a ligação a FcRn. Sem querer estar limitado pela teoria, acredita-se que o aumento da afinidade e a melhoria da ligação ao FcRn aumenta a meia vida *in vivo* das presentes proteínas quiméricas.

[00141] Em modalidades, o ligante do domínio Fc contém uma ou mais substituições de aminoácidos nos resíduos de aminoácidos 250, 252, 254, 256, 308, 309, 311, 416, 428, 433 ou 434 (de acordo com a numeração de Kabat, como em Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) expressamente incorporado aqui por referência), ou equivalentes dos mesmos. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 250 é uma substituição com glutamina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 252 é uma substituição por tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico ou treonina. Numa modalidade, a substituição

de aminoácido no resíduo de aminoácido 308 é uma substituição com treonina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 309 é uma substituição por prolina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 311 é uma substituição por serina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 385 é uma substituição por arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina ou glicina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 386 é uma substituição por treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina ou metionina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 387 é uma substituição por arginina, prolina, histidina, serina, treonina ou alanina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 389 é uma substituição por prolina, serina ou asparagina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 416 é uma substituição por leucina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 428 é uma substituição por serina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 433 é uma substituição por arginina, serina, isoleucina, prolina ou glutamina. Numa modalidade, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 434 é uma substituição por histidina, fenilalanina ou tirosina.

[00142] Em modalidades, o ligante de domínio Fc (*por exemplo*, compreendendo uma região constante de IgG) compreende uma ou mais mutações, tais como substituições nos resíduos de aminoácido 252, 254, 256, 433, 434 ou 436 (de acordo com a numeração de Kabat, como em Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) expressamente incorporado aqui por referência). Numa modalidade, a região constante de IgG inclui uma mutação tripla M252Y/S254T/T256E ou mutação YTE. Noutra modalidade, a região constante de IgG inclui uma mutação tripla de H433K/N434F/Y436H ou mutação de KFH. Numa outra modalidade, a

região constante de IgG inclui uma mutação de YTE e KFH em combinação.

[00143] Em modalidades, os anticorpos humanizados modificados da invenção compreendem uma região constante de IgG que contém uma ou mais mutações nos resíduos de aminoácidos 250, 253, 307, 310, 380, 416, 428, 433, 434 e 435. Mutações ilustrativas incluem T250Q, M428L, T307A, E380A, I253A, H310A, R416S, M428L, H433K, N434A, N434F, N434S e H435A. Numa modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação M428L/N434S ou mutação LS. Numa modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação T250Q/M428L ou mutação QL. Numa outra modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação N434A. Numa modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação T307A/E380A/N434A ou uma mutação AAA. Numa outra modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação I253A / H310A / H435A ou mutação IHH. Numa modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação H433K/N434F. Numa modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação M252Y/S254T/T256E e uma mutação H433K/N434F em combinação.

[00144] Mutações ilustrativas adicionais na região constante de IgG são descritas, por exemplo, em Robbie, *et al.*, Antimicrobial Agents e Chemotherapy (2013), 57(12):6147-6153, Dall'Acqua *et al.*, JBC (2006), 281(33):23514-24, Dall'Acqua *et al.*, Journal of Immunology (2002), 169:5171-80, Ko *et al.* Nature (2014) 514:642-645, Grevys *et al.* Journal of Immunology. (2015), 194(11):5497-508, e Patente US 7.083.784, todo o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência.

[00145] Em modalidades, o ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de identidade. Em modalidades, as mutações são feitas com a SEQ ID NO: 46 para aumentar a estabilidade e/ou meia-vida. Por exemplo, em modalidades, o ligante tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou

99% de identidade. Em modalidades, o ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de identidade.

[00146] Sem querer estar limitado pela teoria, incluir um ligante compreendendo pelo menos uma parte de um domínio Fc numa proteína quimérica, ajuda a evitar a formação de concatâmeros e/ou agregados de proteínas insolúveis e, provavelmente, não funcionais. Isto é em parte devido à presença de cisteínas no domínio Fc que são capazes de formar ligações dissulfeto entre proteínas químéricas.

[00147] Um mutante estabilizador Fc ilustrativo é S228P. Os mutantes que se estendem na meia-vida do Fc ilustrativo são T250Q, M428L, V308T, L309P e Q311S e os presentes ligantes podem compreender 1, ou 2, ou 3, ou 4, ou 5 destes mutantes.

[00148] Além disso, um ou mais ligantes de junção podem ser empregados para ligar um domínio Fc num ligante (*por exemplo*, uma de SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, ou SEQ ID NO:48 ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de identidade) e os domínios extracelulares. Por exemplo, qualquer uma de SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, ou variantes das mesmas, podem ligar um domínio extracelular como aqui descrito e um ligante como aqui descrito. Opcionalmente, qualquer uma de SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, ou variantes dos mesmos, é deslocada entre um domínio extracelular como aqui descrito e um ligante como aqui descrito. Opcionalmente, qualquer uma de SEQ ID NOs: 49 a 95, ou variantes das mesmas estão localizados entre um domínio extracelular, tal como aqui descrito e um domínio de Fe, tal como aqui descrito. Em modalidades, uma proteína quimérica compreende um ligante de junção precedendo um domínio de Fc e um segundo ligante de junção seguindo o domínio de Fc; assim, uma proteína quimérica pode compreender a seguinte estrutura.

ECD 1 – Ligante de junção 1 – Domínio Fc – Ligante de junção 2 – ECD 2.

[00149] Em modalidades, o primeiro e o segundo ligantes de junção podem ser diferentes ou podem ser os mesmos.

[00150] As sequências de aminoácidos de ligantes ilustrativos são fornecidas na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Ligantes ilustrativos (ligantes de domínio Fc e ligantes de junção)

SEQ ID NO.	Sequência
46	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
47	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTPHSDWLSGKEY KCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSSWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSLGK
48	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLSGKEY KCKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSLGK
49	SKYGP _n CPSCP
50	SKYGP _n CP _n CP
51	SKYGP _n
52	IEGRMD
53	GGGVPRDCG

54	IEGRMDGGGGAGGGG
55	GGGSGGGS
56	GGGSGGGGSGGG
57	EGKSSGSGSESKST
58	GGSG
59	GGSGGGSGGGSG
60	EAAAKEAAAKEAAAK
61	EAAAREAAAREAAAREAAAR
62	GGGGSGGGGSGGGSAS
63	GGGGAGGGG
64	GS ou GGS ou LE
65	GSGSGS
66	GSGSGSGSGS
67	GGGGSAS
68	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP
69	CPPC
70	GGGGS
71	GGGGSGGGGS
72	GGGGSGGGGSGGGS
73	GGGGSGGGGSGGGSGGGS
74	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGS
75	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGS
76	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
77	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
78	GGSGSGGGSGGGGS
79	GGGGGGGG
80	GGGGGG
81	EAAAK

82	EAAAKEAAAK
83	EAAAKEAAAKEAAAK
84	AEAAAKEAAAKA
85	AEAAAKEAAAKEAAKA
86	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAKA
87	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAKA
88	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAKALEAEAAAKEAAAKEAAKEAAKA
89	PAPAP
90	KESGSVSSEQLAQFRSLD
91	GSAGSAAGSGEF
92	GGGSE
93	GSESG
94	GSEGS
95	GEGGSSEGSSSEGSSSEGGSSEGGSSEGGS

[00151] Ligantes de junção ilustrativos adicionais incluem, mas não estão limitados a, ligantes tendo a sequência LE, GGGGS (SEQ ID NO: 70), (GGGGS)_n (n=1-4) (SEQ ID NO: 70-73), (Gly)₈ (SEQ ID NO: 79), (Gly)₆ (SEQ ID NO: 80), (EAAAK)_n (n=1-3) (SEQ ID NO: 81-83), A(EAAAK)_nA (n = 2-5) (SEQ ID NO: 84-87), AEAAAKEAAAKA (SEQ ID NO: 84), A(EAAAK)₄ALEA(EAAAK)₄A (SEQ ID NO: 88), PAPAP (SEQ ID NO: 89), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 90), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 57), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 91), e (XP)_n, com X designando qualquer aminoácido, *por exemplo*, Ala, Lys, ou Glu.

[00152] Em modalidades, o ligante de junção é substancialmente constituído por resíduos de glicina e serina (*por exemplo*, cerca de 30%, ou cerca de 40%, ou cerca de 50%, ou cerca de 60%, ou cerca de 70%, ou cerca de 80%, ou cerca de 90%, ou cerca de 95%, ou cerca de 97%, ou cerca de 98%, ou cerca de 99%, ou cerca de 100% de glicinas e

serinas). Por exemplo, em modalidades, o ligante de junção é $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, onde n é de cerca de 1 a cerca de 8, *por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 (SEQ ID NO: 70 a SEQ ID NO: 77, respectivamente). Em modalidades, a sequência do ligante de junção é GGSGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 78). Ligantes de junção ilustrativos adicionais incluem, mas não estão limitados a, ligantes tendo a sequência LE, $(\text{Gly})_8$ (SEQ ID NO: 79), $(\text{Gly})_6$ (SEQ ID NO: 80), $(\text{EAAAK})_n$ ($n=1-3$) (SEQ ID NO: 81 - SEQ ID NO: 83), A(EAAAK_nA ($n = 2-5$) (SEQ ID NO: 84 – SEQ ID NO: 87), A($\text{EAAAK}_4\text{ALEA}(\text{EAAAK})_4\text{A}$ (SEQ ID NO: 88), PAPAP (SEQ ID NO: 89), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 90), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 91), e $(\text{XP})_n$, com X designando qualquer aminoácido, *por exemplo*, Ala, Lys, ou Glu. Em modalidades, o ligante de junção é GGS.

[00153] Em modalidades, o ligante de junção é um ou mais de GGGSE (SEQ ID NO: 92), GSESG (SEQ ID NO: 93), GSEGS (SEQ ID NO: 94), GEGGSSEGSSGEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGS (SEQ ID NO: 95), e um ligante de junção de G, S e E colocados aleatoriamente a cada 4 intervalos de aminoácidos.

[00154] Em modalidades, uma proteína quimérica compreende um ligante modular, tal como mostrado na **FIG. 32**.

[00155] Em modalidades, o ligante pode ser flexível, incluindo, sem limitação altamente flexível. Em modalidades, o ligante pode ser rígido, incluindo, sem limitação, uma hélice alfa rígida.

[00156] Em modalidades, o ligante pode ser funcional. Por exemplo, sem limitação, o ligante pode funcionar para melhorar a dobragem e/ou estabilidade, melhorar a expressão, melhorar a farmacocinética e / ou melhorar a bioatividade da presente proteína quimérica. Em outro exemplo, o ligante pode funcionar para direcionar a proteína quimérica para um tipo ou local de célula em particular.

[00157] Em modalidades, as presentes proteínas químéricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos

compreendendo, promoção de ativação imune (*por exemplo*, contra tumores). Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos que compreendem, suprimir a inibição imune (*por exemplo*, que permite que os tumores sobrevivam). Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam uma melhor ativação imunitária e/ou uma supressão melhorada da inibição imune devido à proximidade da sinalização que é proporcionada pela natureza químérica dos construtos.

[00158] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou podem ser utilizadas em métodos que compreendem, modular a amplitude de uma resposta imune, *por exemplo*, modulando o nível de saída do efetor. Em modalidades, *por exemplo*, quando utilizadas para o tratamento de câncer, as proteínas quiméricas presentes alteram a extensão da estimulação imunológica em comparação com a inibição imunológica para aumentar a amplitude de uma resposta de células T, incluindo, sem limitação, estimular níveis aumentados de produção de citocinas, proliferação ou potencial de morte do alvo.

[00159] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas, em modalidades, são capazes de, ou encontram uso em métodos que envolvem, mascarar um ligante inibitório na superfície de uma célula tumoral e substituindo esse ligante imunoinibitório por um ligante imunoestimulatório. Consequentemente, as presentes proteínas quiméricas, em modalidades, são capazes de, ou encontram uso em métodos envolvendo, reduzindo ou eliminando um sinal imunoinibitório e/ou aumentando ou ativando um sinal imunoestimulatório. Por exemplo, uma célula de tumor portadora de um sinal inibitório (evitando assim uma resposta imune) pode ser substituída por uma ligação de sinal positiva numa célula T que pode então atacar uma célula tumoral. Consequentemente, em modalidades, um sinal imunoinibitório é mascarado pelos presentes construtos e um sinal imunoestimulatório é ativado. Tais propriedades benéficas são reforçadas pela abordagem de construto único das presentes proteínas quiméricas. Por exemplo, a substituição do sinal pode

ser efetuada quase simultaneamente e a substituição do sinal é feita sob medida para ser local em um sítio de importância clínica (*por exemplo*, o microambiente tumoral). Outras modalidades aplicam o mesmo princípio a outros construtos de proteínas quiméricas, tais como, por exemplo, (i) o domínio extracelular de TIGIT e o (ii) domínio extracelular de 4-1BBL; (i) o domínio extracelular de TIGIT e o (ii) domínio extracelular de GITRL; (i) o domínio extracelular de TIGIT e o (ii) domínio extracelular de TL1A; (i) o domínio extracelular de TIGIT e o (ii) domínio extracelular de LIGHT; e (i) o domínio extracelular de PD-1 e (ii) o domínio extracelular de LIGHT; e (i) o domínio extracelular de CD172a (SIRP α) e (ii) o domínio extracelular de LIGHT; e (i) o domínio extracelular de TIGIT e (ii) o domínio extracelular de LIGHT; entre outros.

[00160] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram uso em métodos compreendendo, estimular ou reforçar a ligação de pares de ligando/receptor imunoestimulatórios. Os receptores coestimulatórios de células T ilustrativos e seus ligandos incluem OX-40: OX40-L, CD27:CD70, CD30:CD30-L, CD40:CD40-L; CD137:CD137-L, HVEM:LIGHT, GITR:GITR-L, TNFRSF25:TL1A, DR5:TRAIL e BTLA:HVEM. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram uso em métodos compreendendo, inibir ou reduzir a ligação de pares de ligandos/receptores inibitórios imunes. Os receptores coinibitórios ilustrativos de células T e seus ligandos incluem, por exemplo, CTLA-4: CD80/CD86, PD-1:PD-L1/PD-L2, BTLA:HVEM, TIM-3:galactina-9/fosfatidilserina, TIGIT/CD155 ou CD112, VISTA/VSIG8, CD172a(SIRP α)/CD47, B7H3R/B7H3, B7H4R/B7H4, CD244/CD48, TMIGD2/HHLA2, entre outros.

[00161] Em modalidades, a presente proteína quimérica bloqueia, reduz e/ou inibe PD-1 e PD-L1 ou PD-L2 e/ou a ligação de PD-1 com PD-L1 ou PD-L2. Em modalidades, a presente proteína quimérica bloqueia, reduz e/ou inibe a atividade de CTLA-4 e/ou a ligação de CTLA-4

com um ou mais de AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 e PPP2R5A. Em modalidades, a presente proteína quimérica aumenta e/ou estimula GITR e/ou a ligação de GITR com um ou mais de ligando GITR. Em modalidades, a presente proteína quimérica aumenta e/ou estimula o OX40 e/ou a ligação do OX40 com um ou mais do ligando OX40.

[00162] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram uso em métodos envolvendo melhorar, restaurar, promover e/ou estimular a modulação imunológica. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas aqui descritas, restauram, promovem e/ou estimulam a atividade ou a ativação de uma ou mais células imunes contra as células tumorais incluindo, mas não se limitando a: células T, linfócitos T citotóxicos, células T auxiliares, células assassinas naturais (NK), células T assassinas naturais (NKT), macrófagos anti-tumorais (*por exemplo*, macrófagos M1), células B e células dendríticas. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas aumentam, restauram, promovem e/ou estimulam a atividade e/ou ativação de células T, incluindo, através de um exemplo não limitativo, a ativação e/ou estimulação de uma ou mais sinais intrínsecos de células T, incluindo um sinal pró-sobrevida; um sinal de crescimento autócrino ou parácrino; um sinal mediado por p38 MAPK, ERK, STAT, JAK, AKT ou PI3K; um sinal anti-apoptótico; e/ou um sinal que promova e/isto é necessário para um ou mais de: produção de citocinas pró-inflamatórias ou migração de células T ou infiltração tumoral de células T.

[00163] Em algumas modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram utilização em métodos que envolvem, causar um aumento de uma ou mais células T (incluindo sem limitação linfócitos T citotóxicos, células T auxiliares, células T assassinas naturais (NKT)), células B, células assassinas naturais (NK), células T assassinas naturais (NKT), células dendríticas, monócitos e macrófagos (*por exemplo*, um ou mais de M1 e M2) num tumor ou no microambiente tumoral. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou

encontram uso em métodos que envolvem, inibir e/ou causar uma diminuição no recrutamento de células imunossupressoras (*por exemplo*, células supressoras derivadas de mieloide (MDSCs), células T regulatórias (Tregs), neutrófilos associados ao tumor (TANs), macrófagos M2 e macrófagos associados ao tumor (TAMs)) para o tumor e/ou microambiente tumoral (TME). Em modalidades, as presentes terapias podem alterar a razão de macrófagos M1 versus M2 no sítio do tumor e/ou TME para favorecer macrófagos M1.

[00164] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos que compreendem inibir e/ou reduzir a inativação de células T e/ou a tolerância imunológica a um tumor, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma proteína químérica aqui descrita a um sujeito. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de aumentar os níveis séricos de várias citocinas incluindo, mas não se limitando a, um ou mais de IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F e IL-22. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de aumentar a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF α ou IFN γ no soro de um sujeito tratado. Em modalidades, administração da presente proteína químérica é capaz de intensificar a secreção de TNF α . Numa modalidade específica, a administração da presente proteína químérica é capaz de intensificar a secreção de TNF α mediada por superantígenos por leucócitos. A detecção de tal resposta de citocina pode fornecer um método para determinar o regime de dosagem ideal para a proteína químérica indicada.

[00165] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas inibem, bloqueiam e/ou reduzem a morte celular de uma célula T antitumoral CD8+ e/ou CD4+; ou estimulam, induzem e/ou aumentam a morte celular de uma célula T pró-tumoral. A exaustão de células T é um estado de disfunção de células T caracterizado por perda progressiva de funções proliferativas e efetoras, culminando na deleção clonal. Por conseguinte, uma

célula T pro-tumoral se refere a um estado de disfunção das células T que surge durante muitas infecções crônicas e câncer. Esta disfunção é definida por funções proliferativas e/ou efetoras pobres, expressão sustentada de receptores inibitórios e um estado transcricional distinto daquele de células T efetoras ou de memória funcionais. A exaustão evita o controle ótimo da infecção e de tumores. Além disso, uma célula T antitumoral CD8+ e/ou CD4+ se refere a células T que pode montar uma resposta imune a um tumor. Células T pro-tumorais ilustrativas incluem, mas não estão limitadas a Tregs, células T CD4+ e/ou CD8+ que expressam um ou mais receptores inibitórios do ponto de verificação, células Th2 e células Th17. Receptores inibitórios do ponto de verificação referem-se a receptores expressos em células imunes que previnem ou inibem respostas imunes descontroladas.

[00166] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos compreendendo, aumentar uma razão de células T efetoras para células T regulatórias. Células T efetoras ilustrativas incluem ICOS⁺ células T efetoras; células T citotóxicas (*por exemplo*, αβ TCR, CD3⁺, CD8⁺, CD45RO⁺); células T efetoras CD4⁺ (*por exemplo*, αβ TCR, CD3⁺, CD4⁺, CCR7⁺, CD62Lhi, IL⁻7R/CD127⁺); células T efetoras CD8⁺ (*por exemplo*, αβ TCR, CD3⁺, CD8⁺, CCR7⁺, CD62Lhi, IL⁻7R/CD127⁺); células T efetoras de memória (*por exemplo*, CD62Llow, CD44⁺, TCR, CD3⁺, IL⁻7R/CD127⁺, IL-15R⁺, CCR7low); células T de memória central (*por exemplo*, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺; ou CCR7hi, CD44⁺, CD62Lhi, TCR, CD3⁺, IL-7R/CD127⁺, IL-15R⁺); células T efetoras CD62L⁺; células T efetoras de memória (TEM) CD8⁺ incluindo células T de memória efetoras precoces (CD27⁺ CD62L⁻) e células T de memória efetoras tardias (CD27⁻ CD62L⁻) (TemE e TemL, respectivamente); células T efetoras CD127(⁺)CD25(low/-); células T efetoras CD127(⁻)CD25(⁻); células efetoras de memória de células-tronco CD8⁺ (TSCM) (*por exemplo*, CD44(low)CD62L(high)CD122(high)sca(⁺)); células T efetoras TH1 (*por exemplo*, CXCR3⁺, CXCR6⁺ e CCR5⁺; ou αβ TCR, CD3⁺, CD4⁺, IL-12R⁺,

IFN γ R $^+$, CXCR3 $^+$), células T efetoras TH2 (*por exemplo*, CCR3 $^+$, CCR4 $^+$ e CCR8 $^+$; ou $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^+$, CD4 $^+$, IL-4R $^+$, IL-33R $^+$, CCR4 $^+$, IL-17RB $^+$, CRTH2 $^+$); células T efetoras TH9 (*por exemplo*, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^+$, CD4 $^+$); células T efetoras TH17 (*por exemplo*, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^+$, CD4 $^+$, IL-23R $^+$, CCR6 $^+$, IL-1R $^+$); células T efetoras CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $^+$, células T efetoras CD4 $^+$ CD45RO $^+$ CCR7 $(^-)$; e células T efetoras secretoras de IL-2, IL-4 e/ou IFN- γ . Células T regulatórias ilustrativas incluem células T regulatórias ICOS $^+$, células T regulatórias CD4 $^+$ CD25 $^+$ FOXP3 $^+$, células T regulatórias CD4 $^+$ CD25 $^+$, células T regulatórias CD4 $^+$ CD25 $(^-)$, células T regulatórias CD4 $^+$ CD25high, células T regulatórias TIM-3 $^+$ PD-1 $^+$, células T regulatórias de gene de ativação de linfócitos-3 (LAG-3) $^+$, células T regulatórias CTLA-4/CD152 $^+$, células T regulatórias de neuropilin-1 (Nrp-1) $^+$, células T regulatórias CCR4 $^+$ CCR8 $^+$, células T regulatórias CD62L (L-selectina) $^+$, células T regulatórias CD45RBlow, células T regulatórias CD127low, células T regulatórias LRRC32/GARP $^+$, células T regulatórias CD39 $^+$, células T regulatórias GITR $^+$, células T regulatórias LAP $^+$, células T regulatórias 1B11 $^+$, células T regulatórias BTLA $^+$, células T regulatórias tipo 1 (células Tr1), células T auxiliares tipo 3 (Th3), células regulatórias do fenótipo de células T assassinas naturais(NKTregs), células T regulatórias CD8 $^+$, células T regulatórias CD8 $^+$ CD28 $^-$ e/ou células T regulatórias que secretam IL-10, IL-35, TGF- β , TNF- α , Galectin-1, IFN- γ e/ou MCP1.

[00167] Em modalidades, a proteína quimérica gera uma resposta de memória que pode, *por exemplo*, ser capaz de prevenir a recaída ou proteger o animal de um re-desafio. Assim, um animal tratado com a proteína quimérica é mais tarde capaz de atacar células tumorais e/ou prevenir o desenvolvimento de tumores quando redesafiado após um tratamento inicial com a proteína quimérica. Consequentemente, uma proteína quimérica da presente invenção estimula tanto a destruição do tumor ativo e também o reconhecimento imunológico de抗ígenos tumorais, que são essenciais para a programação de uma resposta de memória capaz de prevenir a recaída.

[00168] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos compreendendo células T efetoras transientemente estimuladas por não mais de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 72 horas ou cerca de 96 horas ou cerca de 1 semana ou cerca de 2 semanas. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos compreendendo, esgotar ou inibir transitoriamente células T reguladoras por não mais do que cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 72 horas ou cerca de 96 horas ou cerca de 1 semana ou cerca de 2 semanas. Em modalidades, a estimulação transitória de células T efetoras e/ou depleção transitória ou inibição de células T reguladoras ocorre substancialmente na corrente sanguínea de um paciente ou em um tecido/localização particular incluindo tecidos linfoideos como, por exemplo, a medula óssea, linfonodo, baço, timo, tecido linfoide associado à mucosa (MALT), tecidos não linfoideos ou no microambiente tumoral.

[00169] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam vantagens incluindo, sem limitação, facilidade de uso e facilidade de produção. Isso ocorre porque dois agentes imunoterápicos distintos são combinados em um único produto, o que permite um único processo de fabricação, em vez de dois processos de fabricação independentes. Além disso, a administração de um único agente em vez de dois agentes separados permite uma administração mais fácil e maior adesão do paciente. Além disso, em contraste com, por exemplo, anticorpos monoclonais, que são proteínas multiméricas grandes contendo numerosas ligações dissulfeto e modificações pós-tradução, tais como glicosilação, as presentes proteínas quiméricas são mais fáceis e mais rentáveis de fabricar.

[00170] Em várias modalidades, a presente proteína quimérica é produzível em uma célula hospedeira de mamífero como uma cadeia polipeptídica única secretável e totalmente funcional.

[00171] Em modalidades, a presente proteína

quimérica proporciona inesperadamente a ligação dos componentes do domínio extracelular aos seus respectivos parceiros de ligação com taxas de desassociação (K_d ou K_{off}) mais lentas. Em modalidades, isto proporciona uma interação inesperadamente longa do receptor para o ligando e vice-versa. Tal efeito permite um efeito de mascaramento de sinal negativo sustentado (ver, por exemplo, Além disso, em modalidades, isto proporciona um efeito de sinal positivo mais longo, *por exemplo*, para permitir que uma célula efetora seja adequadamente estimulada para um efeito antitumoral. Por exemplo, a presente proteína quimérica, *por exemplo*, através da ligação de longa duração permite uma transmissão de sinal suficiente para fornecer proliferação de células T e permitir um ataque antitumoral. A título de exemplo adicional, a presente proteína quimérica, *por exemplo*, através da ligação de taxa off longa transmissão de sinal suficiente para fornecer a liberação de sinais estimulatórios, como, por exemplo, citocinas.

[00172] Esta sinapse estável de células promovida pelos agentes presentes (*por exemplo*, uma célula tumoral portadora de sinais negativos e uma célula T que poderia atacar o tumor) fornece orientação espacial para favorecer a redução do tumor - como posicionar as células T para atacar células tumorais e/ou impedir estericamente que a célula tumoral produza sinais negativos, incluindo sinais negativos além daqueles mascarados pela proteína quimérica da invenção.

[00173] Em modalidades, isto proporciona mais tempo no alvo (*por exemplo*, meia vida intratumoral) ($t_{1/2}$) em relação ao soro $t_{1/2}$ das proteínas químéricas. Tais propriedades podem ter a vantagem combinada de reduzir as toxicidades fora do alvo que podem ser associadas com a distribuição sistêmica das proteínas químéricas.

[00174] Em modalidades, os agentes presentes permitem que certas células do sistema imunológico atuem, *por exemplo*, de uma maneira antitumoral, prevenindo e/ou interrompendo a inibição de células NK e/ou subconjuntos de células T ativadas, de memória e/ou regulatórias,

e/ou células T auxiliares bloqueando um sinal via TIGIT e, opcionalmente, ainda criar respostas imunes via sinalização estimulatória baseada em 4-1BBL, e GITRL, e/ou TL1A, e/ou LIGHT.

[00175] Em modalidades, os agentes presentes permitem que certas células do sistema imunológico atuem, *por exemplo*, de maneira antitumoral, estimulando e/ou aumentando a sinalização estimulatória baseada em LIGHT, *por exemplo*, no estroma visceral e/ou linfoide e/ou outro estroma e/ou epitélio e/ou células mieloides e, opcionalmente, criar respostas imunes adicionais via bloqueio ou redução de PD-1, e/ou CD172a(SIRP α)-, e/ou sinalização inibitória baseada em TIGIT.

[00176] Além disso, em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam efeitos terapêuticos sinérgicos, uma vez que permitem uma interação melhorada específica do sítio de dois agentes de imunoterapia.

[00177] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas fornecem o potencial para reduzir a toxicidade fora do sítio e/ou sistêmica.

[00178] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam efeitos colaterais reduzidos, *por exemplo*, complicações gastrointestinais, em relação às imunoterapias correntes, *por exemplo*, anticorpos dirigidos a moléculas de ponto de verificação como aqui descrito. Complicações GI ilustrativas incluem dor abdominal, perda de apetite, efeitos autoimunes, constipação, cólicas, desidratação, diarreia, problemas alimentares, fadiga, flatulência, líquido no abdome ou ascite, disbiose gastrointestinal (GI), mucosite gastrintestinal, doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino irritável (SII-D e SII-C), náusea, dor, mudanças nas fezes ou na urina, colite ulcerativa, vômitos, ganho de peso pela retenção de fluido e/ou fraqueza.

Doenças; Métodos de Tratamento e Seleções de Pacientes

[00179] Em modalidades, a presente invenção se refere a cânceres e/ou tumores; por exemplo, ao tratamento ou à prevenção de cânceres e/ou tumores. Como descrito em outro lugar neste documento, o tratamento de câncer pode envolver, em modalidades, a modulação do sistema imunológico com as proteínas químéricas presentes para favorecer a estimulação imune em relação à inibição imune.

[00180] Os cânceres ou tumores se referem a um crescimento descontrolado de células e/ou a uma sobrevivência anormal da célula e/ou à inibição da apoptose que interfere com o funcionamento normal dos órgãos e sistemas corporais. Incluem-se os cânceres benigno e maligno, pólipos, hiperplasia, bem como tumores dominantes ou micrometástases. Além disso, estão incluídas células com proliferação anormal que não é impedida pelo sistema imunológico (*por exemplo*, células infectadas por vírus). O câncer pode ser um câncer primário ou um câncer metastático. O câncer primário pode ser uma área das células cancerígenas em um local de origem que se torna clinicamente detectável, e pode ser um tumor primário. Em contraste, o câncer metastático pode ser a difusão de uma doença de um órgão ou parte de outro órgão não-adjacente ou outra parte. O câncer metastático pode ser causado por uma célula de câncer que adquire a capacidade de penetrar e de se infiltrar nos tecidos circundantes normais em uma área local, de formar um novo tumor, que pode ser uma metástase local. O câncer também pode ser causado por uma célula cancerígena que adquire a capacidade de penetrar as paredes dos vasos sanguíneos e/ou linfáticos, após o que a célula cancerígena é capaz de circular pela corrente sanguínea (sendo então uma célula tumoral circulante) para outros locais e tecidos do corpo. O câncer pode ser devido a um processo como uma disseminação linfática ou hematogênica. O câncer também pode ser causado por uma célula tumoral que vem para repousar em outro local, re penetra pelo vaso ou pelas paredes, continua a se multiplicar e, por fim, forma outro tumor clinicamente detectável. O câncer pode ser esse novo tumor, que pode ser um tumor metastático (ou secundário).

[00181] O câncer pode ser causado por células tumorais que sofreram metástase, que podem ser um tumor secundário ou metastático. As células tumorais podem ser semelhantes àquelas no tumor original. A título de exemplo, se um câncer de mama ou câncer do cólon sofrer metástase para o fígado, o tumor secundário, quando presente no fígado, é constituído de células de mama ou do cólon anormais, não de células hepáticas anormais. O tumor no fígado pode ser, assim, um câncer de mama metastático ou um câncer do cólon metastático, não um câncer do fígado.

[00182] O câncer pode ter origem em qualquer tecido. O câncer pode se originar, por exemplo, de um melanoma, cólon, mama ou próstata e, assim, pode ser constituído por células que eram originalmente da pele, do cólon, da mama ou da próstata, respectivamente. O câncer também pode ser uma malignidade hematológica, que pode ser leucemia ou linfoma. O câncer pode invadir um tecido, como do fígado, pulmão, bexiga ou do intestino.

[00183] Os cânceres e/ou tumores representativos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, carcinoma de células basais; câncer do trato biliar; câncer de bexiga; câncer nos ossos; câncer no cérebro e no sistema nervoso central; câncer de mama; câncer do peritônio; câncer cervical; coriocarcinoma; câncer do cólon e reto; câncer do tecido conjuntivo; câncer do sistema digestivo; câncer do endométrio; câncer de esôfago; câncer de olho; câncer da cabeça e pescoço; câncer gástrico (incluindo câncer gastrointestinal); glioblastoma; carcinoma hepático; hepatoma; neoplasia intra-epitelial; câncer do rim ou renal; câncer de laringe; leucemia; câncer de fígado; câncer do pulmão (*por exemplo*, câncer de células pequenas do pulmão, câncer de células não pequenas do pulmão, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão); melanoma; mieloma; neuroblastoma; câncer da cavidade oral (lábios, língua, boca e faringe); câncer do ovário; câncer de pâncreas; câncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomiossarcoma; câncer retal; câncer do sistema respiratório; carcinoma da glândula salivar; sarcoma; câncer de pele; câncer de

células escamosas; câncer de estômago; câncer de testículo; câncer de tireoide; câncer uterino ou do endométrio; câncer do sistema urinário; câncer vulvar; linfoma, incluindo linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin, bem como o linfoma de células B (incluindo linfoma não-Hodgkin de baixo grau/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeno (SL); NHL folicular/de grau intermediário; NHL difuso de grau intermediário; NHL imunoblastico de alto grau; NHL linfoblástico de alto grau; NHL de células não clivadas pequenas de alto grau; linfoma relacionados a AIDS; e macroglobulinemia; leucemia linfocítica crônica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células capilares; leucemia dos mieloblastos crônica; bem como outros carcinomas e sarcomas; e distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (PTLD), bem como proliferação vascular anormal associada com facomatose, edema (como aquele associado com tumores cerebrais) e síndrome de Meigs.

[00184] Em modalidades, a proteína quimérica é utilizada para tratar um sujeito que tem um câncer refratário ao tratamento. Em modalidades, a proteína quimérica é utilizada para tratar um sujeito que é refratário a um ou mais agentes imunomoduladores. Por exemplo, em modalidades, a proteína quimérica é utilizada para tratar um sujeito que não apresenta resposta ao tratamento, ou mesmo progresso, após 12 semanas ou mais de tratamento. Por exemplo, em modalidades, o sujeito é refratário a um agente PD-1 e/ou PD-L1 e/ou PD-L2, incluindo, por exemplo, nivolumabe (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), pembrolizumabe (KEYTRUDA, MERCK), pidilizumabe (CT-011, CURE TECH), MK-3475 (MERCK), BMS 936559 (BRISTOL MYERS SQUIBB), Ibrutinibe (FARMACICLICAS/ABBVIE), atezolizumabe (TECENTRIQ, GENENTECH), e/ou pacientes refratários MPDL328OA (ROCHE). Por exemplo, em modalidades, o sujeito é refratário a um agente anti-CTLA-4, por exemplo, pacientes refratários de ipilimumabe (YERVOY) (*por exemplo*, pacientes com melanoma). Em conformidade, em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de câncer que resgatam pacientes que não

respondem a várias terapias, incluindo a monoterapia de um ou mais agentes imunomoduladores.

[00185] Em modalidades, a presente invenção proporciona proteínas quiméricas que têm como alvo uma célula ou tecido dentro do microambiente tumoral. Em modalidades, a célula ou o tecido dentro do microambiente tumoral expressa um ou mais alvos ou parceiros de ligação da proteína químérica. O microambiente tumoral se refere ao meio celular, incluindo células, proteínas secretadas, pequenas moléculas fisiológicas e vasos sanguíneos nos quais o tumor existe. Em modalidades, as células ou tecido dentro do microambiente tumoral são um ou mais de: vasculatura tumoral; linfócitos infiltrantes de tumores; células reticulares de fibroblastos; células progenitoras endoteliais (EPC); fibroblastos associados ao câncer; pericitos; outras células estromais; componentes da matriz extracelular (MEC); células dendríticas; células apresentadoras de antígeno; células T; células T regulatórias; macrófagos; neutrófilos; e outras células imunes localizadas proximais a um tumor. Em modalidades, a presente proteína químérica tem como alvo uma célula cancerígena. Em modalidades, a célula cancerígena expressa um ou mais dos alvos ou parceiros de ligação da proteína químérica.

[00186] Em modalidades, a proteína químérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa TIGIT. Em modalidades, a proteína químérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa CD155/PVR. Em modalidades, a proteína químérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa Nectina-2. Em modalidades, a proteína químérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa Nectinaa-3. Em modalidades, a proteína químérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa Nectina-4.

[00187] Em modalidades, a proteína químérica da

invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa LIGHT. Em modalidades, a proteína quimérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa LTBR. Em modalidades, a proteína quimérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa HVEM. Em modalidades, a proteína quimérica da invenção pode direcionar uma célula (*por exemplo*, célula cancerígena ou célula imune) que expressa DcR3.

[00188] Em modalidades, os presentes métodos proporcionam tratamento com a proteína quimérica num paciente que é refratário a um agente adicional, sendo descritos “agentes adicionais” noutras partes deste documento, inclusive, sem limitação, dos vários agentes quimioterapêuticos aqui descritos.

[00189] Em modalidades, as proteínas quiméricas são utilizadas para tratar, controlar ou prevenir uma ou mais doenças ou condições inflamatórias. Exemplos não limitativos de doenças inflamatórias incluem acne vulgar, inflamação aguda, rinite alérgica, asma, aterosclerose, dermatite atópica, doença autoimune, doenças autoinflamatórias, ataxia espástica autossômica recessiva, bronquiectasia, doença celíaca, colecistite crônica, inflamação crônica, prostatite crônica, colite, diverticulite, eosinofilia familiar (fe), glomerulonefrite, deficiência de glicerol-quinase, hidradenite supurativa, hipersensibilidades, inflamação, doenças inflamatórias intestinais, doença pélvica inflamatória, cistite intersticial, doença inflamatória aríngea, síndrome de Leigh, líquen plano, síndrome de ativação de mastócitos, mastocitose, doença inflamatória ocular, otite, dor, doença inflamatória pélvica, lesão de reperfusão, doença respiratória, re-estenose, febre reumática, artrite reumatoide, rinite, sarcoidose, choque séptico, silicose e outras pneumoconioses, rejeição de transplantes, tuberculose e vasculite.

[00190] Em modalidades, a doença inflamatória é uma doença autoimune ou condição, tal como esclerose múltipla, diabetes

mellitus, lúpus, doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de Guillain-Barre, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, granulomatose de Wegener, epilepsia autoimune, encefalite de Rasmussen, esclerose biliar primária, colangite esclerosante, Hepatite autoimune, doença de Addison, tiroidite de Hashimoto, fibromialgia, síndrome de Meniere; rejeição de transplante (*por exemplo*, prevenção da rejeição de aloenxerto) anemia perniciosa, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, miastenia grave, síndrome de Reiter, doença de Grave, e outras doenças autoimunes.

[00191] Em alguns aspectos, os presentes agentes quiméricos são utilizados para eliminar agentes patogênicos intracelulares. Em alguns aspectos, os agentes quiméricos presentes são usados para tratar uma ou mais infecções. Em modalidades, as proteínas quiméricas presentes são utilizadas em métodos de tratamento de infecções virais (incluindo, por exemplo, HIV e HCV), infecções parasitárias (incluindo, por exemplo, malária) e infecções bacterianas. Em modalidades, as infecções induzem imunossupressão. Por exemplo, as infecções por HIV muitas vezes resultam em imunossupressão nos indivíduos infectados. Consequentemente, como descrito em outro lugar neste documento, o tratamento de tais infecções pode envolver, em modalidades, a modulação do sistema imunológico com as proteínas quiméricas presentes para favorecer a estimulação imune em relação à inibição imune. Alternativamente, a presente invenção proporciona métodos para tratar infecções que induzem a imunoativação. Por exemplo, as infecções por helmintos intestinais têm sido associadas à ativação imune crônica. Nessas modalidades, o tratamento de tais infecções pode envolver a modulação do sistema imunológico com as proteínas quiméricas presentes para favorecer a inibição imune através da estimulação imune.

[00192] Em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de infecções virais, incluindo, sem limitação, infecções virais agudas ou crônicas, por exemplo, do trato

respiratório, infecções do vírus do papiloma, infecção pelo vírus do herpes simplex (HSV), do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e de infecção viral de órgãos internos, como a infecção por vírus da hepatite. Em modalidades, a infecção viral é causada por um vírus da família Flaviviridae. Em modalidades, o vírus da família Flaviviridae é selecionado do vírus da febre amarela, vírus do Nilo Ocidental, vírus da dengue, vírus da encefalite japonesa, vírus da Encefalite de St. Louis e vírus da Hepatite C. Em modalidades, a infecção viral é causada por um vírus da família Picornaviridae, *por exemplo*, poliovírus, rinovírus, coxsackievírus. Em modalidades, a infecção viral é causada por um membro de Orthomyxoviridae, *por exemplo*, um vírus da gripe. Em modalidades, a infecção viral é causada por um membro de Retroviridae, *por exemplo*, um lentivírus. Em modalidades, a infecção viral é causada por um membro de Paramyxoviridae, *por exemplo*, vírus respiratório sincicial, vírus parainfluenza humano, rubulavírus (*por exemplo*, vírus da caxumba), vírus do sarampo e metapneumovírus humano. Em modalidades, a infecção viral é causada por um membro de Bunyaviridae, *por exemplo*, Hantavírus. Em modalidades, a infecção viral é causada por um membro de Reoviridae, *por exemplo*, um rotavírus.

[00193] Em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de infecções parasitárias tais como infecções por protozoários ou helmintos. Em modalidades, a infecção parasitária é feita por um parasita protozoário. Em modalidades, o parasita oritiziabe é selecionado de protozoários intestinais, protozoários de tecido ou protozoários sanguíneos. Os parasitas protozoários ilustrativos incluem, mas não estão limitados a, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium muris*, *Trypanosomatida gambiense*, *Trypanosomatida rhodesiense*, *Trypanosomatida cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis* e *Histomonas meleagridis*. Em modalidades, a infecção

parasitária é por um parasita helmíntico, como nematoides (*por exemplo*, Adenophorea). Em modalidades, o parasita é selecionado Secementeia (*por exemplo*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Wuchereria bancrofti*, *Dracunculus medinensis*). Em modalidades, o parasita é selecionado de trematoides (*por exemplo*, parasitas de sangue, parasitas de fígado, parasitas intestinais e parasitas de pulmão). Em modalidades, o parasita é selecionado de: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Heterophyes*, *Paragonimus westermani*. o parasita é selecionado de cestodes (*por exemplo*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Echinococcus granulosus*).

[00194] Em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de infecções bacterianas. Em modalidades, a infecção bacteriana é por bactérias gram positivas, bactérias gram negativas, bactérias aeróbicas e anaeróbias. Em modalidades, as bactérias são selecionadas a partir de, mas não limitadas a, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Nisseria*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Haemophilus*, *Brucella* e outros organismos. Em modalidades, as bactérias são selecionadas de, mas não limitadas a, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas hydrophilia*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Francisella tularensis*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Acinetobacter*

baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia intermedia*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Branhamella catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Kingella*, *Moraxella*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides* 3452A homology group, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides ovalis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides splanchnicus*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, ou *Staphylococcus saccharolyticus*.

[00195] Em alguns aspectos, os presentes agentes químicos são utilizados para tratar uma ou mais doenças ou distúrbios autoimunes. Em modalidades, o tratamento de uma doença ou distúrbio autoimune pode envolver a modulação do sistema imunológico com as presentes proteínas químicas para favorecer a inibição imune sobre a estimulação imune. Doenças autoimunes ilustrativas ou distúrbios tratáveis com as presentes proteínas químicas incluem aquelas em que os próprios抗ígenos do corpo se tornam alvos para uma resposta imune, como, por exemplo, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes mellitus,

espondilite anquilosante, síndrome de Sjögren, doenças inflamatórias do intestino (*por exemplo*, colite ulcerosa, esclerose múltipla, sarcoidose, psoríase, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, psoríase, reações de hipersensibilidade (*por exemplo*, alergias, febre do feno, asma e edema agudo causam reações de hipersensibilidade do Tipo I) e vasculite.

[00196] Ainda em um outro aspecto, a presente invenção é dirigida a métodos de tratamento e prevenção de doenças e distúrbios mediados por células T, tais como, mas não limitados a doenças ou distúrbios aqui descritos noutro local e doença ou distúrbio inflamatório, doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD), rejeição de transplante e transtorno proliferativo de células T.

[00197] Em alguns aspectos, os presentes agentes quiméricos são usados em métodos de ativação de uma célula T, *por exemplo*, via o domínio extracelular tendo um sinal imunoestimulatório.

[00198] Em alguns aspectos, os presentes agentes quiméricos são utilizados em métodos de prevenção da transmissão celular de um sinal imunossupressor.

Terapias de combinação e conjugação

[00199] Em modalidades, a invenção proporciona proteínas quiméricas e métodos e composições que compreendem também administrar um agente adicional a um sujeito. Em modalidades, a invenção diz respeito à coadministração e/ou coformulação. Qualquer uma das composições aqui descritas pode ser coformulada e/ou coadministrada.

[00200] Em modalidades, qualquer proteína químérica aqui descrita atua sinergicamente quando coadministrada com outro agente e é administrada em doses que são mais baixas do que as doses vulgarmente empregadas quando tais agentes são utilizados como monoterapia. Em modalidades, qualquer agente aqui referido pode ser utilizado em combinação com qualquer uma das proteínas químéricas aqui descritas.

[00201] Em modalidades, incluindo, sem limitação,

aplicações de câncer, a presente invenção se refere a agentes quimioterapêuticos como agentes adicionais. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem, sem limitação, agentes alquilantes como tiotepa e CYTOXAN ciclofosfamida; sulfonatos de alquila como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoaminas e metilamelaminaes, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolmelamina; acetogeninas (*por exemplo*, bulatacina e bulatacinona); um camptotecina (incluindo o topotecano análogo sintético); briostatina, estatina de cally; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos, adozelesin, carzelesin e bizelesin); criptoficina (*por exemplo*, criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatin; duocarmicin (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; um sarcodicti-ina; espongistatina; mostardas de nitrogênio como o clorambucil, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimnustina; antibióticos como a enedi-ina de antibióticos (*por exemplo*, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama II e caliqueamicina ômega II (ver, *por exemplo*, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; bisfosfonatos, tais como clodronato; uma esperamicina; bem como cromóforos de neocarzinostatina e cromóforos de cromoproteína enedi-ina de antibióticos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, authramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA doxorrubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolina-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e deoxorrubicina deoxi), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcomicomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina,

quelamicina, rodarubicina, estreptomicina, estreptoziocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos do ácido fólico tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenais tais como minoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantrene; edatraxato; demecolcine; diaziquona; elformitina; acetato de eliptínia; uma epotilona; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinana; ionidainina; maitansinoides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazina; complexo de polissacarídeo PSK (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxane; rizoxina; sizofurano; spirogermanium; ido tenuazico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (*por exemplo*, toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomona; mitobronitol; mitolactol; pipobromana; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, *por exemplo*, TAXOL paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncologia, Princeton, N.J.), ABRAXANE Cremophor-free, formulações de nanopartículas de paclitaxel formuladas com albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, 111.) e TAXOTERE doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucil; Gencitabina GEMZAR; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE. vinorelbina; novantrona; teniposida; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (Camptosar, CPT-

11) (incluindo o regime de tratamento de irinotecano com 5-FU e leucovorina); inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tais como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatina, incluindo o regime de tratamento com oxaliplatina (FOLFOX); lapatinibe (TYKERB); inibidores dePKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (*por exemplo*, erlotinibe (Tarceva)) e VEGF-A que reduzem a proliferação celular e sais ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de qualquer um dos anteriores. Além disso, os métodos de tratamento podem incluir ainda a utilização de radiação. Além disso, os métodos de tratamento podem incluir ainda o uso de terapia fotodinâmica.

[00202] Em modalidades, incluindo, sem limitação, aplicações de câncer, o presente agente adicional é um ou mais agentes imunomoduladores selecionados de um agente que bloqueia, reduz e/ou inibe PD-1 e PD-L1 ou PD-L2 e/ou ou a ligação de PD-1 com PD-L1 ou PD-L2 (a título de exemplo não limitativo, um ou mais nivolumabe (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), pembrolizumabe (KEYTRUDA, Merck), MK-3475 (MERCK), BMS 936559 (BRISTOL MYERS SQUIBB), atezolizumabe (TECENTRIQ, GENENTECH), MPDL3280A (ROCHE)), um agente que aumenta e/ou estimula CD137 (4-1BB) e/ou a ligação de CD137 (4-1BB) com um ou mais de ligando 4-1BB (a título de exemplo não limitativo, urelumabe (BMS-663513 e anticorpo anti-4-1BB) e um agente que bloqueia, reduz e/ou inibe a atividade de CTLA-4 e/ou a ligação de CTLA-4 com um ou mais de AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 e PPP2R5A e/ou a ligação de OX40 com OX40L (a título de exemplo não limitativo GBR 830 (GLENMARK), MEDI6469 (MEDIMMUNE).

[00203] Em modalidades, incluindo, sem limitação, aplicações de doenças infecciosas, a presente invenção se refere a anti-infecciosos como agentes adicionais. Em modalidades, o anti-infeccioso é um agente antiviral incluindo, mas não limitado a, Abacavir, Aciclovir, Adefovir, Amprenavir, Atazanavir, Cidofovir, Darunavir, Delavirdina, Didanosina,

Docosanol, Efavirenz, Elvitegravir, Emtricitabina, Enfuvirtida, Etravirina, Famciclovir e Foscarnet. Em algumas modalidades, o anti-infeccioso é um agente antibacteriano incluindo, mas não limitado a, antibióticos de cefalosporina (cefalexina, cefuroxima, cefadroxil, cefazolina, cefalotina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil e ceftobiprol); antibióticos de fluoroquinolona (cipro, Levaquina, floxina, tequina, avelox e norflo); antibióticos de tetraciclina (tetraciclina, minociclina, oxitetraciclina e doxiciclina); antibióticos de penicilina (amoxicilina, ampicilina, penicilina V, dicloxacilina, carbenicilina, vancomicina e meticilina); antibióticos de monobactam (aztreonam); e antibióticos de carbapenem (ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina e meropenem). Em modalidades, os anti-infecciosos incluem agentes antimaláricos (*por exemplo*, cloroquina, quinina, mefloquina, primaquina, doxiciclina, artemeter/lumefantrina, atovaquona/proguanil e sulfadoxina/pirimetamina), metronidazol, tinidazol, ivermectina, pamoato de pirantel e albendazol.

[00204] Em modalidades, inclusive, sem limitação, de aplicações autoimunes, o agente adicional é um agente imunossupressor. Em modalidades, o agente imunossupressor é um agente anti-inflamatório, tal como um agente anti-inflamatório esteroidal ou um agente anti-inflamatório não esteroidal (NSAID). Esteroides, particularmente os corticosteroides suprarrenais e seus análogos sintéticos, são bem conhecidos na técnica. Exemplos de corticosteroides úteis na presente invenção incluem, sem limitação, hidroxiltriancinolona, alfa-metil-dexametasona, beta-metil-betametasona, dipropionato de beclometasona, benzoato de betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, dexametasona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetonido de fluclorolona, pivalato de flumetasona, acetonido de fluosinolona, fluocinonida, flucortina butiléster, fluocortolona, fluprednideno (fluprednilideno) acetato, flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de

hidrocortisona, metilprednisolona, acetonido de triancinolona, cortisona, corticona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorosona, acetonido de fluradrenolona, medrysona, amcinafel, amcinafida, betametasona e o equilíbrio dos seus ésteres, cloroprednisona, clocortelona, clescinolona, diclorisona, difluprednato, flucoronida flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, hidrocortisona, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona. (NSAIDS) que podem ser utilizados na presente invenção, incluem mas não est limitados a ácido salicílico, ácido acetil salicílico, metil salicilato, glicol salicilato, salicilmidas, ácido benzil-2,5-diacetoxibenzoico, ibuprofeno, fulindac, naproxeno, cetoprofeno, etofenamato, fenilbutazona e indometacina. Em modalidades, o agente imunossupressor pode ser citostático, tais como agentes alquilantes, antimetabolitos (*por exemplo*, azatioprina, metotrexato), antibióticos citotóxicos, anticorpos (*por exemplo*, basiliximabe, daclizumabe e muromonabe), anti-imunofilinas (*por exemplo*, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus), interferons, opioides, proteínas de ligação a TNF, micofenolatos e pequenos agentes biológicos (*por exemplo*, fingolimod, miriocina).

[00205] Em modalidades, as proteínas químéricas (e/ou agentes adicionais) aqui descritas, incluem derivados que são modificados, *isto é*, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula à composição de modo que a ligação covalente não impeça a atividade da composição. Por exemplo, mas não como limitação, os derivados incluem composições que foram modificadas por, *inter alia*, glicosilação, lipidação, acetilação, peguilização, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc.. Qualquer uma das inúmeras modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a clivagem química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de turicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos. Ainda em outras modalidades, as

proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) aqui descritas compreendem ainda um agente citotóxico, compreendendo, em modalidades ilustrativas, uma toxina, um agente quimioterapêutico, um radioisótopo e um agente que causa apoptose ou morte celular. Tais agentes podem ser conjugados com uma composição aqui descrita.

[00206] As proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) aqui descritas podem, assim, ser modificadas pós-traducionalmente para adicionar porções efetoras, tais como ligantes químicos, porções detectáveis, tais como, por exemplo, corantes fluorescentes, enzimas, substratos, materiais bioluminescentes, materiais radioativos e porções quimioluminescentes, ou porções funcionais, tais como, por exemplo, estreptavidina, avidina, biotina, uma citotoxina, um agente citotóxico e materiais radioativos.

Formulações

[00207] As proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) aqui descritas pode possuir um grupo funcional suficientemente básico, que pode reagir com um ácido inorgânico ou orgânico, ou um grupo carboxil, que pode reagir com uma base inorgânica ou orgânica, para formar um sal farmaceuticamente aceitável. Um sal de adição de ácido farmaceuticamente aceitável é formado de um ácido farmaceuticamente aceitável, como é bem conhecido na técnica. Esses sais incluem os sais farmaceuticamente aceitáveis listados, por exemplo, em *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977) e *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. PH Stahl e CG Wermuth (eds.), Verlag, Zurique (Suíça) 2002, que são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

[00208] Em modalidades, as composições aqui descritas estão na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

[00209] Além disso, qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada a um sujeito

como um componente de uma composição que compreende um carreador ou veículo farmaceuticamente aceitável. Tais composições podem opcionalmente compreender uma quantidade adequada de um excipiente farmaceuticamente aceitável de modo a proporcionar a forma para administração apropriada. Excipientes farmacêuticos podem ser líquidos, tais como água e óleos, incluindo aqueles de origem animal, vegetal, de petróleo ou sintética, tal como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e similares. Os excipientes farmacêuticos podem ser, por exemplo, salina, goma arábica, gelatina, pasta de amido, talco, queratina, sílica coloidal, ureia e similares. Além disso, agentes auxiliares, estabilizantes, espessantes, lubrificantes e corantes podem ser usados. Em uma modalidade, os excipientes farmaceuticamente aceitáveis são estéreis quando administrados a um sujeito. A água é um excipiente útil quando qualquer agente aqui descrito é administrado por via intravenosa. Soluções salinas e soluções de glicerol e dextrose aquosa também podem ser empregadas como excipientes líquidos, especificamente para soluções injetáveis. Excipientes farmacêuticos adequados também incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado seco, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e similares. Qualquer agente descrito neste documento, se desejado, também pode compreender quantidades menores de agentes umidificantes ou emulsificantes, ou agentes tamponantes de pH.

[00210] Em modalidades, as composições aqui descritas são ressuspensas num tampão salino (incluindo, sem limitação, TBS, PBS e semelhantes).

[00211] Em modalidades, as proteínas químéricas podem ser conjugadas e/ou fundidas com outro agente para estender a meia vida ou, de outro modo, melhorar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Em modalidades, as proteínas químéricas podem ser fundidas ou conjugadas com um ou mais de PEG, XTEN (*por exemplo*, como

rPEG), ácido polissialílico (POLYXEN), albumina (*por exemplo*, albumina de soro humano ou HAS), proteína semelhante a elastina (ELP), PAS, HAP, GLK, CTP, transferrina e semelhantes. Em modalidades, cada uma das proteínas químéricas individuais é fundida com um ou mais dos agentes descritos em BioDrugs (2015) 29: 215-239, cujo conteúdo total é aqui incorporado por referência.

Administração, Dosagem e Regimes de tratamento

[00212] A presente invenção inclui a proteína químérica descrita (e/ou agentes adicionais) em várias formulações. Qualquer proteína químérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode assumir a forma de soluções, suspensões, emulsões, gotas, tabletes, comprimidos, peletes, cápsulas, cápsulas contendo líquidos, pós, formulações de liberação sustentada, supositórios, emulsões, aerossóis, sprays, suspensões ou qualquer outra forma adequada para uso. Os construtos de DNA ou RNA que codificam as sequências proteicas podem também ser utilizadas. Numa modalidade, a composição está na forma de uma cápsula (*ver, por exemplo*, Patente US 5.698.155). Outros exemplos de excipientes farmacêuticos adequados são descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995), incorporados neste documento por referência.

[00213] Quando necessário, as formulações compreendendo a proteína químérica (e/ou agentes adicionais) podem também incluir um agente solubilizante. Além disso, os agentes podem ser distribuídos com um veículo ou dispositivo de distribuição adequado, conforme conhecido na técnica. As terapias combinadas descritas neste documento podem ser distribuídas em conjunto em um único veículo de distribuição ou dispositivo de distribuição. As composições para administração podem opcionalmente incluir um anestésico local tal como, por exemplo, lidocaína para diminuir a dor no local da injeção.

[00214] As formulações compreendendo a proteína químérica (e/ou agentes adicionais) da presente invenção podem ser

convenientemente apresentadas em formas de dosagem unitária e podem ser preparadas por qualquer um dos modos bem conhecidos na técnica da farmácia. Tais métodos incluem geralmente a etapa de associar os agentes terapêuticos a um carreador, que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Normalmente, as formulações são preparadas uniformemente e intimamente trazendo o agente terapêutico em associação com um carreador líquido, um suporte sólido finamente dividido ou ambos e em seguida, se necessário, transformando o produto em formas de dosagem da formulação desejada (*por exemplo*, granulação úmida ou seca, misturas em pó, *etc.*, seguido por marcação usando métodos convencionais conhecidos na técnica)

[00215] Numa modalidade, qualquer proteína químérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita é formulada de acordo com procedimentos de rotina como uma composição adaptada para um modo de administração aqui descrito.

[00216] Rotas de administração incluem, por exemplo: intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, retal, por inalação ou tópica, particularmente nos ouvidos, nariz, olhos ou pele. Em modalidades, a administração é efetuada oralmente ou por injeção parenteral. Na maioria dos casos, a administração resulta na liberação de qualquer agente descrito aqui na corrente sanguínea.

[00217] Qualquer proteína químérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada oralmente. Tais proteínas químéricas (e/ou agentes adicionais) podem também ser administradas por qualquer outra via conveniente, por exemplo, por infusão intravenosa ou injeção de bolus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (*por exemplo*, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, *etc.*) e pode ser administrado em conjunto com outro agente biologicamente ativo. A administração pode ser sistêmica ou local. Vários sistemas de entrega são conhecidos, *por exemplo*, encapsulamento em lipossomas, micropartículas,

microcápsulas, cápsulas, etc., e podem ser usados para administrar.

[00218] Em modalidades específicas, pode ser desejável administrar localmente na área que necessite de tratamento. Numa modalidade, por exemplo, no tratamento de câncer, a proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) é administrada no microambiente tumoral (*por exemplo*, células, moléculas, matriz extracelular e/ou vasos sanguíneos que envolvem e /ou alimentam uma célula tumoral, incluindo, por exemplo, vasculatura tumoral; linfócitos infiltrantes de tumores; células reticulares de fibroblastos; células progenitoras endoteliais (EPC); fibroblastos associados a câncer; pericitos; outras células estromais; componentes da matriz extracelular (ECM); células dendríticas; células apresentadoras de antígeno; células T; células T reguladoras; macrófagos; neutrófilos; e outras células imunes localizadas proximais a um tumor) ou linfonodo e/ou direcionado para o microambiente tumoral ou linfonodo. Em modalidades, por exemplo, no tratamento de câncer, a proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) é administrada intratumoralmemente.

[00219] Nas várias modalidades, a presente proteína quimérica permite um efeito duplo que proporciona menos efeitos colaterais do que os observados na imunoterapia convencional (*por exemplo*, tratamentos com um ou mais de OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY e TECENTRIQ). Por exemplo, as presentes proteínas químéricas reduzem ou impedem eventos adversos relacionados com o sistema imunológico comumente observados que afetam vários tecidos e órgãos, incluindo a pele, o trato gastrointestinal, os rins, sistema nervoso periférico e central, fígado, gânglios linfáticos, olhos, pâncreas e o sistema endócrino; como hipofisite, colite, hepatite, pneumonite, erupção cutânea e doença reumática. Além disso, a presente administração local, *por exemplo*, intratumoralmemente, previne o evento adverso observado com a administração sistêmica padrão, *por exemplo*, infusões IV, como são usadas com imunoterapia convencional (*por exemplo*, tratamentos com um ou mais de OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY e TECENTRIQ).

[00220] Formas de dosagem adequadas para administração parenteral (*por exemplo*, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea e intra-articular) incluem, por exemplo, soluções, suspensões, dispersões, emulsões e semelhantes. Eles também podem ser fabricados na forma de composições sólidas estéreis (*por exemplo*, composição liofilizada), que pode ser dissolvida ou suspensa em meio injetável estéril imediatamente antes do uso. Podem conter, por exemplo, agentes de suspensão ou dispersão conhecidos na técnica.

[00221] A dosagem de qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita, assim como o esquema de dosagem, pode depender de vários parâmetros, incluindo, mas não limitados a, a doença a ser tratada, a saúde geral do sujeito e a discrição do médico assistente. Qualquer proteína quimérica aqui descrita pode ser administrada antes (*por exemplo*, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas antes), concomitantemente com, ou subsequentemente (*por exemplo*, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas após) a administração de um agente adicional, a um sujeito em necessidade do mesmo. Em modalidades, qualquer proteína quimérica e agente adicional aqui descrito são administrados com 1 minuto de intervalo, 10 minutos de intervalo, 30 minutos de intervalo, menos de 1 hora de intervalo, 1 hora de intervalo, 1 hora a 2 horas de intervalo, 2 horas a 3 horas de intervalo, 3 horas a 4 horas de intervalo, 4 a 5 horas de intervalo, 5 horas a 6 horas de intervalo, 6 horas a 7 horas de intervalo, 7 horas a 8 horas de intervalo, 8 horas a 9 horas de intervalo, 9 horas a 10 horas de intervalo, 10 horas a 11 horas de intervalo, de 11 horas a 12 horas de intervalo, 1 dia de intervalo, 2 dias de intervalo, 3 dias de intervalo, 4 dias de intervalo, 5 dias de intervalo, 6 dias de intervalo, 1

semana de intervalo, 2 semanas de intervalo, 3 semanas de intervalo, ou 4 semanas de intervalo.

[00222] Em modalidades, a presente invenção se refere à coadministração de uma proteína quimérica que induz uma resposta imune inata e outra proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa. Em tais modalidades, a proteína quimérica que induz uma resposta imune inata pode ser administrada antes, concorrentemente ou subsequentemente à administração da proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa. Por exemplo, as proteínas quiméricas podem ser administradas com 1 minuto de intervalo, 10 minutos de intervalo, 30 minutos de intervalo, menos de 1 hora de intervalo, 1 hora de intervalo, 1 hora a 2 horas de intervalo, 2 horas a 3 horas de intervalo, 3 horas a 4 horas de intervalo, 4 a 5 horas de intervalo, 5 a 6 horas de intervalo, 6 a 7 horas de intervalo, 7 a 8 horas de intervalo, 8 horas a 9 horas de intervalo, 9 horas a 10 horas de intervalo, 10 horas a 11 horas de intervalo, de 11 horas a 12 horas de intervalo, 1 dia de intervalo, 2 dias de intervalo, 3 dias de intervalo, 4 dias de intervalo, 5 dias de intervalo, 6 dias de intervalo, 1 semana de intervalo, 2 semanas de intervalo, 3 semanas de intervalo, ou 4 semanas de intervalo. Numa modalidade ilustrativa, a proteína quimérica que induz uma resposta imune inata e a proteína quimérica que induz uma resposta adaptativa são administradas com uma semana de intervalo, ou administradas em semanas alternadas (*isto é*, a administração da proteína quimérica que induz uma resposta imune inata é seguida 1 semana depois com a administração da proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa e assim por diante).

[00223] A dosagem de qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode depender de vários fatores, incluindo a gravidade da doença, se a condição deve ser tratada ou prevenida, e a idade, peso e saúde do sujeito a ser tratado. Adicionalmente, a informação farmacogenômica (o efeito do genótipo no perfil farmacocinético,

farmacodinâmico ou de eficácia de uma terapêutica) sobre um determinado sujeito pode afetar a dosagem utilizada. Além disso, as dosagens individuais exatas podem ser ajustadas de alguma forma dependendo de uma variedade de fatores, incluindo a combinação específica dos agentes sendo administrados, o tempo de administração, a via de administração, a natureza da formulação, a taxa de excreção, a doença a ser tratada, a gravidade do distúrbio e a localização anatômica do distúrbio. Algumas variações na dosagem podem ser esperadas.

[00224] Para administração de qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita por injeção parentérica, a dosagem pode ser de cerca de 0,1 mg a cerca de 250 mg por dia, cerca de 1 mg a cerca de 20 mg por dia, ou cerca de 3 mg a cerca de 5 mg por dia. Geralmente, quando administrada oral ou parenteralmente, a dosagem de qualquer agente aqui descrito pode ser de cerca de 0,1 mg a cerca de 1.500 mg por dia, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 10 mg por dia, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg por dia, ou cerca de 200 a cerca de 1.200 mg por dia (*por exemplo*, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, cerca de 1.000 mg, cerca de 1.100 mg, cerca de 1.200 mg por dia).

[00225] Em modalidades, administração da proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrito é, por injeção parenteral numa dosagem de cerca de 0,1 mg a cerca de 1500 mg por tratamento, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 10 mg por tratamento, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg por tratamento, ou cerca de 200 a cerca de 1.200 mg por tratamento (*por exemplo*, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, cerca de 1.000 mg, cerca de 1.100 mg, cerca de 1.200 mg por tratamento).

[00226] Em modalidades, uma dosagem adequada da proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) está numa faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, ou cerca de 0,01 mg/kg a

cerca de 10 mg/kg de peso corporal do sujeito, por exemplo, cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,07 mg/kg cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,6 mg/kg 0,7 mg/kg, cerca de 0,8 mg/kg, cerca de 0,9 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 1,1 mg/kg, cerca de 1,2 mg/kg, cerca de 1,3 mg/kg, cerca de 1,4 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 1,6 mg/kg, cerca de 1,7 mg/kg, cerca de 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 7 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, cerca de 9 mg/kg, cerca de 10 mg/kg de peso corporal, incluindo todos os valores e faixas entre eles.

[00227] Numa outra modalidade, a distribuição pode ser numa vesícula, em particular um lipossoma (ver Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat *et al.*, in *Liposomes in therapy of Infectious Disease e Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989).

[00228] Qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada por meios de liberação controlada ou de liberação prolongada ou por dispositivos de distribuição que são bem conhecidos dos versados na técnica. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos nas Patentes US 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; e 5.733.556, cada um dos quais é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Essas formas de dosagem podem ser úteis para fornecer liberação controlada ou prolongada de um ou mais ingredientes ativos usando, por exemplo, hidropólipometil celulose, outras matrizes poliméricas, géis, membranas permeáveis, sistemas osmóticos, revestimentos de multicamadas, micropartículas, lipossomas, microesferas ou uma combinação dos mesmos para proporcionar o perfil de liberação desejado em proporções variáveis. A liberação controlada ou prolongada de um ingrediente ativo pode ser estimulada por várias condições, incluindo, entre

outras, alterações no pH, mudanças na temperatura, estimulação por um comprimento de onda apropriado de luz, concentração ou disponibilidade de enzimas, concentração ou disponibilidade de água ou outras condições fisiológicas ou compostos.

[00229] Numa outra modalidade, materiais poliméricos podem ser usados (*ver Medical Applications of Controlled Release*, Langer e Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design e Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger e Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; *ver também* Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105).

[00230] Numa outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado próximo à área alvo a ser tratada, exigindo apenas uma fração da dose sistêmica (*ver, por exemplo*, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release, supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Outros sistemas de liberação controlada discutidos na revisão por Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533) podem ser usados.

[00231] A administração de qualquer proteína químérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode, independentemente, ser uma a quatro vezes por dia ou uma a quatro vezes por mês ou uma a seis vezes por ano ou uma vez a cada dois, três, quatro ou cinco anos. A administração pode durar um dia ou um mês, dois meses, três meses, seis meses, um ano, dois anos, três anos, e pode até ser para a vida do sujeito.

[00232] O regime de dosagem utilizando qualquer proteína químérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrito pode ser selecionado de acordo com uma variedade de fatores incluindo tipo, espécie, idade, peso, sexo e condição médica do sujeito; a gravidade da condição a ser tratada; a via de administração; a função renal ou hepática do sujeito; a composição farmacogenômica do indivíduo; e o composto específico da

invenção utilizado. Qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada numa dose diária única ou a dosagem diária total pode ser administrada em doses divididas de duas, três ou quatro vezes ao dia. Além disso, qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada continuamente em vez de intermitentemente ao longo do regime de dosagem.

Células e Ácidos Nucleicos

[00233] Em modalidades, a presente invenção fornece um vetor de expressão, compreendendo um ácido nucleico que codifica a proteína quimérica aqui descrita. Em modalidades, o vetor de expressão compreende DNA ou RNA. Em modalidades, o vetor de expressão é um vetor de expressão de mamífero.

[00234] Ambos os vetores procarióticos e eucarióticos podem ser utilizados para expressão da proteína quimérica. Os vetores procarióticos incluem construtos baseados em sequências *E. coli* (ver, por exemplo, Makrides, *Microbiol Rev* 1996, 60:512-538). Exemplos não limitativos de regiões regulatórias que podem ser usadas para expressão em *E. coli* incluem lac, trp, lpp, phoA, recA, tac, T3, T7 e λP_L . Exemplos não limitativos de vetores de expressão procariótica podem incluir as séries de vetor λ gt tais como λ gt11 (Huynh *et al.*, em "DNA Cloning Techniques, Vol. I: A Practical Approach," 1984, (D. Glover, ed.), pp. 49-78, IRL Press, Oxford), e a série de vetores pET (Studier *et al.*, *Methods Enzymol* 1990, 185:60-89). Contudo, os sistemas de hospedeiro-vetor procariótico não podem realizar muito do processamento pós-traducional de células de mamíferos. Assim, os sistemas de vetores-hospedeiros eucarióticos podem ser particularmente úteis. Pode ser utilizada uma variedade de regiões reguladoras para expressão das proteínas químéricas em células hospedeiras de mamífero. Por exemplo, os promotores precoce e tardio de SV40, o promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMV) e o promotor de repetição terminal longa do vírus do sarcoma (RSV-LTR) podem ser utilizados. Os promotores indutíveis que podem ser úteis em

células de mamífero incluem, sem limitação, promotores associados com o gene da metalotioneína II, repetições terminais longas responsivas a glicocorticoide do vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV-LTR), o gene β-interferon e o gene hsp70 (ver, Williams *et al.*, *Cancer Res* 1989, 49:2735-42; e Taylor *et al.*, *Mol Cell Biol* 1990, 10:165-75). Os promotores de choque térmico ou promotores de estresse também podem ser vantajosos para direcionar a expressão das proteínas químéricas em células hospedeiras recombinantes.

[00235] Em modalidades, os vetores de expressão da invenção compreendem um ácido nucleico que codifica as proteínas químéricas (e/ou agentes adicionais), ou um complemento deste, operativamente ligado a uma região de controle da expressão, ou complemento desta, que é funcional numa célula de mamífero. A região de controle da expressão é capaz de dirigir a expressão do ácido nucleico que codifica o agente de bloqueio e/ou de estimulação operativamente ligado, de tal modo que o agente de bloqueio e/ou estimulação é produzido numa célula humana transformada com o vetor de expressão.

[00236] As regiões de controle de expressão são polinucleotídeos reguladores (por vezes aqui referidos como elementos), tais como promotores e intensificadores, que influenciam a expressão de um ácido nucleico operativamente ligado. Uma região de controle de expressão de um vetor de expressão da invenção é capaz de expressar ácido nucleico de codificação operativamente ligado numa célula humana. Numa modalidade, a célula é uma célula tumoral. Numa outra modalidade, a célula é uma célula não tumoral. Numa modalidade, a região de controle da expressão confere expressão regulável a um ácido nucleico operativamente ligado. Um sinal (às vezes denominado estímulo) pode aumentar ou diminuir a expressão de um ácido nucleico operativamente ligado a essa região de controle de expressão. Essas regiões de controle de expressão que aumentam a expressão em resposta a um sinal são frequentemente denominadas induzíveis. Essas

regiões de controle de expressão que diminui a expressão em resposta a um sinal são frequentemente denominadas repressíveis. Normalmente, ou aumento ou a diminuição conferida por esses elementos é proporcional à quantidade do sinal presente; quanto maior for a quantidade de sinal, maior será o aumento ou a diminuição na expressão.

[00237] Em uma modalidade, a presente invenção contempla o uso de promotores induzíveis capazes de efetuar um alto nível de expressão de forma transiente em resposta a um estímulo. Por exemplo, quando na proximidade de uma célula tumoral, uma célula transformada com um vetor de expressão para a proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) compreendendo essa sequência de controle de expressão é induzida para produzir transitoriamente um nível elevado do agente por exposição da célula transformada para uma sugestão apropriada. As regiões de controle de expressão induzíveis ilustrativas incluem aquelas que compreendem um promotor induzível que é estimulado com um estímulo, como um composto químico molecular pequeno. Podem ser encontrados exemplos particulares, por exemplo, nas Patente US 5.989.910, 5.935.934, 6.015.709 e 6.004.941, cada uma das quais é incorporada neste documento por referência na sua totalidade.

[00238] As regiões de controle de expressão e regiões de controle de locus incluem sequências promotoras de comprimento total, como promotor nativo e elementos potenciadores, bem como subsequências ou variantes polinucleotídicas que retêm toda ou parte da função de comprimento total ou não variante. Como usado neste instrumento, o termo "funcional" e suas variações gramaticais, quando usado em referência a uma sequência de ácido nucleico, subsequência ou fragmento significa que a sequência tem uma ou mais funções da sequência do ácido nucleico nativo (*por exemplo*, sequência não variante ou não modificada).

[00239] Como usado aqui, "ligação operável" se refere a uma justaposição física dos componentes então descritos para permitir

que eles funcionem da maneira pretendida. No exemplo de um elemento de controle de expressão na ligação operável com um ácido nucleico, a relação é tal que o elemento de controle modula a expressão do ácido nucleico. Normalmente, uma região de controle de expressão que modula a transcrição é justaposta próximo à extremidade 5' do ácido nucleico transcrito (*isto* é, a montante). As regiões de controle de expressão também podem ser localizadas na extremidade 3' da sequência transcrita (*isto* é, “a jusante”) ou dentro do transcrito (*por exemplo*, em um ítron). Os elementos de controlo de expressão podem estar localizados a uma distância da sequência transcrita (*por exemplo*, 100 a 500, 500 a 1.000, 2.000 a 5.000, ou mais nucleotídeos do ácido nucleico). Um exemplo específico de um elemento de controle de expressão é um promotor, que está normalmente localizado na posição 5' da sequência transcrita. Outro exemplo específico de um elemento de controle de expressão é um potenciador, que está normalmente localizado na posição 5' ou 3' da sequência transcrita ou dentro da sequência transcrita.

[00240] Sistemas de expressão funcionais em células humanas são bem conhecidos na técnica e incluem sistemas virais. Geralmente, um promotor funcional numa célula humana é qualquer sequência de DNA capaz de ligar a RNA polimerase de mamífero e iniciar a transcrição a jusante (3') de uma sequência de codificação em mRNA. Um promotor terá uma região de iniciação de transcrição, que é normalmente colocada próxima da extremidade 5' da sequência de codificação, e tipicamente uma TATA box localizada 25-30 pares de bases a montante do sítio de iniciação da transcrição. Acredita-se que a caixa TATA direcione a RNA polimerase II para iniciar a síntese de RNA no sítio correto. Um promotor também conterá tipicamente um elemento promotor a montante (elemento intensificador), tipicamente localizado dentro de 100 a 200 pares de bases a montante da caixa TATA. Um elemento promotor a montante determina a taxa na qual a transcrição é iniciada e pode atuar em qualquer orientação. De particular utilidade como promotores são os promotores de genes virais de mamífero,

uma vez que os genes virais são frequentemente altamente expressos e possuem uma ampla faixa de hospedeiros. Exemplos incluem o promotor precoce de SV40, o promotor de LTR do vírus do tumor mamário de camundongo, o promotor tardio principal de adenovírus, o promotor do vírus herpes simplex e o promotor de CMV.

[00241] Tipicamente, as sequências de terminação de transcrição e poliadenilação reconhecidas por células de mamíferos são regiões reguladoras localizadas a 3' do códon de parada da tradução e, portanto, juntamente com os elementos promotores, flanqueiam a sequência de codificação. O terminal 3' do mRNA maduro é formado por clivagem e poliadenilação pós-tradução específica do sítio. Exemplos de sinais de terminação de transcrição e poliadenilação incluem os derivados de SV40. Íntrons também podem ser incluídos em construtos de expressão.

[00242] Há uma variedade de técnicas disponíveis para introduzir ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas adequadas para a transferência de ácido nucleico para células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, eletroporação, microinjecção, fusão celular, sistemas à base de polímeros, DEAE-dextrano, transdução viral, o método de precipitação com fosfato de cálcio, etc. Para uma transferência de um gene *in vivo*, inúmeras técnicas e reagentes também podem ser usados, incluindo lipossomas; veículos de administração à base de polímeros naturais, como quitosano e gelatina; vetores virais também são adequados para a transdução *in vivo*. Em algumas situações é desejável oferecer um agente de direcionamento, como um anticorpo ou ligante específico para uma proteína membrana da superfície da célula de tumor. Quando lipossomas forem utilizados, as proteínas que se ligam a uma proteína membrana da superfície da célula associada com endocitose podem ser utilizadas para o direcionamento e/ou para facilitar a captura, *por exemplo*, de proteínas de capsídeo ou fragmentos trópicos dos mesmos para um tipo celular particular, anticorpos para proteínas que sofrem internalização no ciclo e proteínas que se

direcional à localização intracelular e aumentam a meia-vida intracelular. A técnica de endocitose mediada por receptor é descrita, por exemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); e Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990).

[00243] Quando apropriado, os agentes de administração de genes, como, *por exemplo*, as sequências de integração, também podem ser usados. Numerosas sequências de integração são conhecidas na técnica (*ver, por exemplo*, Nunes-Duby *et al.*, Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005; Plasterk *et al.*, TIG 15:326-332, 1999; Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). Estes incluem recombinases e transposases. Exemplos incluem Cre (Sternberg e Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), Lambda (Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), Flp (Broach, *et al.*, Cell, 29:227-234, 1982), R (Matsuzaki, *et al.*, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31 (*ver, por exemplo*, Groth *et al.*, J. Mol. Biol. 335: 667-678, 2004), sleeping beauty, transposases de uma família marinha (Plasterk, *et al.*, supra) e componentes para integração de vírus, como AAV, retrovírus e antivírus com componentes que proporcionam a integração de um vírus, como as sequências de LTR de retrovírus e lentivírus e as sequências de ITR de AAV (Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003). Adicionalmente, podem ser utilizadas podem ser utilizadas estratégias de integração para inserir sequências de ácidos nucleicos que codificam as proteínas de fusão químéricas incluindo as tecnologias de edição de gene CRISPR/CAS9, dedo de zinco, TALEN e meganuclease.

[00244] Em um aspecto, a invenção fornece vetores de expressão para a expressão das proteínas químéricas (e/ou agentes adicionais) que são vetores virais. Muitos vetores virais úteis para terapia genética são conhecidos (*ver, por exemplo*, Lundstrom, Trends Biotechnol., 21:1 17, 122, 2003. Vectores virais ilustrativos incluem aqueles selecionados de Antivírus (LV), retrovírus (RV), adenovírus (AV), vírus adenoassociados

(AAV) e vírus α, embora outros vetores virais também possam ser usados. Para usos *in vivo*, os vetores virais que não se integram no genoma hospedeiro são adequados para utilização, tais como vírus α e adenovírus. Tipos ilustrativos de vírus α incluem o vírus Sindbis, o vírus da encefalite equina venezuelana (VEE) e o vírus da floresta de Semliki (SFV). Para usos *in vitro*, vetores virais que se integram no genoma do hospedeiro são adequados, tais como retrovírus, AAV e antivírus. Numa modalidade, a invenção proporciona métodos de transdução de uma célula humana *in vivo*, compreendendo contatar um tumor sólido *in vivo* com um vetor viral da invenção.

[00245] Em modalidades, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira, compreendendo o vetor de expressão compreendendo a proteína quimérica aqui descrita.

[00246] Vetores de expressão podem ser introduzidos em células hospedeiras para produzir as presentes proteínas quiméricas. As células podem ser cultivadas *in vitro* ou ser geneticamente modificadas, por exemplo. As células hospedeiras de mamífero úteis incluem, sem limitação, células derivadas de seres humanos, macacos e roedores (*ver, por exemplo, Kriegler in "Gene Transfer e Expression: A Laboratory Manual," 1990, New York, Freeman & Co.*). Estas incluem linhagens celulares de rim de macaco transformadas por SV40 (*por exemplo, COS-7, ATCC CRL 1651*); linhagens de rim embrionárias humanas (*por exemplo, 293, 293-EBNA, ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., J Gen Viro 1977, 36:59*); células de rim de hamster bebê (*por exemplo, BHK, ATCC CCL 10*); células de ovário de hamster chinês-DHFR (*por exemplo, CHO, Urlaub e Chasin, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216*); células DG44 CHO, células CHO-K1, células de Sertoli de camundongo (Mather, *Biol Reprod* 1980, 23:243-251); células de fibroblasto de camundongo (*por exemplo, NIH-3T3*), células de rim de macaco (*por exemplo, CV1 ATCC CCL 70*); células de rim de macaco verde Africano (*por exemplo, VERO-76, ATCC CRL-1587*); células de carcinoma cervical humano (*por exemplo, HELA, ATCC CCL 2*); células renais

caninas (*por exemplo*, MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (*por exemplo*, BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (*por exemplo*, W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (*por exemplo*, Hep G2, HB 8065); e células de tumor mamário de camundongo (*por exemplo*, MMT 060562, ATCC CCL51). Tipos ilustrativos de células cancerígenas para expressar as proteínas quiméricas descritas neste documento incluem linhagem celular de fibroblastos de camundongo, NIH3T3, linhagem celular de carcinoma de pulmão de Lewis de camundongo, LLC, linhagem celular de mastocitoma de camundongo, P815, linhagem celular de linfoma de camundongo, EL4 e seu transfectante de ovalbumina, E.G7, linhagem celular de melanoma de camundongo, B16F10, linhagem celular de fibrossarcoma de camundongo, MC57, e linhagens celulares de carcinoma do pulmão de pequenas células humanas, SCLC #2 e SCLC #7.

[00247] As células hospedeiras podem ser obtidas a partir de indivíduos normais ou afetados, incluindo humanos saudáveis, pacientes com câncer e pacientes com doenças infecciosas, depósitos privados de laboratório, coleções de cultura pública, como a American Type Culture Collection, ou fornecedores comerciais.

[00248] Células que podem ser usadas para produção das presentes proteínas quiméricas *in vitro*, *ex vivo*, e/ou *in vivo* incluem, sem limitação, células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células musculares, hepatócitos; células sanguíneas, tais como linfócitos T, linfócitos B, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariócitos, granulócitos; várias células estaminais ou progenitoras, em especial células estaminais hematopoiéticas ou progenitoras (*por exemplo*, como obtido da medula óssea), sangue do cordão umbilical, sangue periférico, fígado fetal, etc. A escolha do tipo de célula depende do tipo de tumor ou doença infecciosa a serem tratados ou prevenidos e pode ser determinado por alguém versado na técnica.

[00249] A produção e purificação de macromoléculas

contendo Fc (como anticorpos monoclonais) tornou-se um processo padronizado, com pequenas modificações entre os produtos. Por exemplo, muitas macromoléculas contendo Fc são produzidas por células de rim embrionário humano (HEK) (ou variantes das mesmas) ou células de ovário de hamster chinês (CHO) (ou variantes dos mesmos) ou, em alguns casos, por métodos bacterianos ou sintéticos. Após a produção, as macromoléculas contendo Fc que são segregadas por células HEK ou CHO são purificadas através da ligação a colunas de Proteína A e subsequentemente "polidas" usando vários métodos. De um modo geral, as macromoléculas contendo Fc purificadas são armazenadas na forma líquida durante algum período de tempo, congeladas durante longos períodos de tempo ou, em alguns casos, liofilizadas. Em modalidades, a produção das proteínas quiméricas aqui contempladas pode ter características únicas em comparação com macromoléculas contendo Fc tradicionais. Em certos exemplos, as proteínas quiméricas podem ser purificadas utilizando resinas de cromatografia específicas, ou utilizando métodos de cromatografia, que não dependem de captura de Proteína A. Em modalidades, as proteínas quiméricas podem ser purificadas num estado oligomérico, ou em vários estados oligoméricos, e enriquecida para um estado oligomérico específico utilizando métodos específicos. Sem estarem limitados pela teoria, estes métodos podem incluir tratamento com tampões específicos incluindo concentrações de sal especificadas, pH e composições aditivas. Em outros exemplos, tais métodos podem incluir tratamentos que favorecem um estado oligomérico em detrimento de outro. As proteínas quiméricas aqui obtidas podem ser adicionalmente "polidas" utilizando métodos que são especificados na técnica. Em modalidades, as proteínas quiméricas são altamente estáveis e capazes de tolerar uma ampla faixa de exposição ao pH (entre 3-12), são capazes de tolerar um grande número de estresses de congelamento/descongelamento (mais de 3 ciclos de congelamento/descongelamento) e são capazes de tolerar incubação prolongada a altas temperaturas (mais de 2 semanas a 40 graus C).

Em modalidades, mostra-se que as proteínas químéricas permanecem intactas, sem evidência de degradação, desamidação, etc., sob tais condições de estresse.

Sujeitos e/ou Animais

[00250] Em modalidades, o sujeito e/ou animal é um mamífero, *por exemplo*, ser humano, camundongo, rato, porquinho-da-índia, cão, gato, cavalo, vaca, porco, coelho, ovelha ou um primata não humano, como um macaco, chimpanzé ou babuíno. Em modalidades, o sujeito e/ou animal é um não mamífero, como, *por exemplo*, um peixe-zebra. Em modalidades, o sujeito e/ou animal pode compreender células marcadas com fluorescência (com, *por exemplo*, GFP). Em modalidades, o sujeito e/ou animal é um animal transgênico que compreende uma célula fluorescente.

[00251] Em modalidades, o sujeito e/ou animal é um ser humano. Em modalidades, o humano é um ser humano pediátrico. Em modalidades, o ser humano é um ser humano adulto. Em modalidades, o ser humano é um ser humano geriátrico. Em modalidades, o ser humano pode ser referido como um paciente.

[00252] Em determinadas modalidades, o humano tem uma idade em uma faixa de 0 mês a cerca de 6 meses, de 6 a cerca de 12 meses, de cerca de 6 meses a cerca de 18 meses de idade, de cerca de 18 a cerca de 36 meses de idade, de cerca de 1 a cerca de 5 anos de idade, de cerca de 5 a cerca de 10 anos de idade, de cerca de 10 a cerca de 15 anos de idade, de cerca de 15 a cerca de 20 anos de idade, de cerca de 20 a cerca de 25 anos de idade, de cerca de 25 a cerca de 30 anos de idade, de cerca de 30 a cerca de 35 anos de idade, de cerca de 35 a cerca de 40 anos, de cerca de 40 a cerca de 45 anos de idade, de cerca de 45 a cerca de 50 anos de idade, de cerca de 50 a cerca de 55 anos de idade, de cerca de 55 a cerca de 60 anos de idade, de cerca de 60 a cerca de 65 anos de idade, de cerca de 65 a cerca de 70 anos de idade, de cerca de 70 a cerca de 75 anos de idade, de cerca de 75 a cerca de 80 anos de idade, de cerca de 80 a cerca de 85 anos

de idade, de cerca de 85 a cerca de 90 anos de idade, de cerca de 90 a cerca de 95 anos de idade ou de cerca de 95 a cerca de 100 anos de idade.

[00253] Em modalidades, o indivíduo é um animal não humano e, portanto, a invenção diz respeito ao uso veterinário. Em uma modalidade específica, o animal não humano é um animal doméstico. Em uma outra modalidade específica, o animal não humano é um animal de gado.

Kits

[00254] A invenção proporciona kits que podem simplificar a administração de qualquer agente aqui descrito. Um kit ilustrativo da invenção compreende qualquer composição aqui descrita na forma de dosagem unitária. Numa modalidade, a forma de dosagem unitária é um recipiente, tal como uma seringa pré-cheia, que pode ser estéril, contendo qualquer agente aqui descrito e um carreador, diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. O kit pode ainda compreender um rótulo ou instruções impressas instruindo o uso de qualquer agente aqui descrito. O kit também pode incluir um espéculo de tampa, anestésico tópico e um agente de limpeza para o local de administração. O kit também pode compreender adicionalmente um ou mais agentes adicionais aqui descritos. Numa modalidade, o kit compreende um recipiente contendo uma quantidade eficaz de uma composição da invenção e uma quantidade eficaz de outra composição, como as aqui descritas.

[00255] Qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita pode ser combinada com qualquer outro aspecto ou modalidade, como aqui divulgado.

[00256] A invenção será descrita ainda nos exemplos a seguir, que não limitam o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Caracterização de Proteínas Quiméricas

TIGIT-Fc-OX40L

[00257] Neste exemplo, proteínas quiméricas

compreendendo os domínios TIGIT e OX40L foram caracterizadas bioquimicamente e funcionalmente.

[00258] Prepararam-se proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L murinas e proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L humanas; seus esquemas são mostrados no topo da **FIG. 3A** e **FIG. 3B**. As proteínas quiméricas mTIGIT-Fc-OX40L e hTIGIT-Fc-OX40L foram executadas em SDS-PAGE sob condições de redução, após o tratamento com a enzima de desglicosilação N+O, e/ou depois de ferver. Os Western blots das proteínas quiméricas mTIGIT-Fc-OX40L e hTIGIT-Fc-OX40L indicaram a presença de uma banda dimérica dominante nas faixas não reduzidas (**FIG. 3A** e **FIG. 3B**, coluna 2 em cada mancha), que foi reduzida a uma banda monomérica glicosilada na presença do agente redutor, β-mercaptoetanol (**FIG. 3A** e **FIG. 3B**, coluna 3, cada mancha). Como mostrado na **FIG. 3A** e **3B**, faixa 3 em cada mancha, a proteína química executou como um monômero na presença de um agente redutor (β-mercaptoetanol) e de uma endoglicosidase (PNGase).

[00259] As capacidades de ligação das proteínas quiméricas mTIGIT-Fc-OX40L e proteínas quiméricas hTIGIT-Fc-OX40L foram então ensaiadas. Para cada proteína química, os ELISAs foram realizados sob as seguintes condições: Cadeia pesada+leve capturada e detectada com Fc-HRP (**FIG. 4A** e **FIG. 4B**, esquerda superior), CD155/PVR-His capturada e detectada com IgG (**FIG. 4A** e **FIG. 4B**, direita superior), e OX40-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mOX40L (**FIG. 4A** e **FIG. 4B**, esquerda superior). A proteína química mTIGIT-Fc-OX40L foi capturada com OX40-Fc e detectada com um CD155 recombinante (**FIG. 4A**, direita inferior, “Dual ELISA”) e a proteína química hTIGIT-Fc-OX40L foi OX40-Fc capturada e detectada com uma proteína CD155, CD112 ou CD113 recombinante (**FIG. 4A**, direita inferior, “ELISA Duplo”). Estes dados indicam que a proteína química mTIGIT-Fc-OX40L e as proteínas quiméricas hTIGIT-Fc-OX40L ligam cada um dos seus alvos e podem ligar ambos os alvos contemporaneamente.

[00260] Análises adicionais foram realizadas para determinar se a proteína quimérica mTIGIT-Fc-OX40L poderia se ligar a seus alvos na superfície de células vivas. Foi gerada uma linhagem celular para sobre-expressar PVR humana (isto é, CHOK1/PVR); estas células são úteis para detectar a ligação de um construto contendo TIGIT contendo a PVR associado à membrana celular. Ver, **FIG. 5A**. Foi gerada uma linhagem celular para sobre-expressar Nectina-2 (isto é, CHOK1/Nectina2); estas células são úteis para detectar a ligação de um construto contendo TIGIT à Nectina-2 associada à membrana celular. Ver, **FIG. 5B**. Foi gerada uma linhagem celular para sobre-expressar Nectina-3 (isto é, CHOK1/Nectina3); estas células são úteis para detectar a ligação de um construto contendo TIGIT à Nectina-3 associada à membrana celular. Ver, **FIG. 5C**. Foi preparada outra linhagem celular que sobre-expresa mOX40 (isto é, CHOK1-mOX40). Cada uma das linhagens celulares baseou-se no ovário de hamster chinês K1 (CHOK1).

[00261] A proteína quimérica mTIGIT-Fc-OX40L ou proteína quimérica mPD-1-Fc-OX40L foi incubada com as linhagens celulares parentais e de sobre-expressão durante 2 horas. As células foram recolhidas, lavadas e coradas com anticorpos para a detecção da ligação da proteína quimérica por citometria de fluxo. Como mostrado na **FIG. 6** (esquerda e direita inferiores) e, como esperado, as proteínas químéricas não se ligaram à linhagem celular progenitora e à qualquer concentração de proteína químérica. No entanto, mTIGIT-Fc-OX40L ligou-se à linhagem celular engenheirada CHOK1/PVR de uma maneira dependente da concentração; com base nesses dados, foi calculado um valor de EC₅₀ de 4,634 nM. Ver, **FIG. 6** (esquerda superior). Em contraste, o mPD-1-Fc-OX40L não se liga a nenhuma linhagem celular engenheirada. Tal como com a linhagem celular engenheirada CHOK1/PVR, a proteína químérica mTIGIT-Fc-OX40L também se ligou à linhagem celular engenheirada CHOK1-mOX40 de um modo dependente da concentração; com base nesses dados, foi calculado um valor EC₅₀ de 1,7 nM. Ver, **FIG. 6** (direita). Estes dados indicam que os diferentes componentes da

proteína quimérica são cada um capazes de se ligar aos seus receptores/ligandos respectivos nas células vivas.

[00262] Em seguida, uma tela de microarranjo foi conduzida para identificar outros parceiros de ligação de hTIGIT-Fc-OX40L. A **FIG. 7** é uma tabela de resultados que mostra os parceiros de ligação identificados de hTIGIT-Fc-OX40L a partir de um microarranjo (contendo cerca de 6.000 proteínas da membrana humana). Cada parceiro de ligação esperado para hTIGIT-Fc-OX40L foi identificado pelo rastreio. Não houve evidência de ligação não específica a outras proteínas humanas e a ligação a Galectina-1 é observada no rastreio de todas as proteínas de fusão contendo Fc.

Exemplo 2: Caracterização de Proteínas Quiméricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT

[00263] Neste exemplo, proteínas quiméricas compreendendo os domínios LIGHT e CD172a(SIRP α) foram caracterizadas bioquimicamente e funcionalmente.

[00264] Prepararam-se proteínas quiméricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT murinas e proteínas quiméricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humanas; seus esquemas são mostrados no topo da **FIG. 8A** e **FIG. 8B**. As proteínas quiméricas mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT foram executadas em SDS-PAGE sob condições redutoras, após tratamento com a enzima de desglicosilação de N+O, e/ou após ferver. Os Western blots das proteínas quiméricas mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT indicaram a presença de uma banda dimérica dominante nas faixas não reduzidas (**FIG. 8A** e **FIG. 8B**, coluna 2 em cada mancha), que foi reduzida a uma banda monomérica glicosilada na presença do agente redutor, β -mercaptoetanol (**FIG. 8A** e **FIG. 8B**, coluna 3, cada mancha). Como mostrado na **FIG. 8A** e **8B**, faixa 3 em cada mancha, a proteína quimérica executou como um monômero na presença de um agente redutor (β -mercaptoetanol) e de uma endoglicosidase (PNGase).

[00265] As capacidades de ligação das proteínas

quiméricas mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e proteínas quiméricas hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT foram então ensaiadas. Para cada proteína químérica, os ELISAs foram realizados sob as seguintes condições: Cadeia pesada+leve capturada e detectada com Fc-HRP (**FIG. 9A** e **FIG. 9B**, esquerda superior), CD47-His capturada e detectada com IgG (**FIG. 9A** e **FIG. 9B**, direita superior), uma LTBR-His murina capturada e detectada com um anticorpo dirigido para LIGHT murina (**FIG. 9A**, esquerda inferior) ou LTBR-His humana capturada e detectada com um anticorpo dirigido para LIGHT humana (**FIG. 9B**, esquerda inferior), e LTBR His+GST capturada e detectada com um anticorpo dirigido para SIRP α (**FIG. 9A** e **FIG. 9B**, direita inferior, "ELISA Duplo"). Estes dados indicam que a proteína químérica mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e as proteínas quiméricas hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT ligam cada um dos seus alvos e podem ligar ambos os alvos contemporaneamente.

[00266] Análises adicionais foram realizadas para determinar se a proteína químérica mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT poderia se ligar a seus alvos na superfície de células vivas. Células CHO-K1 expressando CD47 murina (**FIG. 10A**, esquerda) ou células CHO-K1 expressando LTbR murina (**FIG. 10A**, direita) foram preparadas.

[00267] A proteína químérica mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT foi incubada com as linhagens celulares parentais e de sobre-expressão durante 2 horas. As células foram recolhidas, lavadas e coradas com anticorpos para a detecção da ligação da proteína químérica por citometria de fluxo. Como mostrado na **FIG. 10A** (esquerda) e, como esperado, as proteínas quiméricas não se ligaram à linhagem celular progenitora e à qualquer concentração de proteína químérica. No entanto, mCD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT ligou a linhagem celular engenheirada mCD47 (**FIG. 10A**, esquerda) e a linhagem celular engenheirada mLtbR (**FIG. 10A**, direita) em maneiras dependentes da concentração; com base nesses dados um valor de EC₅₀ para CD47 de 18 nM e para mCD172a(SIRP α) de 24 nM foram calculados. Adicionalmente, a proteína químérica hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT foi incubada

com a linhagem celular de sobre-expressão de mCD47. O hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT ligou a linhagem celular engenheirada mCD47 (**FIG. 10B**) de maneira dependente da concentração; com base nesses dados um valor de EC₅₀ de 57 nM foi calculado. Estes dados indicam que os diferentes componentes da proteína químérica são cada um capazes de se ligar aos seus receptores/ligandos respectivos nas células vivas.

[00268] A incapacidade da proteína químérica TIGIT-Fc-OX40L humana de se ligar aos glóbulos vermelhos e, desse modo, causar hemólise foi então testada. Aqui, os anticorpos específicos hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40, ou CD47 (Ione CC2C6 ou CC900002) foram contatados com glóbulos vermelhos de macacos cynomolgus (RBCs; **FIG. 11A**, esquerda superior e inferior) ou RBCs humanas (**FIG. 11B** e **FIG. 11C**, todos os painéis). Quando comparado com tratamentos com Triton-X (como um controle positivo), nem hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT nem hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40 causaram lise significativa de RBCs de macacos cynomolgus (**FIG. 11A**, esquerda inferior); uma placa de exemplo é mostrada (**FIG. 11A**, direita). Nem hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT nem hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40 se ligaram significativamente a eritrócitos humanos (**FIG. 11B**, todos os painéis). Quando comparado com tratamentos com Triton-X (como um controle positivo), hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT ou hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40 causou níveis quase indetectáveis de lise de RBCs humanas (**FIG. 11C**, todos os painéis); uma placa de exemplo é mostrada (**FIG. 11C**, direita). Estes dados indicam que hCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e hCD172a(SIRP α)-Fc-CD40 não causam hemólise de eritrócitos humanos como um efeito secundário indesejado.

Exemplo 3: Caracterização de Proteínas Químéricas PD-1-Fc-LIGHT

[00269] Neste exemplo, proteínas químéricas compreendendo os domínios LIGHT e PD-1 foram caracterizadas bioquimicamente e funcionalmente.

[00270] Prepararam-se proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT murinas e proteínas quiméricas PD-1-Fc-LIGHT humanas; os seus esquemas são mostrados no topo da **FIG. 12A** e **FIG. 12B**. As proteínas quiméricas mPD-1-Fc-LIGHT e hPD-1-Fc-LIGHT foram executadas em SDS-PAGE sob condições de redução, após o tratamento com a enzima de desglicosilação N+O, e/ou depois de ferver. Os Western blots das proteínas quiméricas mPD-1-Fc-LIGHT e hPD-1-Fc-LIGHT indicaram a presença de uma banda dimérica dominante nas faixas não reduzidas (**FIG. 12A** e **FIG. 12B**, coluna 2 em cada mancha), que foi reduzida a uma banda monomérica glicosilada na presença do agente redutor, β -mercaptoetanol (**FIG. 12A** e **FIG. 12B**, coluna 3, cada mancha). Como mostrado na **FIG. 12A** e **12B**, faixa 3 em cada mancha, a proteína quimérica executou como um monômero na presença de um agente redutor (β -mercaptoetanol) e de uma endoglicosidase (PNGase).

[00271] As capacidades de ligação das proteínas quiméricas mPD-1-Fc-LIGHT e proteínas quiméricas hPD-1-Fc-LIGHT foram então ensaiadas. Para cada proteína quimérica, os ELISA foram realizados sob as seguintes condições: Cadeia pesada+leve capturada e detectada com Fc-HRP (**FIG. 13A** e **FIG. 13B**, esquerda superior), uma LTBR-His murina capturada e detectada com um anticorpo dirigido para LIGHT murina (**FIG. 13A**, direita superior) ou LTBR-His humana capturada e detectada com LIGHT humana biotinilada (**FIG. 13B**, direito superior) e mPD-L1 capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mLIGHT (**FIG. 13A**, esquerda inferior; “ELISA Duplo”) ou hPDL1-Fc capturada e detectada com hLTBR-His/6x His-HRP (**FIG. 13A**, esquerda inferior; “ELISA Duplo”). Estes dados indicam que a proteína quimérica mPD-1-Fc-LIGHT e as proteínas quiméricas hPD-1-Fc-LIGHT ligam cada um dos seus alvos e podem ligar ambos os alvos contemporaneamente.

[00272] Análises adicionais foram realizadas para determinar se a proteína quimérica PD-1-Fc-LIGHT murina (**FIG. 14A**) ou proteína quimérica PD-1-Fc-LIGHT humana (**FIG. 14A**) pode ligar seus alvos

na superfície das células vivas. Células CHO-K1 expressando mPD-L1 murina (**FIG. 14A**, esquerda), células CHO-K1 expressando LTbR murina (**FIG. 14A**, direita) e células CHO-K1 expressando mPD-L1 humana (**FIG. 14B**, esquerda), foram preparadas. A proteína quimérica mPD-1-Fc-LIGHT foi incubada com as linhagens celulares parentais e de sobre-expressão durante 2 horas. As células foram recolhidas, lavadas e coradas com anticorpos para a detecção da ligação da proteína quimérica por citometria de fluxo. Como mostrado na **FIG. 14A** (esquerda e direita) e, como esperado, a proteína quimérica mPD-1-Fc-LIGHT não se ligou às linhagens celulares progenitoras e à qualquer concentração de proteína quimérica. No entanto, mPD-1-Fc-LIGHT ligou a linhagem celular engenheirada mPD-L1 (**FIG. 14A**, esquerda) e a linhagem celular engenheirada mLbR (**FIG. 14A**, direita) de maneiras dependentes da concentração. Adicionalmente, a proteína quimérica hPD-1-Fc-LIGHT foi incubada com a linhagem celular de sobre-expressão de hPD-L1. O hPD-1-Fc-LIGHT ligou a linhagem celular engenheirada hPD-L1 (**FIG. 14B**) de uma maneira dependente da concentração; com base nesses dados um valor de EC₅₀ de 48 nM foi calculado. Estes dados indicam que os diferentes componentes da proteína quimérica são cada um capazes de se ligar aos seus receptores/ligandos respectivos nas células vivas.

Exemplo 4: Caracterização de Proteínas Quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT

[00273] Neste exemplo, proteínas quiméricas compreendendo os domínios TIGIT e LIGHT foram caracterizadas bioquimicamente e funcionalmente.

[00274] Prepararam-se proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT murinas e proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT humanas; os seus esquemas são mostrados no topo da **FIG. 15A** e **FIG. 15B**. As proteínas quiméricas mTIGIT-Fc-LIGHT e hTIGIT-Fc-LIGHT foram executadas em SDS-PAGE sob condições de redução, após o tratamento com a enzima de desglicosilação N+O, e/ou depois de ferver. Os Western blots das proteínas

quiméricas mTIGIT-Fc-LIGHT e hTIGIT-Fc-LIGHT indicaram a presença de uma banda dimérica dominante nas faixas não reduzidas (**FIG. 15A** e **FIG. 15B**, coluna 2 em cada mancha), que foi reduzida a uma banda monomérica glicosilada na presença do agente redutor, β -mercaptoetanol (**FIG. 15A** e **FIG. 15B**, coluna 3, cada mancha). Como mostrado na **FIG. 15A** e **15B**, faixa 3 em cada mancha, a proteína químérica executou como um monômero na presença de um agente redutor (β -mercaptoetanol) e de uma endoglicosidase (PNGase).

[00275] As capacidades de ligação das proteínas quiméricas mTIGIT-1-Fc-LIGHT e proteínas quiméricas hTIGIT-1-Fc-LIGHT foram então ensaiadas. Para cada proteína químérica, os ELISA foram realizados sob as seguintes condições: Cadeia pesada+leve capturada e detectada com Fc-HRP (**FIG. 16A** e **FIG. 16B**, esquerda superior), CD155/PVR capturada e detectada com Fc-HRP (**FIG. 16A**, direita superior) ou CD155-His capturada e detectada com (**FIG. 16B**, direito superior) e mLTR-His capturada e detectada com um anticorpo dirigido para mLIGHT (**FIG. 16A**, esquerda inferior) ou hCD155-Fc capturada e detectada com hLTBR-His/6x His-HRP (**FIG. 16B**, esquerda inferior; “ELISA Duplo”). Estes dados indicam que a proteína químérica mTIGIT-1-Fc-LIGHT e as proteínas quiméricas hTIGIT-1-Fc-LIGHT ligam cada um dos seus alvos e pelo menos o hTIGIT-1-Fc-LIGHT pode ligar ambos os alvos contemporaneamente.

[00276] Análises adicionais foram realizadas para determinar se a proteína químérica TIGIT-1-Fc-LIGHT murina (**FIG. 17**) pode ligar seus alvos na superfície das células vivas.

[00277] A proteína químérica mTIGIT-1-Fc-LIGHT ou a proteína químérica mPD-1-Fc-LIGHT foi incubada células CHO-K1 expressando PVR murina ou expressando Nectina-2 murina (**FIG. 17**, superior esquerdo), células CHO-K1 expressando LTbR murina (**FIG. 17A**, direita) ou células CHO-K1 parentais (**FIG. 17**, direita e esquerda inferiores).

[00278] Como mostrado na **FIG. 17** (esquerda inferior), e como esperado, nem a proteína químérica mTIGIT-1-Fc-LIGHT nem

a proteína quimérica mPD-1-Fc-LIGHT se ligaram às linhagens celulares progenitoras, exceto na concentração mais elevada da proteína quimérica. No entanto, o mTIGIT-1-Fc-LIGHT ligou a linhagem celular engenheirada mPVR de uma maneira dependente da concentração; com base nestes dados um valor de EC₅₀ de 214,9 nM (**FIG. 17**, superior esquerda). O mTIGIT-1-Fc-LIGHT também ligou a linhagem celular engenheirada mLtbR de uma maneira dependente da concentração; com base nesses dados um valor de EC₅₀ de 11 nM foi calculado (**FIG. 17**, direita). Estes dados indicam que os diferentes componentes da proteína quimérica são cada qual capazes de se ligar aos seus receptores/ligandos respectivos nas células vivas.

Exemplo 5: Caracterização Adicional de Proteínas Quiméricas

[00279] Neste exemplo, outras experiências foram realizadas com as proteínas quiméricas TIGIT-Fc-LIGHT humana, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humana, PD-1-Fc-LIGHT humana, PD-1-Fc-LIGHT humana, TIGIT-Fc-OX40L humana, TIGIT-Fc-LIGHT humana, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humana.

[00280] As medições de afinidade de ligação para TIGIT-Fc-LIGHT, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, ou PD-1-Fc-LIGHT humana para LTbR humana foram recolhidas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet (ver, **FIG. 18A**, todos os painéis). As medições de afinidade de ligação para PD-1-Fc-LIGHT humana a PD-L1 ou PD-L2 humana recombinante através de uma faixa de concentrações foram recolhidas por interferometria de biocamada utilizando um sistema Octet (ver, **FIG. 18B**).

[00281] Medições de afinidade de ligação de TIGIT-Fc-OX40L e TIGIT-Fc-LIGHT humanas a CD155/PVR humana recombinante (em comparação com um controle de proteína de fusão TIGIT-Fc unilateral) foram recolhidas por interferometria de biocamada utilizando um sistema Octet (ver, **FIG. 19A**) Medições de afinidade de ligação de CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT humana a CD47 humana recombinante (em comparação com um controle

CD172a(SIRP α)-Fc unilateral, ou um dos dois controles de anticorpos específicos de CD47) foram recolhidas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet (ver, **FIG. 19B**). Medições de afinidade de ligação de PD-1-Fc-LIGHT humana a PD-L1 humana recombinante (em comparação com um controle de PD-1-Fc de lado único ou um controle anti-PD-L1:Atezolizumabe) foram recolhidas por interferometria de biocamada usando um sistema Octet (ver, **FIG. 19C**). Medições de afinidade de ligação de CD172a humana(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT ou PD-1-Fc-LIGHT a LTbR humana recombinante (em comparação com um controle de proteína de fusão LIGHT-Fc de lado único ou um Anticorpo LTbR) foram recolhidas por interferometria de biocamada utilizando um sistema Octet (ver, **FIG. 19D**).

[00282] Uma capacidade funcional das proteínas quiméricas contendo o domínio LIGHT ou proteínas quiméricas contendo o domínio TIGIT foi determinada em um ensaio de liberação de citocinas de superantígeno. Aqui, concentrações crescentes de enterotoxina de estafilococos B (SEB) foram usadas para ativar leucócitos do sangue periférico humano na presença de vários agentes de teste. A quantidade de IL-2 (**FIG. 20A**) ou TNF α (**FIG. 20B**) segregada para o sobrenadante de cultura foi monitorizada como uma leitura funcional da capacidade dos agentes de teste para bloquear eventos de sinalização supressora ou coestimular sinais de ativação imunes.

[00283] As **FIG. 20A** e **FIG. 20B** mostram ensaios de liberação de citocinas de superantígeno que demonstram os efeitos dos diferentes anticorpos, proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L murina, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT murina, TIGIT-Fc-LIGHT murina ou PD-1-Fc-LIGHT murina sobre leucócitos de sangue periférico murino ativados por SEB. A **FIG. 20C** mostra uma compilação dos dados através das concentrações de múltiplos superantígenos (SEB). Como mostrado na **FIG. 20A** e **FIG. 20C**, quando foram administrados 50 e 200 ng/ml de SEB, cada uma das três concentrações (10 nM, 100 nM e 250 nM) para mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT e

mPD-1-Fc-LIGHT forneceu significativamente maior secreção de IL2 do que todos os controlos de anticorpos. Como mostrado na **FIG. 20B**, quando foram administrados 50 e 200 ng/ml de SEB, a concentrações de 100 nm ou 250 nm, mPD-1-Fc-LIGHT proporcionou uma secreção significativamente maior de TNF α do que todos os controlos de anticorpos; quando foram administrados 200 ng/ml de SEB, todas as três concentrações de mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, proporcionaram uma secreção significativamente maior que TNF α do que todos os controlos de anticorpos

[00284] Além disso, **FIG. 21A** a **FIG. 21C** mostram ensaios de liberação de citocina de superantígenos que demonstram os efeitos dos vários anticorpos, TIGIT-Fc-LIGHT humana (**FIG. 21A**), TIGIT-Fc-OX40L humana (**FIG. 21B**), PD-1-Fc-LIGHT humana e proteínas quiméricas CD172a (SIRP α)-Fc-LIGHT humanas (**FIG. 21C**) em leucócitos de sangue periférico humano ativados por SEB.

[00285] Consequentemente, os dados acima demonstram proteínas quiméricas contendo o domínio LIGHT e proteínas quiméricas contendo o domínio TIGIT, como aqui descrito, são capazes de se ligar a cada um dos seus três parceiros de ligação; eles ativam funcionalmente células de leucócitos humanos primários *in vitro*.

Exemplo 6: Melhoria na Eliminação do Tumor e Maior Sobrevida de Tratamentos com Proteínas Quiméricas

[00286] A atividade antitumoral *in vivo* das proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L murina, CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT murina, TIGIT-Fc-LIGHT murina e PD-1-Fc-LIGHT murina foi analisada utilizando o modelo de tumor colorretal do camundongo CT26. Em um conjunto de experimentos, camundongos Balb/c foram inoculados com tumor CT26. Quando os tumores atingiram um diâmetro de 4 a 5 mm, os camundongos foram tratados com a proteína químérica mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, e mPD-1-Fc-LIGHT ou um anticorpo anti-TIGIT, anti-CD47, anti-OX40, ou anti-PD-1 ou uma combinação de anticorpos anti-TIGIT e anti-OX40.

[00287] O crescimento do tumor para cada grupo de tratamento foi avaliado como mostrado na **FIG. 22A** (painéis esquerdo e direito). Especificamente, os camundongos não tratados desenvolveram tumores rapidamente e o tratamento com um anticorpo ou anticorpos pareceu retardar ligeiramente o desenvolvimento de tumores. Pelo contrário, o tratamento de camundongos com a proteína químérica mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRPa)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, ou mPD-1-Fc-LIGHT inibiu significativamente o crescimento e/ou retardou o desenvolvimento de tumores.

[00288] A porcentagem total de sobrevida de camundongos até quarenta dias após a inoculação do tumor também foi avaliada. Todos os camundongos não tratados morreram nos vinte dias após a inoculação do tumor e nenhum dos camundongos tratados com anticorpo ou anticorpos tinha uma percentagem de sobrevida de 40 dias superior a 25%; ver **FIG. 22B**, painel esquerdo. Significativamente, todos os camundongos tratados com a proteína químérica mTIGIT-Fc-OX40L, mCD172a(SIRPa)-Fc-LIGHT, mTIGIT-Fc-LIGHT, ou mPD-1-Fc-LIGHT chimeric protein sobreviveram quarenta dias após a inoculação do tumor; ver **FIG. 22B**, painel esquerdo.

[00289] Estes dados indicam que tratamentos *in vivo* com uma proteína químérica TIGIT-Fc-OX40L, CD172a(SIRPa)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT, ou PD-1-Fc-LIGHT inibe o crescimento do tumor e melhora a sobrevida.

Exemplo 7: Caracterização da Contribuição de um Domínio Fc num Ligante para Funcionalidade de Proteínas Químéricas

[00290] Neste exemplo, a contribuição de um domínio Fc num ligante para a funcionalidade de proteínas químéricas da presente invenção foi ensaiada. Aqui, uma PD-1-Fc-OX40L foi usada como um modelo para Fc contendo as proteínas químéricas. Assim, os dados apresentados abaixo são relevantes para proteínas químéricas da presente invenção.

[00291] Em seu estado nativo, a PD-1 existe como monômero, enquanto OX40Ls tendem a dimerizar devido a interações

eletrostáticas entre os domínios OX40L; os domínios Fc associam-se uns aos outros através de ligações dissulfeto, *por exemplo*, através dos seus resíduos de cisteína. Juntas, várias interações inter-moleculares podem contribuir para a estrutura quaternária de PD-1-Fc-OX40L. Existem, pelo menos, quatro configurações potenciais de PD-1-Fc-OX40L, com a proteína quimérica existindo como um monômero, um dímero, um trímero ou um hexâmero. Ver,

FIG. 23.

[00292] A existência de configurações monoméricas e diméricas da proteína quimérica foi testada expondo proteínas quiméricas a condições redutoras e não redutoras e depois executando as proteínas em SDS-PAGE. Sob condições não redutoras (Reduzido: "-"), a proteína quimérica migrou em SDS-PAGE a cerca de 200 kDa. Aqui, Western blots foram sondados com anticorpos dirigidos contra PD-1, Fc ou OX40L em, respectivamente, as manchas esquerda, central e direita mostradas na **FIG. 24**. Uma vez que, o peso molecular monomérico previsto da proteína quimérica é de 57,6 kDa, esperava-se que a espécie de 200 kDa fosse, pelo menos, um dímero. No entanto, sob condições reduzidas (Reduzido: "+"), que reduz as ligações dissulfeto (*por exemplo*, entre os domínios Fc), a proteína quimérica migrou em SDS-PAGE a cerca de 100 kDa. Como as espécies de 100 kDa eram mais pesadas que o esperado, foi previsto que a massa extra fosse devida à glicosilação. Finalmente, as proteínas quiméricas foram tratadas com Peptídeo-N-Glicosidase F (PNGaseF "+") e execuções em SDS-PAGE sob condições reduzidas. Sob estas condições, a proteína quimérica migrou a cerca de 57,6 kDa. Estes dados sugerem que a proteína quimérica é glicosilada e existe naturalmente, pelo menos, como um dímero; com dimerização provavelmente devido à ligação dissulfeto entre os domínios Fc, *por exemplo*, através do(s) seu(s) resíduo(s) de cisteína.

[00293] Os métodos de gel SDS-PAGE não predizem com precisão o peso molecular para proteínas de alta massa molecular e/ou de grande peso molecular. Assim, em seguida, as proteínas quiméricas foram

caracterizadas utilizando Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). Ao contrário do SDS-PAGE, no qual o SDS carregado negativamente reduz as interações baseadas em carga entre os peptídeos, a SEC não usa detergentes ou agentes redutores. Quando a proteína quimérica PD-1-Fc-OX40L foi administrada na SEC, nenhum dos picos foi de cerca de 200 kDa. Isto sugere que, nativamente, a proteína quimérica não existe como um dímero. Em vez disso, foi detectado um pico com um tamanho superior a 670 kDa. Ver, **FIG. 25**. Este e os dados anteriores sugerem que a proteína quimérica PD-1-Fc-OX40L existe como um hexâmero no seu estado nativo.

[00294] Como mostrado acima, quando executado em SDS-PAGE sob condições não redutoras ou sob condições redutoras, SDS na amostra e/ou no tampão de execução converte a proteína quimérica hexamérica PD-1-Fc-OX40L em um dímero ou monômero predominante, respectivamente, na ausência e presença de um agente redutor. Ver a **FIG. 26** (gel da esquerda). Quando executada em PAGE nativo, que não possui SDS, e na ausência de um agente redutor, a proteína quimérica existe como um hexâmero. No entanto, quando executada em PAGE nativa e na presença de um agente redutor (que reduz ligações dissulfeto), a proteína quimérica migrou mais pesada do que o esperado; como mostrado na **FIG. 26** (gel direito, faixa 2), com a proteína quimérica não conseguiu migrar substancialmente para fora do poço de carga. Estes dados sugerem que a proteína quimérica oligomerizada em uma proteína de ordem superior. Assim, em proteínas quiméricas, a ligação dissulfeto parece ser importante para controlar a oligomerização de ordem superior.

[00295] Para confirmar ainda mais isso, proteínas quiméricas sem um domínio Fc foram construídas, *por exemplo*, "PD-1-Sem Fc-OX40L". Tais proteínas quiméricas não terão a ligação dissulfeto que ocorre entre os domínios Fc nas proteínas quiméricas descritas anteriormente. Como mostrado na **FIG. 27**, quando as proteínas quiméricas que não têm domínios Fc são executadas em PAGE nativo, nenhuma das proteínas substancialmente

migrou para fora do seu poço de carga; novamente, sugerindo que as proteínas quiméricas “Sem Fc” formaram um complexo tipo concatenário compreendendo numerosas proteínas. Assim, a omissão do domínio Fc em uma proteína quimérica leva à formação de agregados proteicos. Estes dados indicam que a ligação dissulfeto, *por exemplo*, entre domínios Fc em diferentes proteínas quiméricas, estabiliza as proteínas quiméricas e assegura que cada uma delas existe como um hexâmero e não como uma proteína(concatâmero) de ordem superior. Em outras palavras, o domínio Fc surpreendentemente coloca ordem em complexos proteicos quiméricos. As faixas 1 a 4, respectivamente, incluem 2,5 µg, de PD-1-Sem Fc-OX40L, 5 µg de PD-1-Sem Fc-OX40L, 2,5 µg de PD-1-Sem Fc-OX40L e 5 µg de PD-1-Sem Fc-OX40L

[00296] É mostrado na **FIG. 28** um modelo que resume os dados acima e mostra como um hexâmero e concatâmeros se formam a partir de proteínas quiméricas da presente invenção. A proteína quimérica ilustrativa (PD-1-Fc-OX40L) forma naturalmente um hexâmero (devido a interações eletrostáticas entre os domínios OX40L e dimerização por domínios Fc). No entanto, na ausência dos efeitos de controle da ligação dissulfeto entre os domínios Fc, em condições reduzidas para a proteína PD-1-Fc-OX40L e devido à ausência de domínios Fc na PD-1-Sem Fc-OX40L, estas últimas proteínas quiméricas formam concatâmeros.

[00297] Adicionalmente, proteínas quiméricas foram construídas nas quais o domínio Fc (tal como aqui descrito) foi substituído por Ficolina (que não tem os resíduos cisteína necessários para a ligação dissulfeto entre as proteínas quiméricas). Tal como com as proteínas quiméricas Sem Fc e proteínas quiméricas compreendendo um Fc e executadas em PAGE nativo e na presença de um agente redutor (ambos os quais formaram agregados que não migraram para um gel), as proteínas quiméricas compreendendo Ficolina parecem também formar treliças que não migraram para um gel. Estes dados reforçam a conclusão de que a ligação dissulfeto é importante para o enrolamento e função adequados das proteínas

quiméricas da presente invenção.

[00298] Finalmente, as proteínas quiméricas foram preparadas usando domínios Fc enrolados (CCDFc). Muito pouca proteína purificada foi distribuída sob avaliação funcional.

[00299] Consequentemente, incluindo um domínio Fc num ligante de uma proteína químérica (que é capaz de formar ligações dissulfeto entre proteínas quiméricas), ajuda a evitar a formação de concatâmeros e/ou agregados de proteínas insolúveis e, provavelmente, não funcionais.

Exemplo 8: Caracterização de Diferentes Sequências de Ligantes de Junção para as Proteínas Quiméricas

[00300] Diferentes sequências de ligantes de junção únicas (17 adaptadores) foram identificadas com características variáveis (comprimento, solubilidade, carga e flexibilidade). Os construtos foram então sintetizados incorporando cada uma dessas 17 sequências de ligantes de junção na posição 'ligante 2', onde a configuração da proteína químérica:

ECD 1 – Ligante de junção 1 – Fc – Ligante de junção 2 – ECD 2.

[00301] Os níveis de produção para esses 17 construtos foram testados em células CHO. A tabela a seguir fornece um resumo para as diferentes sequências de ligantes de junção, características daqueles ligantes de junção, o nível de produção (por A280) e os valores de ligação (EC_{50}) com base na análise FACS para PD-L1 ou OX40. Algumas variações nos níveis de produção e atividade entre certas sequências de ligantes foram determinadas.

TABELA 2: Resumo para sequências de ligantes de união opcionais

Nome da proteína	Conc. de proteína A280	CHO-PD-L1 EC50 (nM)	HeLa-OX40 EC50 (nM)	Sequência de ligante de junção 2	Características
PD-1_IgG4_OX40L (1)	0,17	27	6	IEGRMD (SEQ ID NO: 52)	Ligante
PD-1_IgG4_OX40L (2)	0,12	23	67	SKYGPPCPPC P (SEQ ID NO: 50)	Região de dobradiça IgG4
PD-1_IgG4_OX40L (3)	0,15	25	140	GGGSGGGS (SEQ ID NO: 55)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (4)	0,11	36	125	GGGSGGGS GGG (SEQ ID NO: 56)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (5)	0,22	25	41	EGKSSGSGSE SKST (SEQ ID NO: 57)	Flexível + solúvel
PD-1_IgG4_OX40L (6)	0,12	26	171	GGSG (SEQ ID NO: 58)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (7)	0,11	27	195	GGSGGGSGG GSG (SEQ ID NO: 59)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (8)	0,21	20	48	EAAAKEAAAK EAAAK (SEQ ID NO: 60)	Hélice Alfa Rígida
PD-1_IgG4_OX40L (9)	0,23	45	87	EAAAREAAAR EAAAREAAAR (SEQ ID NO: 61)	Hélice Alfa Rígida
PD-1_IgG4_OX40L (10)	0,13	52	62	GGGGSGGGG SGGSAS (SEQ ID NO: 62)	Flexível

Nome da proteína	Conc. de proteína A280	CHO-PD-L1 EC50 (nM)	HeLa-OX40 EC50 (nM)	Sequência de ligante de junção 2	Características
PD-1_IgG4_OX40L (11)	0,07	25	100	GGGVPRDCG (SEQ ID NO: 53)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (12)	0,11	33	70	GGGGAGGGG (SEQ ID NO: 63)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (13)	0,12	38	60	GS (SEQ ID NO: 64)	Altamente flexível
PD-1_IgG4_OX40L (14)	0,18	25	70	GSGSGS (SEQ ID NO: 65)	Altamente flexível
PD-1_IgG4_OX40L (15)	0,19	24	67	GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 66)	Altamente flexível
PD-1_IgG4_OX40L (16)	0,11	34	77	GGGGSAS (SEQ ID NO: 67)	Flexível
PD-1_IgG4_OX40L (17)	0,19	32	44	APAPAPAPAP APAPAPAPAP (SEQ ID NO: 68)	Rígido

[00302] A caracterização de proteínas quiméricas PD-1-IgG4-OX40L com diferentes sequências de ligantes de junção (17 ligantes) por análise de Western blot é mostrada na **FIG. 29A** a **FIG. 29Q**. Especificamente, cada domínio individual do construto de fusão foi sondado usando um anticorpo anti-PD-1, anti-Fc, ou anti-OX40L. Os resultados mostraram um desempenho similar através de cada proteína químérica, sugerindo que todas as sequências de ligante de junção candidatas eram

funcionais.

[00303] Adicionalmente, cada proteína purificada com diferentes sequências de ligantes também foi caracterizada pela ligação a PD-L1 ou OX40 em ensaios de ELISA (**FIG. 30**), bem como ensaios de citometria de fluxo baseados em células (**FIG. 31A** a **FIG. 31P**).

Exemplo 9: Produção de Proteínas Quiméricas Adicionais Contendo TIGIT, Contendo Domínios Extracelulares de Outras Proteínas Tipo II

[00304] Neste exemplo, são descritas proteínas quiméricas adicionais da presente invenção. Tais proteínas quiméricas adicionais serão feitas da mesma forma como as proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L, ou TIGIT-Fc-LIGHT foram feitas, *por exemplo*, conforme descrito acima na Descrição Detalhada e no documento de prioridade do presente pedido: US 62/464.002.

[00305] Estas proteínas quiméricas adicionais terão a fórmula geral: ECD 1 - Ligante de Junção 1 - Domínio Fc - Ligante de Junção 2 - ECD 2, em que ECD 1 é o domínio extracelular de TIGIT e ECD 2 é o domínio extracelular de uma proteína Tipo II, diferente de CD40L, OX40L ou LIGHT. Exemplos de proteínas Tipo II incluem 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL. Estas proteínas quiméricas podem não ter um ou ambos os ligantes de junção. Ligantes de Junção Exemplificativos 1s, Domínios Fc e Ligantes de Junção 2 são descritos acima na Tabela 1; ligantes modulares úteis para a formação de proteínas quiméricas e compreendendo ligantes de junção específicos 1s, domínios de Fc e Ligantes de Junção 2s são mostrados em **FIG. 32**.

[00306] Alternativamente, as proteínas quiméricas adicionais serão proteínas de fusão tendo a fórmula geral: N terminal - (a) - (b) - (c) - C terminal, em que (a) é TIGIT, (b) é um ligante compreendendo pelo menos uma porção de um domínio Fc, e (c) é o domínio extracelular de uma proteína Tipo II, com exceção de CD40L, OX40L, ou LIGHT. Exemplos de

proteínas Tipo II incluem 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL. Ligantes exemplificativos são descritos acima na Tabela 1; Ligantes modulares úteis para a formação de proteínas quiméricas e compreendendo Ligante de Junção específico 1s, Domínios Fc e Ligante de Junção 2s são mostrados em **FIG. 32.**

[00307] A sequência de aminoácidos para 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL, respectivamente, compreende a SEQ ID NO: 12, 26, 30, 15, 18 e 40. A sequência de aminoácidos para o domínio extracelular de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL, respectivamente, compreende SEQ ID NO: 13, 27, 31, 16, 19 e 41. A sequência de aminoácidos para TIGIT compreende a SEQ ID NO: 9 e o domínio extracelular de TIGIT compreende a SEQ ID NO: 10. As proteínas quiméricas podem compreender uma variante das sequências acima mencionadas, *por exemplo*, pelo menos cerca de 95% idêntica a uma sequência acima mencionada.

[00308] De acordo, a presente invenção inclui ainda as seguintes proteínas quiméricas adicionais (*por exemplo*, no tratamento de um câncer e/ou tratamento de uma doença inflamatória): TIGIT-Fc-4-1BBL, TIGIT-Fc-CD30L, TIGIT-Fc-FasL, TIGIT-Fc-GITRL, TIGIT-Fc-TL1A, e TIGIT-Fc-TRAIL.

[00309] As proteínas quiméricas adicionais serão caracterizadas como descrito acima para TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L, ou TIGIT-Fc-LIGHT nos Exemplos 1 a 8, embora com reagentes (*por exemplo*, parceiros de ligação, células alvo recombinantes, e tipos de células de câncer/tumor) que são específicos para as proteínas quiméricas adicionais, em vez de como necessários para a caracterização TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L, ou TIGIT-Fc-LIGHT. Assim, utilizando TIGIT-Fc-4-1BBL e TIGIT-Fc-CD40L como exemplos, as caracterizações de TIGIT-Fc-4-1BBL semelhante ao Exemplo 1 podem ser realizadas utilizando anticorpos anti-TIGIT, anti-Fc e anti-4-1BBL em vez dos anticorpos anti-TIGIT, anti-Fc e anti-CD40L necessários para o TIGIT-Fc-CD40L.

[00310] Tal como com as proteínas quiméricas TIGIT-Fc-OX40L, TIGIT-Fc-CD40L ou TIGIT-Fc-LIGHT, as proteínas quiméricas adicionais serão eficazes no tratamento de um câncer e/ou tratamento de uma doença inflamatória bloqueando TIGIT (que inibe a transmissão de um sinal imunoinibitório) e intensificando, aumentando e/ou estimulando a transmissão de um sinal imunoestimulatório via ativação do receptor/ligando de um de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, TL1A e TRAIL. Além disso, as proteínas quiméricas adicionais serão eficazes no tratamento de um câncer e/ou uma doença inflamatória, mas sem a toxicidade resultante e efeitos colaterais indesejáveis, *por exemplo*, complicações do GI, de tratamentos que compreendem uma pluralidade de anticorpos, *por exemplo*, um anticorpo bloqueador e um anticorpo agonista para o receptor/ligando de um de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL e TRAIL.

Exemplo 10: Produção de Proteínas Quiméricas Adicionais Contendo LIGHT, Contendo Domínios Extracelulares de Outras Proteínas Tipo I

[00311] Neste exemplo, são descritas proteínas quiméricas adicionais da presente invenção. Tais proteínas quiméricas adicionais serão feitas da mesma forma como as proteínas quiméricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT, ou PD-1-Fc-LIGHT foram feitas, *por exemplo*, conforme descrito acima na Descrição Detalhada e no documento de prioridade do pedido: US 62/464.002.

[00312] Estas proteínas quiméricas adicionais terão a fórmula geral: ECD 1 - Ligante de Junção 1 - Domínio Fc - Ligante de Junção 2 - ECD 2, em que ECD 1 é o domínio extracelular de uma proteína Tipo I diferente de CD172a(SIRP α), TIGIT ou PD-1 e ECD 2 é o domínio extracelular de uma LIGHT. Proteínas Tipo I exemplificativas incluem TIM3 e BTLA. Estas proteínas quiméricas podem não ter um ou ambos os ligantes de junção. Ligantes de Junção Exemplificativos 1s, Domínios Fc e Ligantes de Junção 2 são descritos acima na Tabela 1; ligantes modulares úteis para a formação de

proteínas quiméricas e compreendendo ligantes de junção específicos 1s, domínios de Fc e Ligantes de Junção 2s são mostrados em **FIG. 32**.

[00313] Alternativamente, as proteínas quiméricas adicionais serão proteínas de fusão com a fórmula geral: N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal, em que (a) é o domínio extracelular de uma proteína Tipo I diferente de CD172a(SIRP α), TIGIT ou PD-1, (b) é um ligante compreendendo, pelo menos, uma porção de um domínio Fc, e (c) é o domínio extracelular de LIGHT. Proteínas Tipo I exemplificativas incluem TIM3 e BTLA. Ligantes exemplificativos são descritos acima na Tabela 1; Ligantes modulares úteis para a formação de proteínas quiméricas e compreendendo Ligante de Junção específico 1s, Domínios Fc e Ligante de Junção 2s são mostrados em **FIG. 32**.

[00314] A sequência de aminoácidos para TIM3 e BTLA, respectivamente, compreende SEQ ID NO: 36 e 24. A sequência de aminoácidos para o domínio extracelular de TIM3 e BTLA, respectivamente, compreende SEQ ID NO: 37 e 25. A sequência de aminoácidos para LIGHT compreende SEQ ID NO: 1 e o domínio extracelular de LIGHT compreende SEQ ID NO: 2. As proteínas quiméricas podem compreender uma variante das sequências acima mencionadas, *por exemplo*, pelo menos cerca de 95% idêntica a uma sequência acima mencionada.

[00315] De acordo, a presente invenção inclui ainda as seguintes proteínas e métodos químéricos adicionais, utilizando as proteínas químéricas adicionais (*por exemplo*, no tratamento de um câncer e/ou tratamento de uma doença inflamatória): TIM3-Fc-LIGHT e BTLA-Fc-LIGHT. As proteínas químéricas adicionais serão caracterizadas como descrito acima para CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT, ou PD-1-Fc-LIGHT nos Exemplos 1 a 8, embora com reagentes (*por exemplo*, parceiros de ligação, células alvo recombinantes e tipos de células/tumores cancerígenos) que são específicos para as proteínas químéricas adicionais e não conforme necessário para caracterizar TIM3-Fc-LIGHT e BTLA-Fc-LIGHT; como exemplos, as caracterizações de TIM3-Fc-LIGHT semelhantes ao Exemplo 2 podem ser

realizadas usando anticorpos anti-LIGHT, anti-Fc, e anti-TIM3 em vez dos anticorpos anti-LIGHT, anti-Fc, e anti- CD172a(SIRP α) necessários para CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT.

[00316] Tal como com as proteínas quiméricas CD172a(SIRP α)-Fc-LIGHT, TIGIT-Fc-LIGHT ou PD-1-Fc-LIGHT, as proteínas quiméricas adicionais serão eficazes no tratamento de um câncer e/ou no tratamento de uma doença inflamatória bloqueando TIM3 e LIGHT (que inibe a transmissão de um sinal imunoinibitório) e intensificando, aumentando e/ou estimulando a transmissão de um sinal imunoestimulatório via ativação do receptor/ligando por LIGHT. Além disso, as proteínas quiméricas adicionais serão eficazes no tratamento de um câncer e/ou uma doença inflamatória, mas sem a toxicidade resultante e efeitos colaterais indesejáveis, *por exemplo*, complicações do GI, de tratamentos que compreendem uma pluralidade de anticorpos, *por exemplo*, um anticorpo bloqueador e um anticorpo agonista para o receptor/ligando de um de TIM3 e LIGHT.

EQUIVALENTES

[00317] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com modalidades específicas da mesma, será entendido que a mesma é capaz de modificações adicionais e este pedido se destina a cobrir todas as variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais afastamentos da presente divulgação que estão dentro da prática conhecida ou habitual na técnica a qual a invenção pertence e pode ser aplicada a recursos essenciais apresentados no presente documento e a seguir no escopo das reivindicações anexas.

[00318] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais do que a experimentação de rotina, que inúmeros equivalentes às modalidades específicas são descritos especificamente neste documento. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos no escopo das seguintes reivindicações.

INCOPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[00319] Todas as patentes e publicações referidas aqui estão incorporadas em sua totalidade por meio deste por referência.

[00320] As publicações discutidas aqui são fornecidas unicamente para sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que a presente invenção não é intitulada para preceder tal publicação em virtude de invenção prévia.

[00321] Neste documento, todos os cabeçalhos são simplesmente para a organização e não se destinam a limitar a divulgação de maneira alguma. O conteúdo de qualquer seção individual pode ser igualmente aplicável a todas as seções.

EQUIVALENTES

[00322] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com modalidades específicas da mesma, será entendido que a mesma é capaz de modificações adicionais e este pedido se destina a cobrir todas as variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo tais afastamentos da presente divulgação que estão dentro da prática conhecida ou habitual na técnica a qual a invenção pertence e pode ser aplicada a recursos essenciais apresentados no presente documento e a seguir no escopo das reivindicações anexas.

[00323] Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar, usando não mais do que a experimentação de rotina, que inúmeros equivalentes às modalidades específicas são descritos especificamente neste documento. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos no escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína quimérica de estrutura geral de:
N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal,
caracterizada pelo fato de que:
 - (a) é um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, sendo a proteína transmembrana TIGIT,
 - (b) é um ligante compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto, e
 - (c) é um segundo domínio que compreende um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar sendo selecionada de 4-1BBL, GITRL, TL1A, e LIGHT, em que:
o ligante conecta o primeiro domínio e o segundo domínio e compreende, opcionalmente, um ou mais ligantes de junção, tais ligantes de junção sendo selecionados de SEQ ID NOs: 49-95.
2. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o segundo domínio é 4-1BBL.
3. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o segundo domínio é GITRL.
4. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o segundo domínio é TL1A.
5. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o segundo domínio é LIGHT.
6. Proteína quimérica de estrutura geral de:
N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal,
caracterizada pelo fato de que:
 - (a) é um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, a proteína transmembrana TIGIT sendo selecionada de PD-1, CD172a(SIRPa), e TIGIT,
 - (b) é um ligante compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto, e

(c) é um segundo domínio que comprehende um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar sendo LIGHT, em que:

o ligante conecta o primeiro domínio e o segundo domínio e comprehende, opcionalmente, um ou mais ligantes de junção, tais ligantes de junção sendo selecionados de SEQ ID NOs: 49-95.

7. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro domínio é PD-1.

8. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro domínio é CD172a(SIRP α).

9. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro domínio é TIGIT.

10. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que o ligante é um polipeptídeo selecionado de uma sequência de aminoácidos flexível, uma região de dobradiça de IgG ou uma sequência de anticorpos.

11. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada** pelo fato de que o ligante comprehende o domínio dobradiça-CH2-CH3Fc derivado de IgG4.

12. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que o domínio dobradiça-CH2-CH3-Fc é derivado de IgG4 humana.

13. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 11 ou a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que o ligante comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID SEQ ID NO: 46 ou SEQ ID NO: 47.

14. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 11 ou a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que o ligante comprehende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.

15. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 14, **caracterizada** pelo fato de que o ligante comprehende um

ou mais ligantes de junção, tais ligantes de junção independentemente selecionados de SEQ ID NOs: 49-95.

16. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende dois ou mais ligantes de junção, cada ligante de junção selecionado independentemente de SEQ ID NOs: 49-95; em que um ligante de junção é N terminal para o domínio dobradiça-CH2-CH3 Fc e outro ligante de junção é C terminal para o domínio dobradiça-CH2-CH3 Fc.

17. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é uma proteína de fusão recombinante.

18. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de formar uma sinapse estável entre as células.

19. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada** pelo fato de que a sinapse estável entre as células proporciona orientação espacial que favorece a redução do tumor.

20. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 18 ou reivindicação 19, **caracterizada** pelo fato de que a orientação espacial posiciona células T para atacar células tumorais e/ou impede estericamente que uma célula tumoral produza sinais negativos, incluindo sinais negativos além daqueles mascarados pela proteína quimérica da invenção.

21. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizada** pelo fato de que a ligação de um ou ambos os domínios extracelulares ao seu respectivo parceiro de ligação ocorre com taxas de desaceleração (K_{off}), que proporcionam uma longa interação de um receptor e seu ligando.

22. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa fornece efeito de mascaramento de sinal negativo sustentado.

23. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 21 ou reivindicação 22, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa fornece um efeito de sinal positivo mais longo.

24. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada** pelo fato de que o efeito de sinal positivo mais longo permite que uma célula efetora seja adequadamente estimulada para um efeito antitumoral.

25. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa proporciona proliferação de células T e permite ataque antitumoral.

26. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 25, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa permite transmissão de sinal suficiente para proporcionar a liberação de sinais estimulatórios.

27. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizada** pelo fato de que o sinal estimulatório é uma citocina.

28. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica possui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de uma de SEQ ID NOs: 14, 17 ou 20.

29. Proteína quimérica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica possui uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de uma de SEQ ID NOs: 5, 8, ou 11.

30. Vetor de expressão, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica a proteína quimérica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 29.

31. Célula hospedeira, **caracterizada** pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 30.

32. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína quimérica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 29.

33. Método de tratamento de câncer ou uma doença anti-inflamatória, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 32 a um sujeito em necessidade desta.

34. Método para modular a resposta imune de um paciente, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 32 a um sujeito em necessidade da mesma.

35. Método, de acordo com a reivindicação 33 ou reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que as células T do paciente são ativadas.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 35, **caracterizado** pelo fato de que o paciente tem um tumor e uma ou mais células tumorais são impedidas de transmitir um sinal imunossupressor.

37. Método para tratar câncer ou uma doença anti-inflamatória, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a um sujeito em necessidade da mesma, compreendendo a composição farmacêutica uma proteína quimérica compreendendo:

(a) um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, sendo a proteína transmembrana TIGIT,

(b) um ligante compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto, e

(c) um segundo domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar selecionada de 4-1BBL, GITRL, TL1A, e LIGHT.

38. Método para tratar câncer ou uma doença anti-inflamatória, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz de uma composição farmacêutica a um sujeito em necessidade

da mesma, compreendendo a composição farmacêutica uma proteína quimérica compreendendo:

(a) um primeiro domínio que compreende um domínio extracelular de uma proteína transmembranar Tipo I, a proteína transmembrana TIGIT selecionada de PD-1, CD172a(SIRP α), e TIGIT,,

(b) um ligante compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína capaz de formar uma ligação dissulfeto, e

(c) um segundo domínio que compreende um domínio extracelular da proteína transmembranar Tipo II, a proteína transmembranar sendo LIGHT.

39. Método, de acordo com as reivindicações 37 ou 38, **caracterizado** pelo fato de que as células T do sujeito são ativadas quando ligadas pelo segundo domínio da proteína quimérica e:

(a) uma ou mais células tumorais são impedidas de transmitir um sinal imunossupressor quando ligadas pelo primeiro domínio da proteína quimérica,

(b) uma resposta quantificável de citocina no sangue periférico do sujeito é alcançada, e/ou

(c) o crescimento do tumor é reduzido no sujeito em necessidade do mesmo em comparação com um sujeito tratado com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou seus respectivos ligandos ou receptores.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 39, **caracterizado** pelo fato de que o método estimula a sinalização de um ou mais de LIGHT, 4-1BBL, GITRL e TL1A e ativa células apresentadoras de抗ígenos.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 40, **caracterizado** pelo fato de que o método reduz a quantidade ou atividade de células T regulatórias (Tregs) em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos tratados com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou os seus respectivos ligandos ou receptores.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 41, **caracterizado** pelo fato de que o método aumenta a iniciação de células T efetoras na drenagem de nódulos linfáticos do sujeito, em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos tratados com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou os seus respectivos ligandos ou receptores.

43. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 42, **caracterizado** pelo fato de que o método causa uma diminuição global em células imunossupressoras e uma mudança para um ambiente mais inflamatório do tumor, em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos tratados com anticorpos dirigidos para a proteína Tipo I ou Tipo II, ou seus respectivos ligandos ou receptores.

44. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizada** pelo fato de que é para uso como medicamento.

45. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer.

46. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença inflamatória.

47. Uso da proteína quimérica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizado** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento.

FIG. 1A

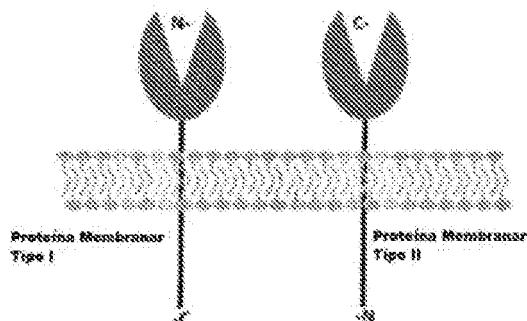


FIG. 1B

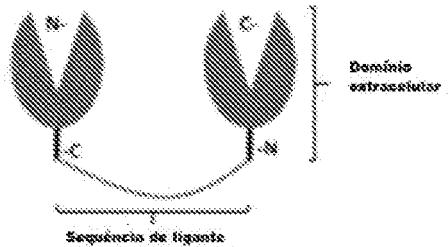


FIG. 1C

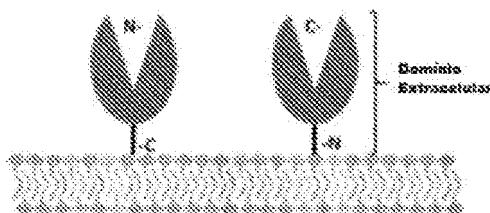


FIG. 1D

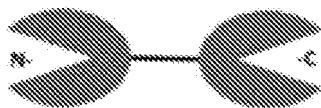


FIG. 2A

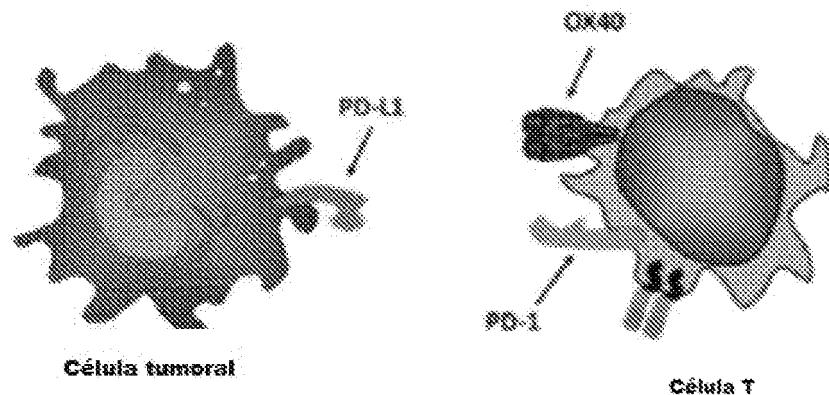


FIG. 2B

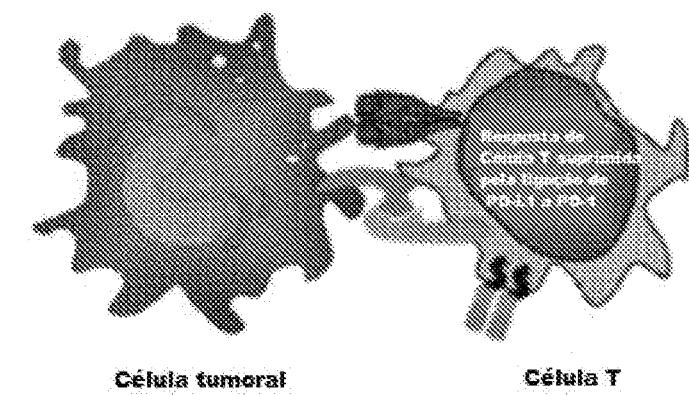


FIG. 2C

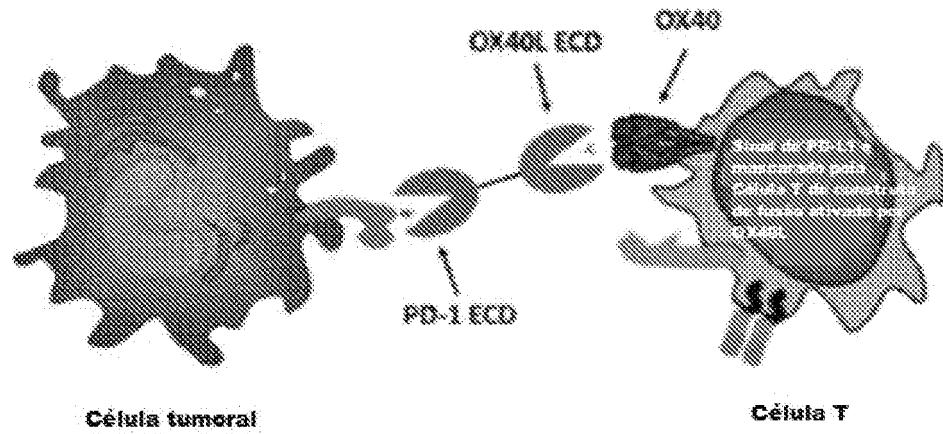


FIG. 2D

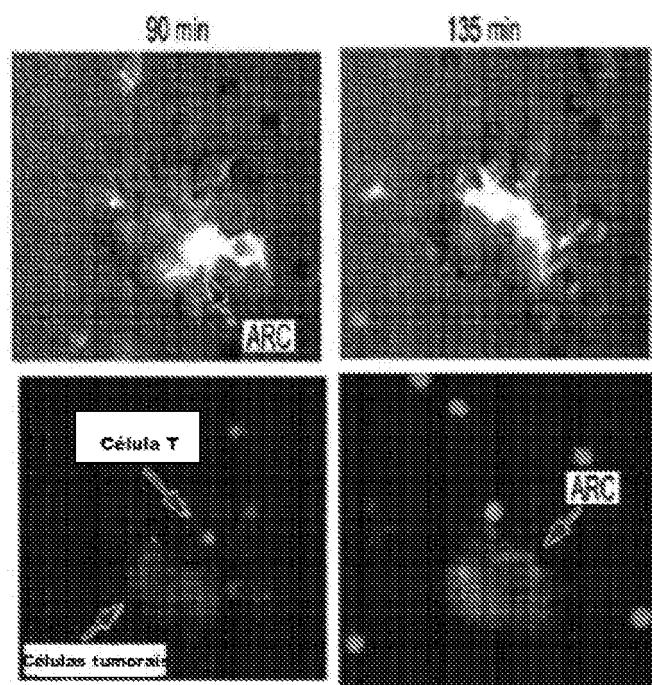


FIG. 3A.

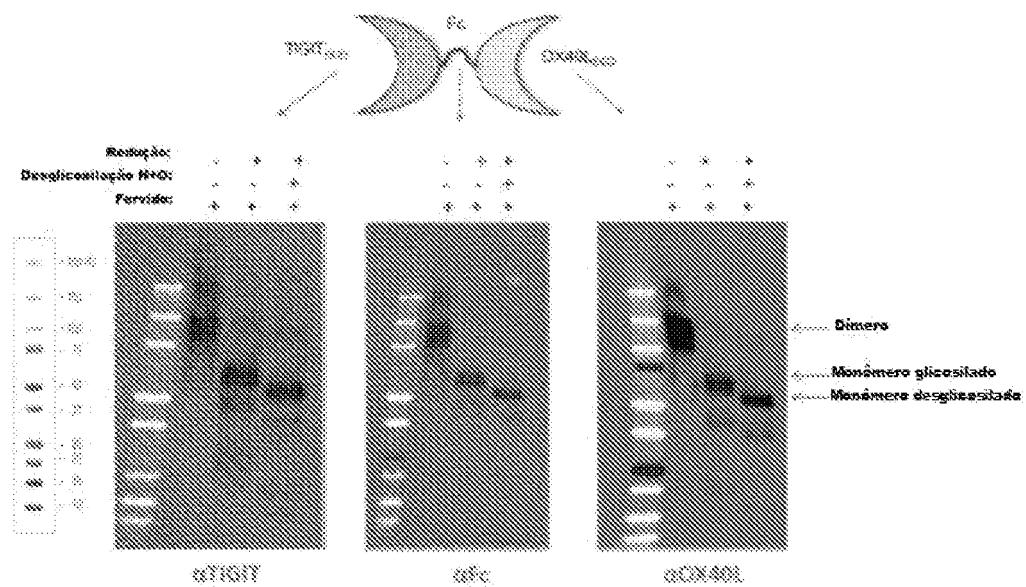


FIG. 3B.

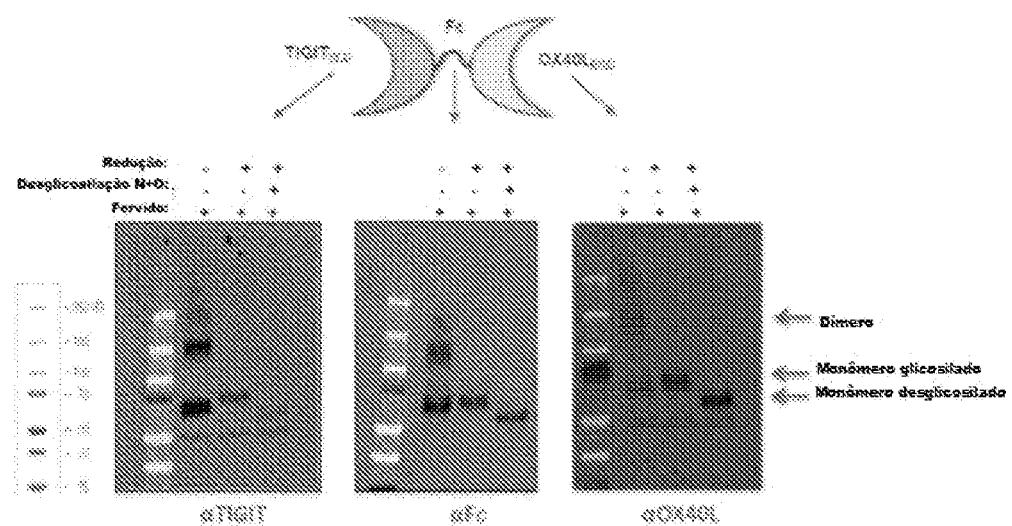
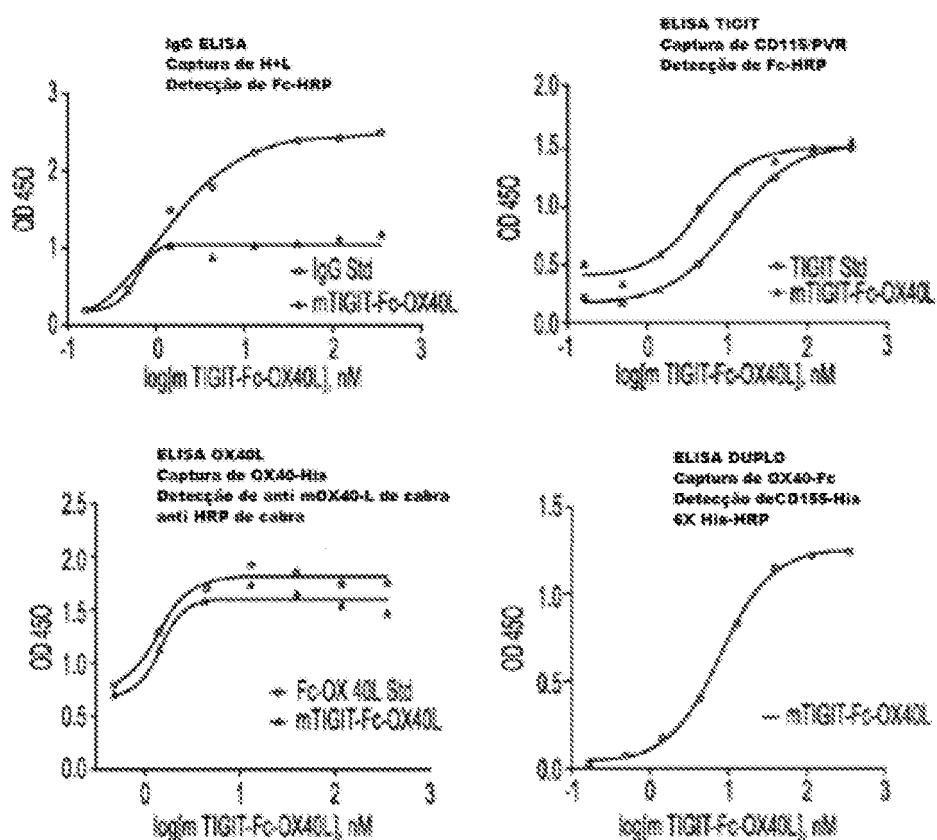


FIG. 4A



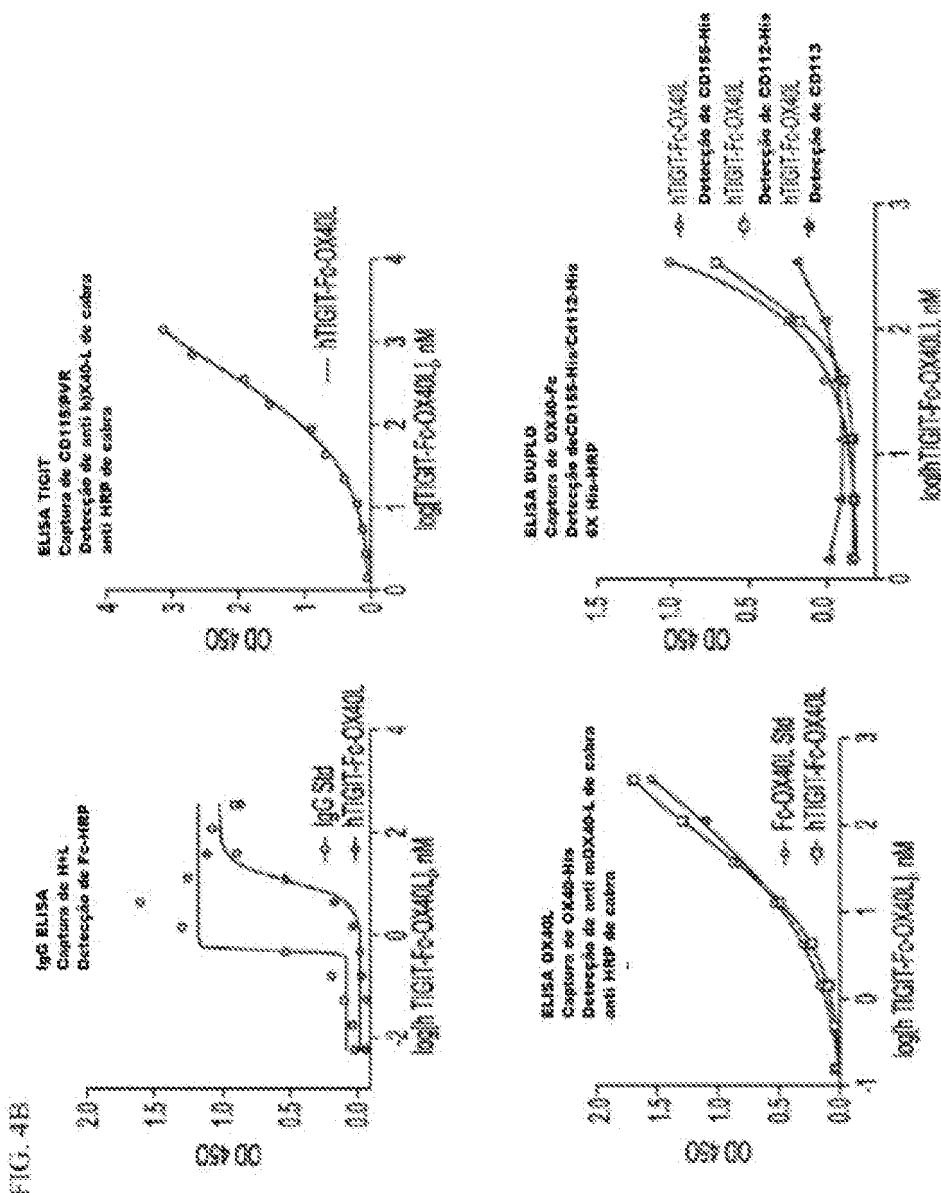


FIG. 5A

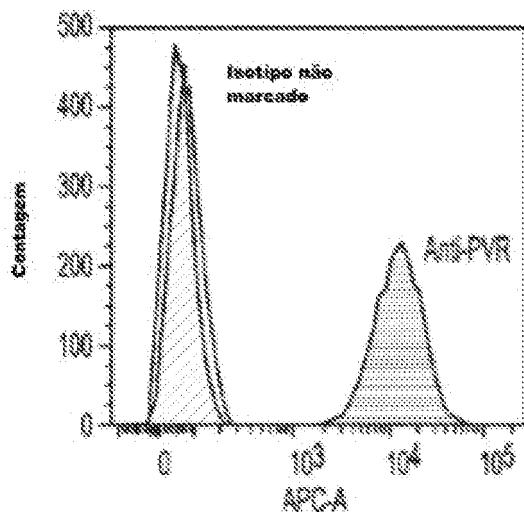


FIG. 5B

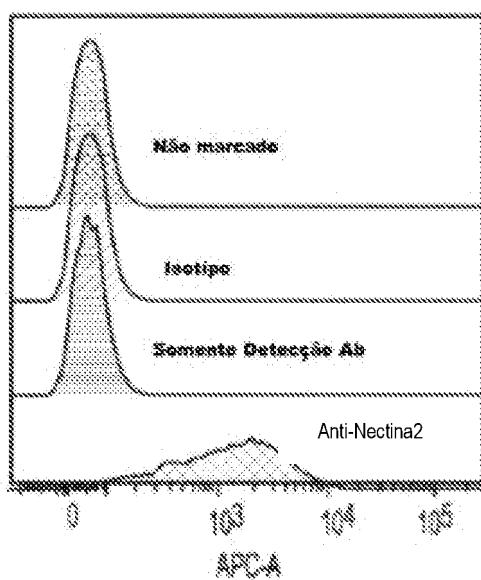
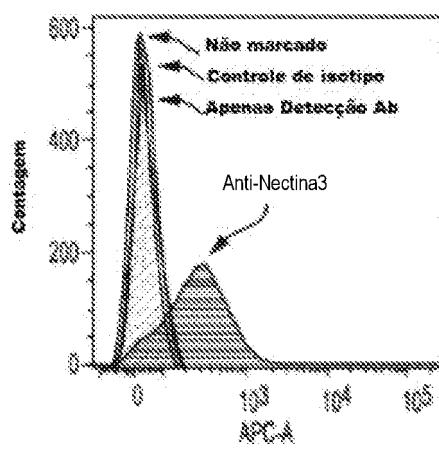


FIG. SC



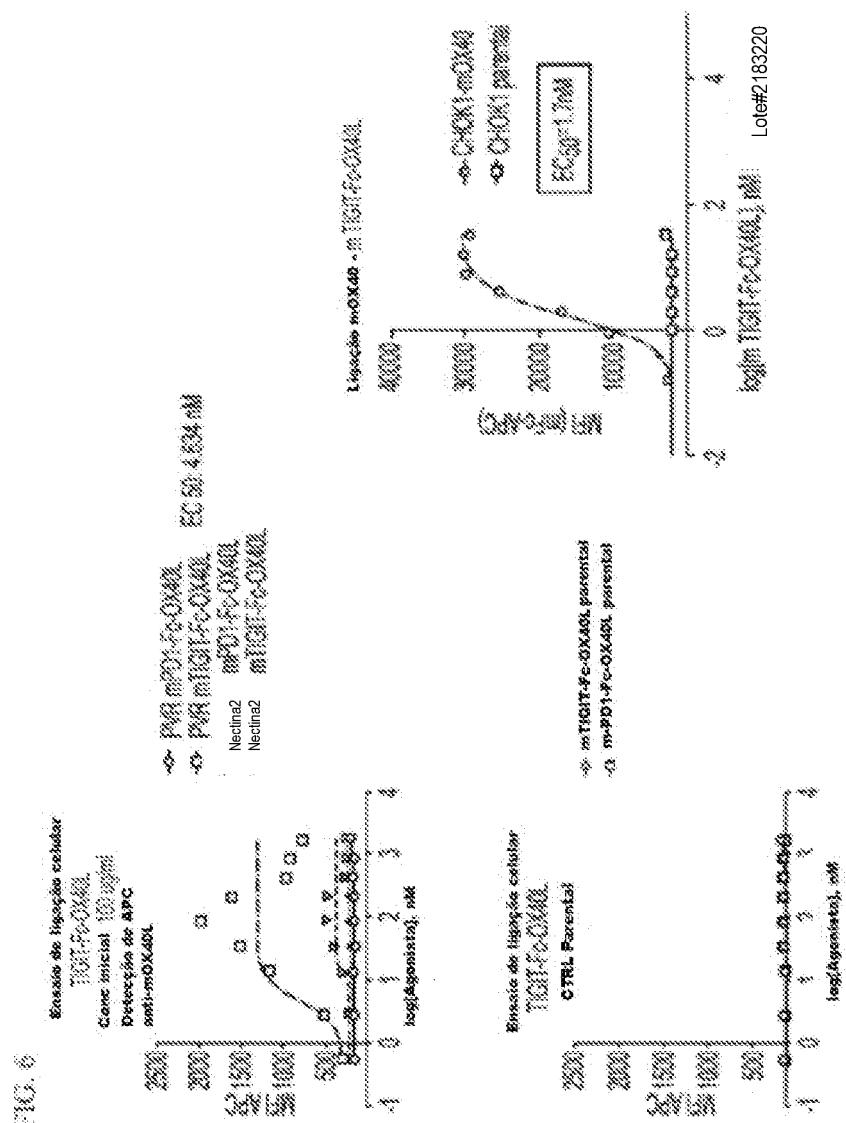


FIG. 7

Id de gene	Nome da proteína	Acesso	Rastreio primário	Rastreio de confirmação	Comentário
NECTIN4	Membre 4 da Acessóis de Gefita de Nectina	BC0103293	muito fraco	fraco	fraco
PQR	Receptor de poliovirus	BC0103329	forte	forte	forte
OX40	Membre 4 da Superfamília da Receptor de TNF	n/a	n/a	forte	forte
TIGIT-Fc-OX40%	Membre 4 da Superfamília da Receptor de TNF	NM_033273	n/a	média	média forte isoferrita carbônica
LGALS1	Galactina 1	BC0101083	média/forte	fraco	solvente; víte com outras problemas de fusão Fc

FIG. 8A

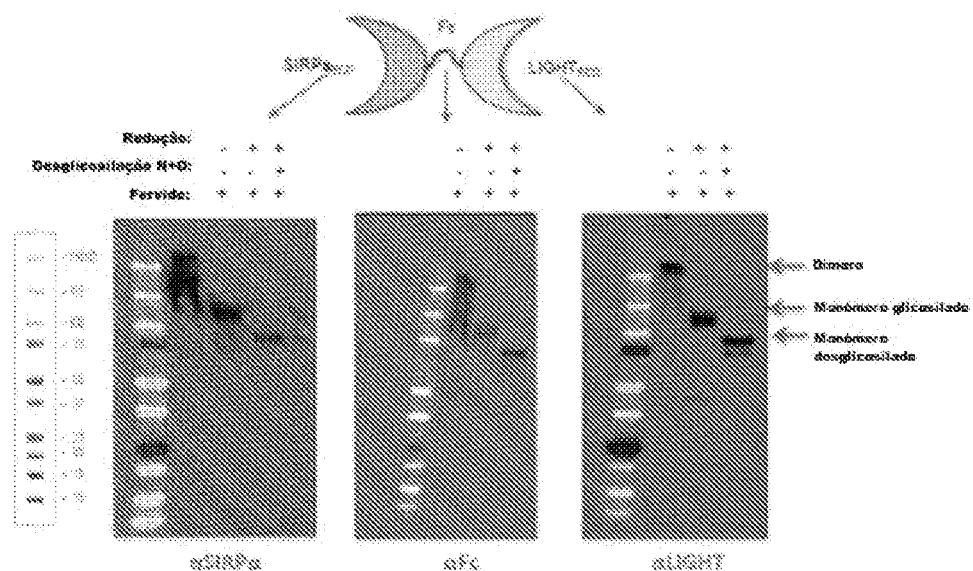


FIG. 8B

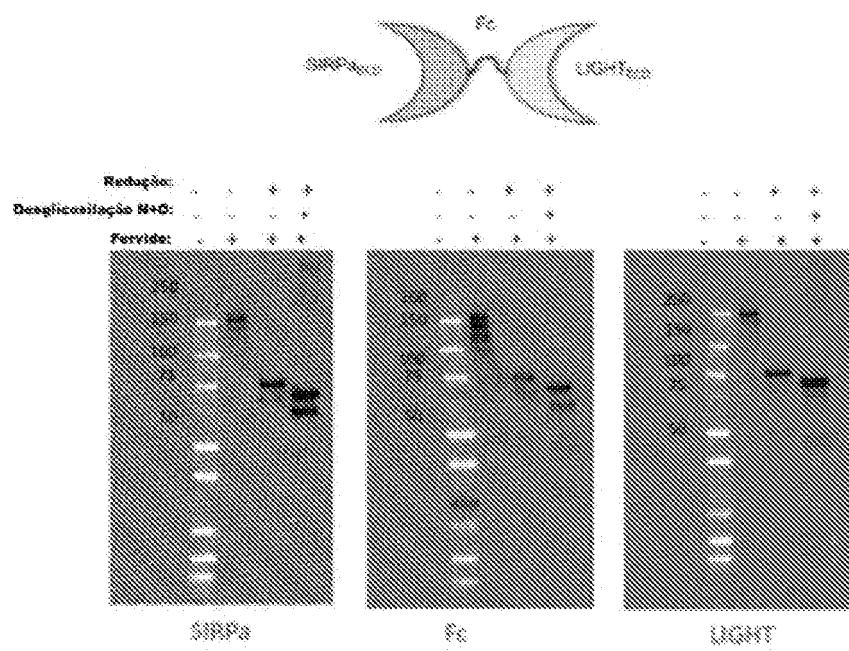


FIG. 9A

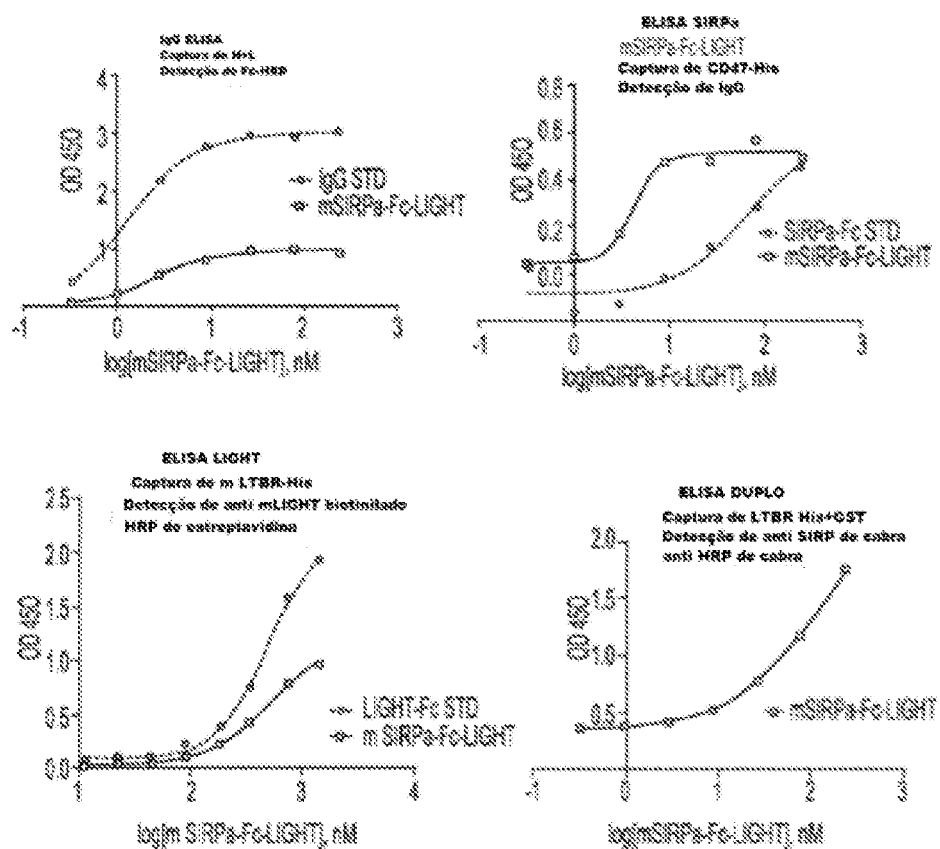


FIG. 9B

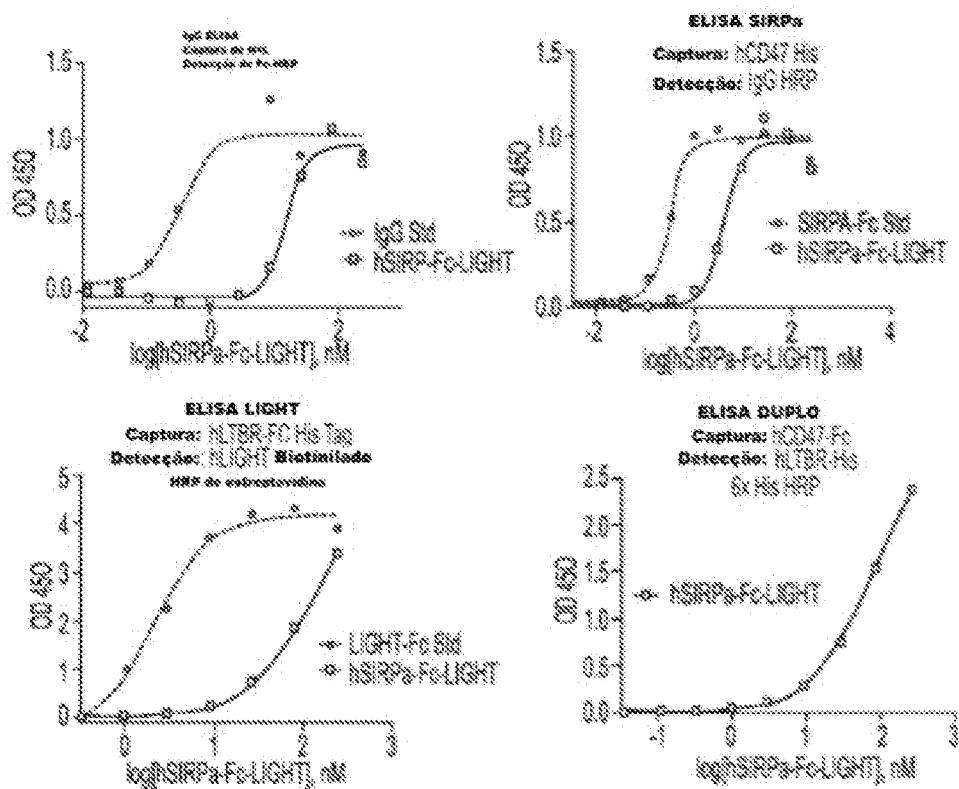
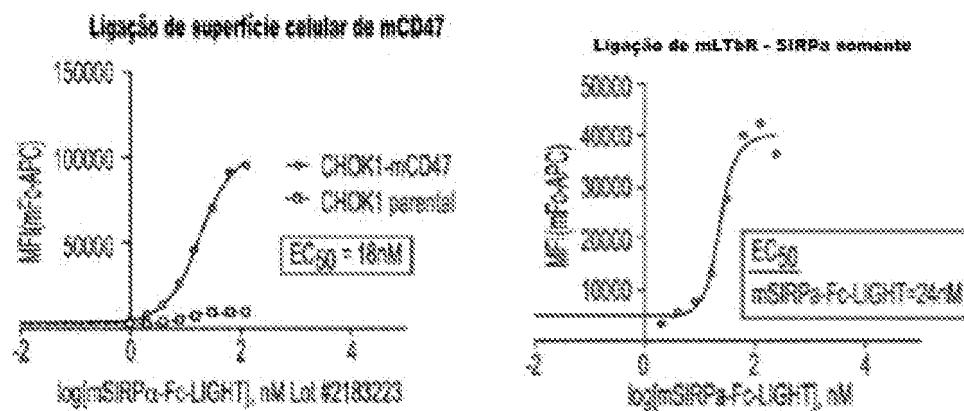
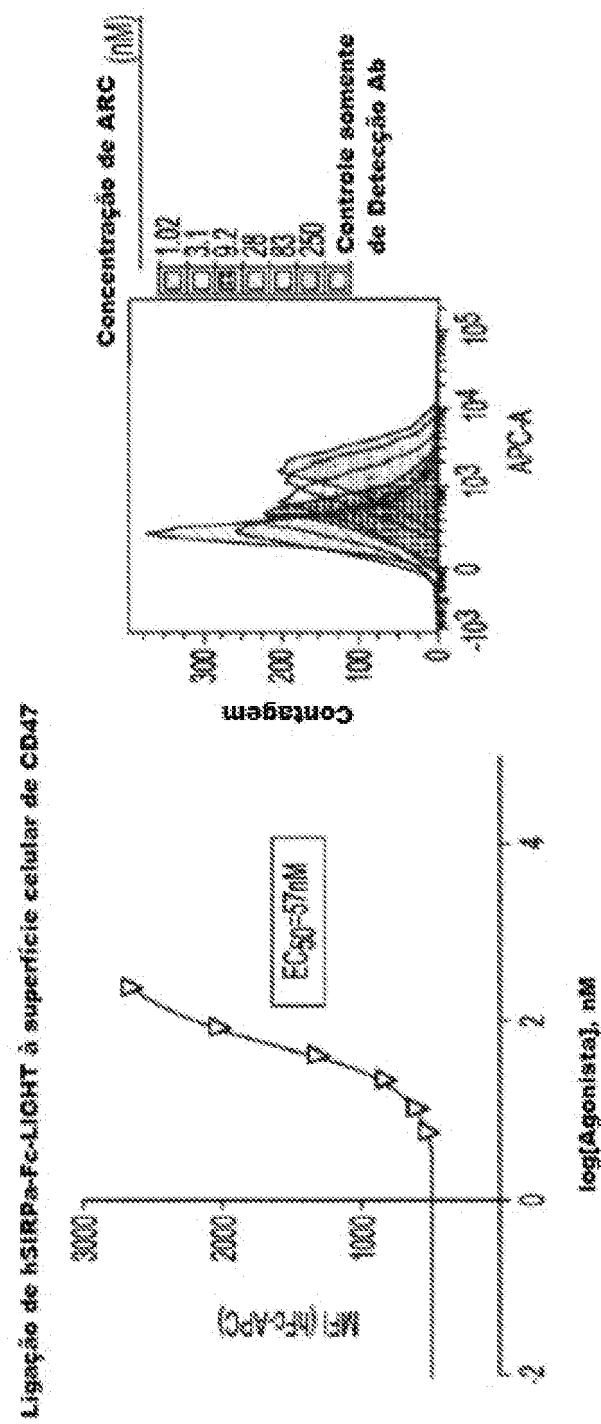
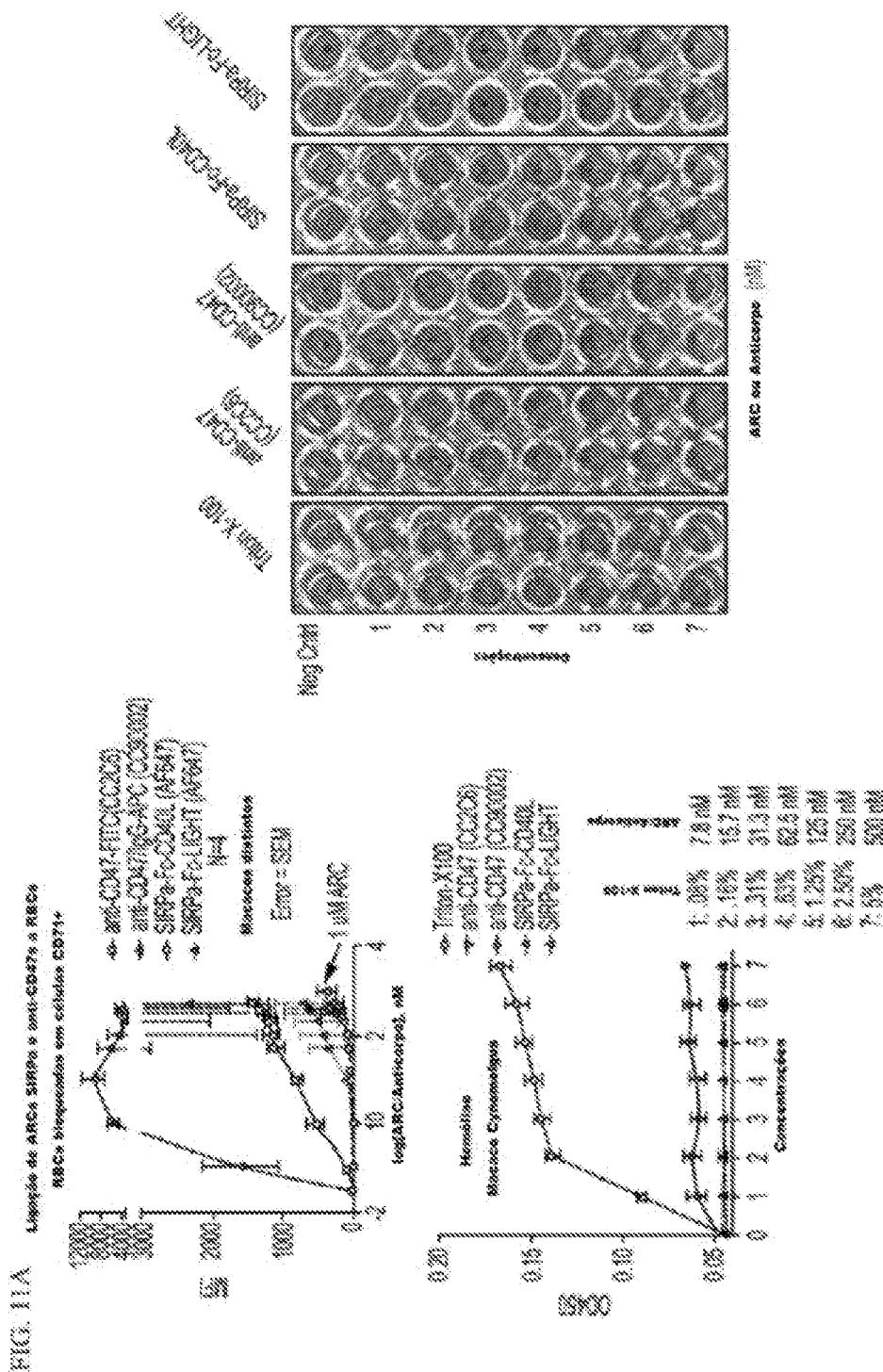
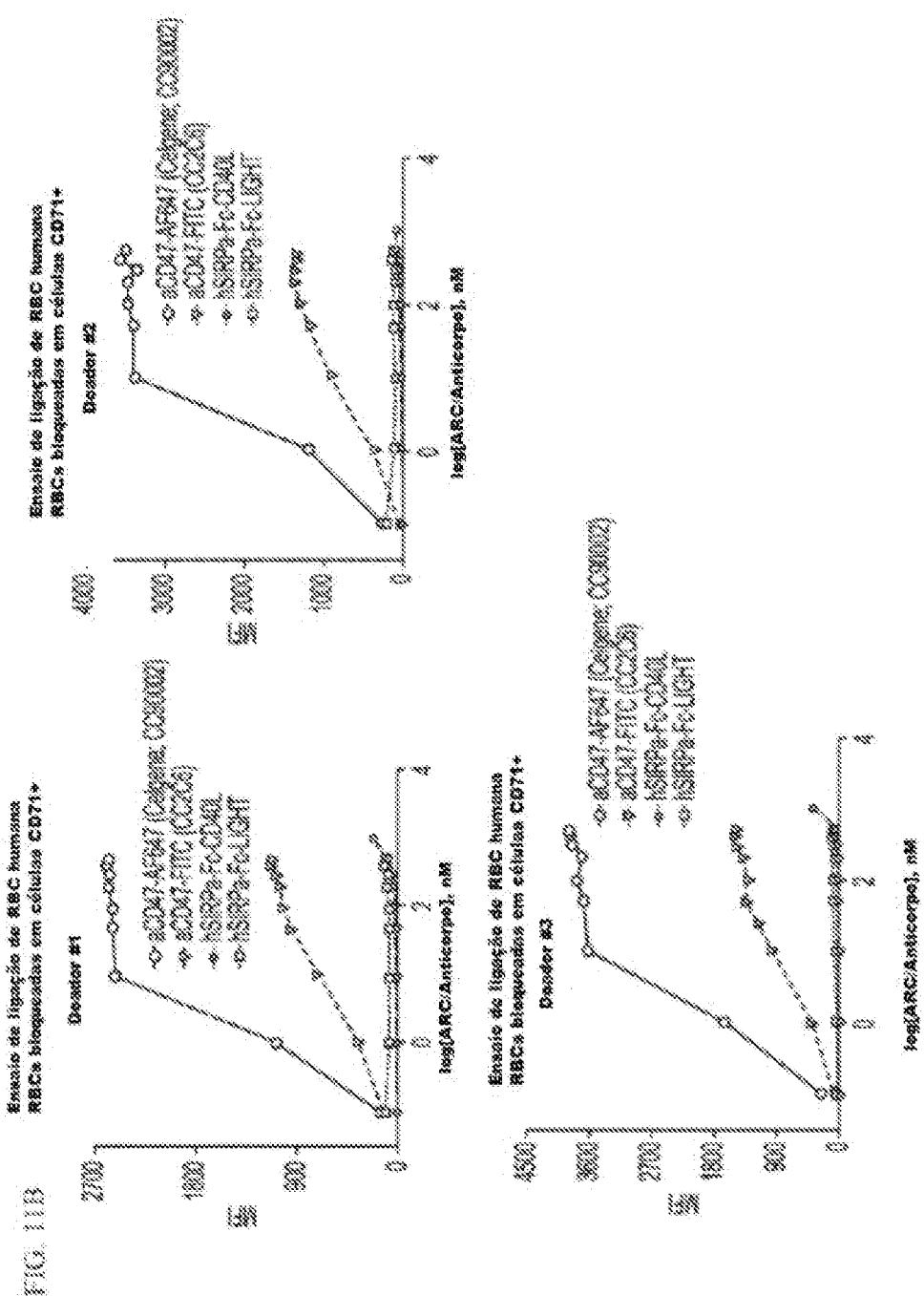


FIG. 10A









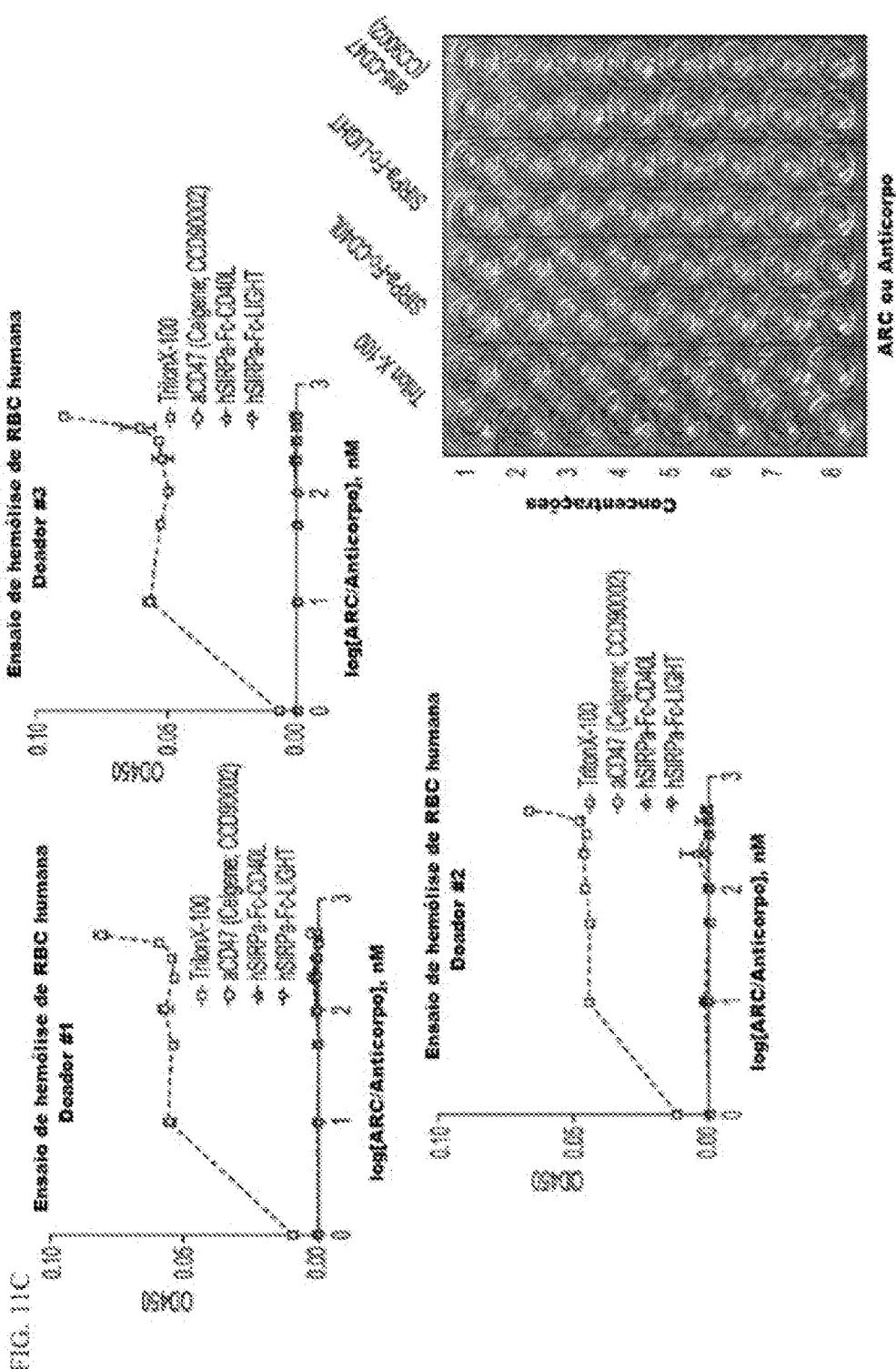


FIG. 12A.

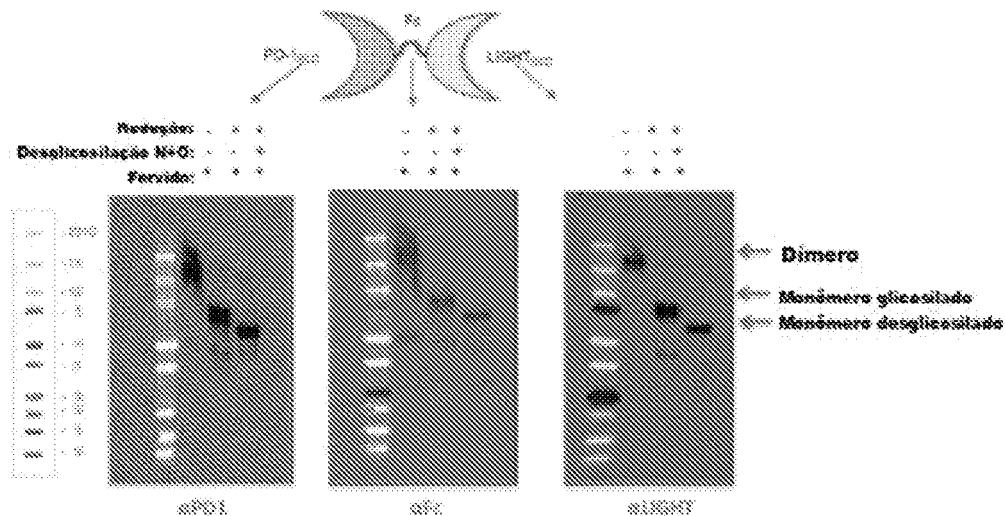
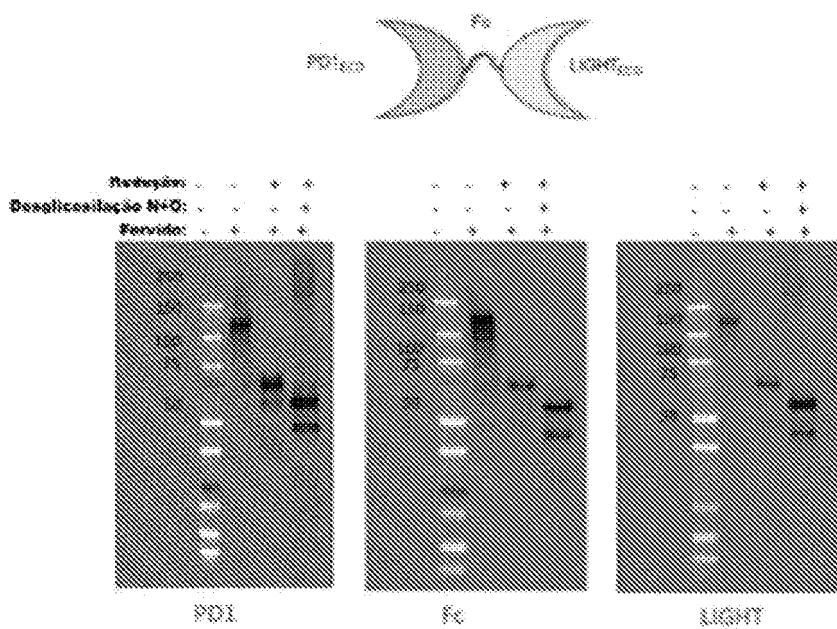
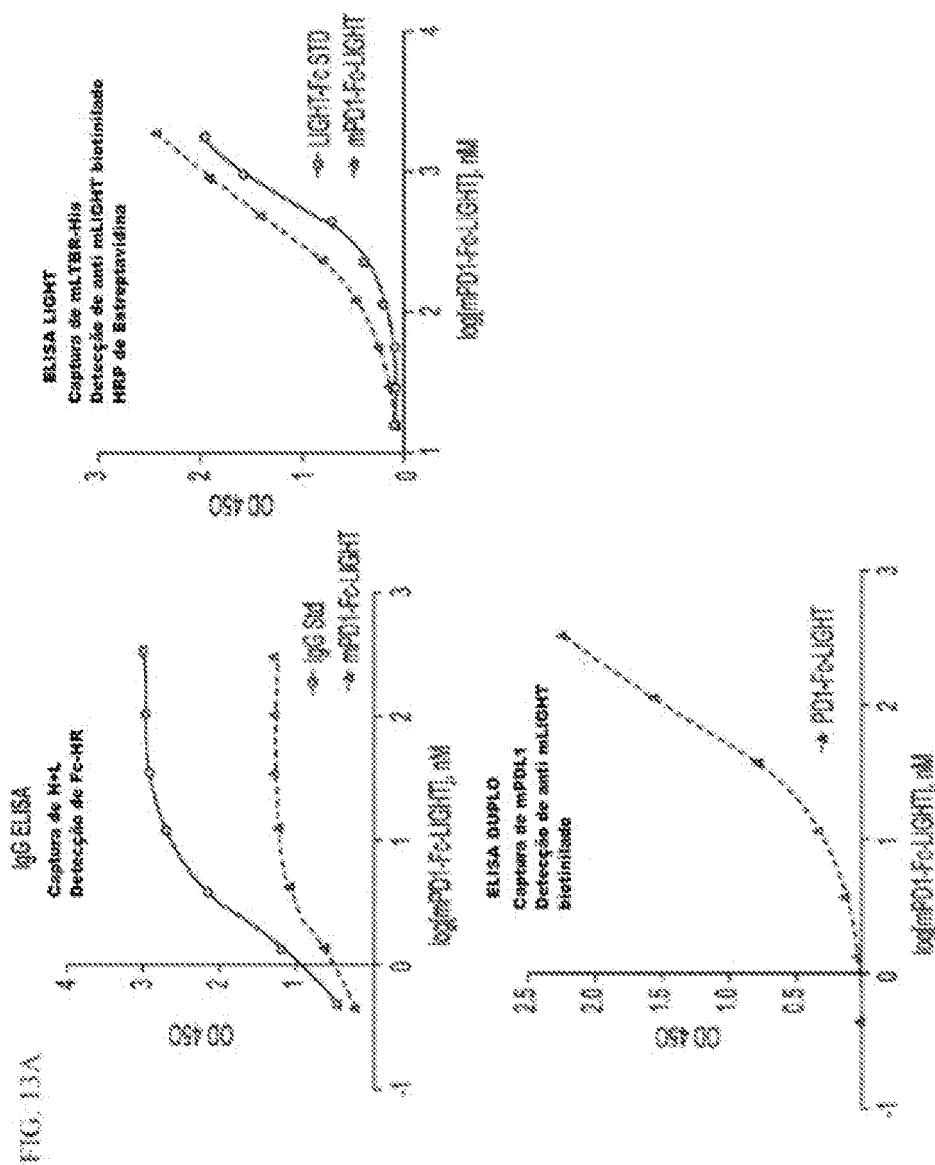


FIG. 12B.





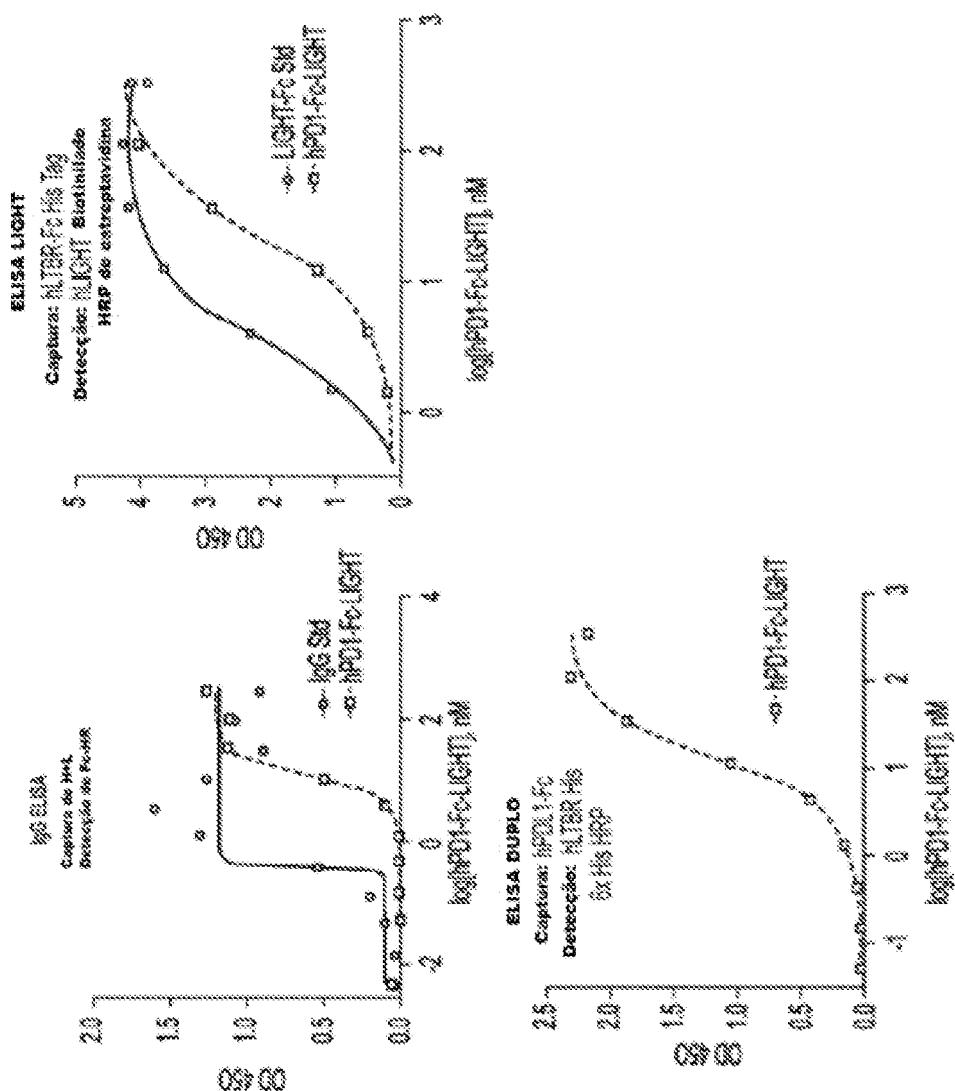


FIG. 13B

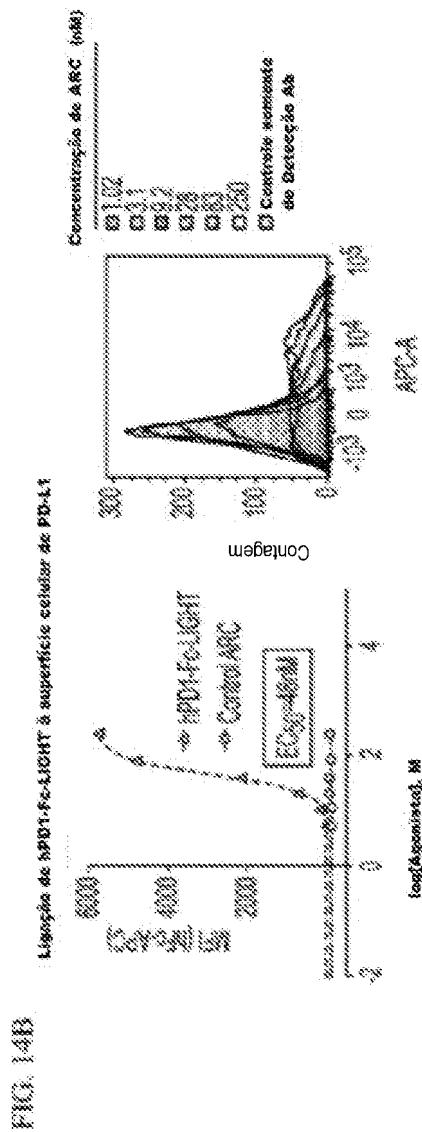
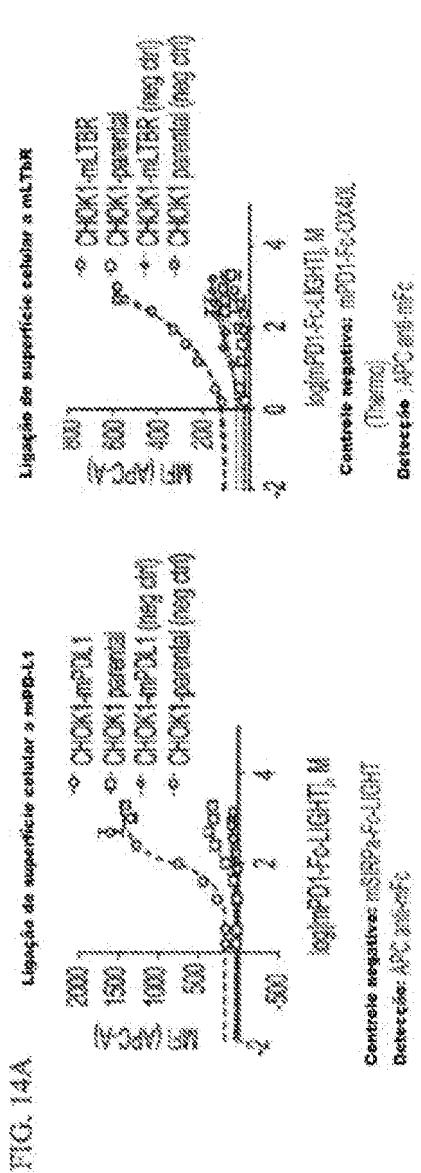


FIG. 15A

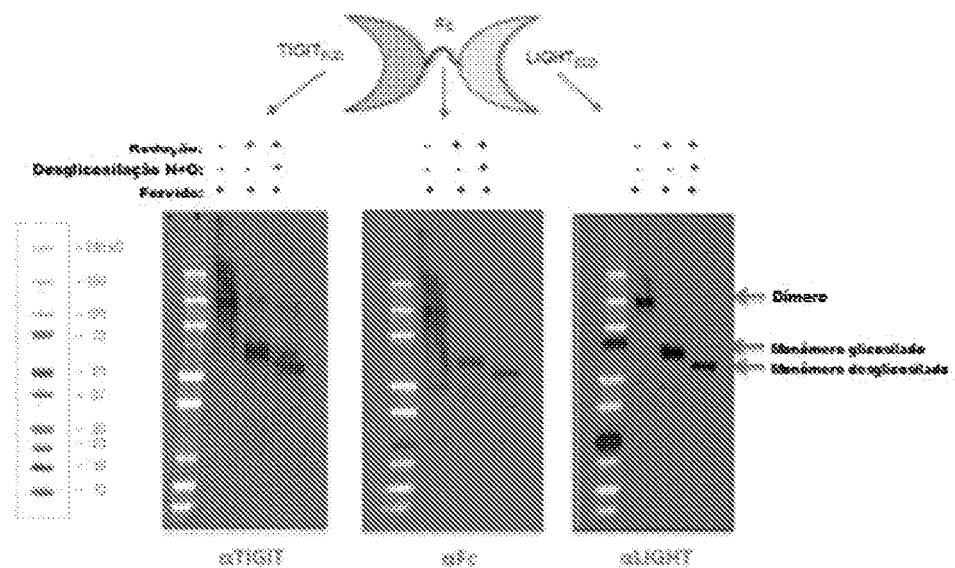
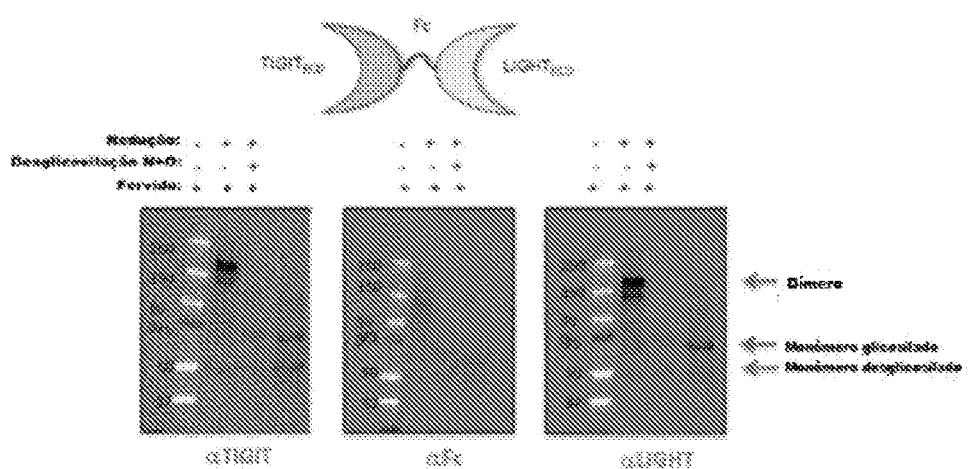


FIG. 15B



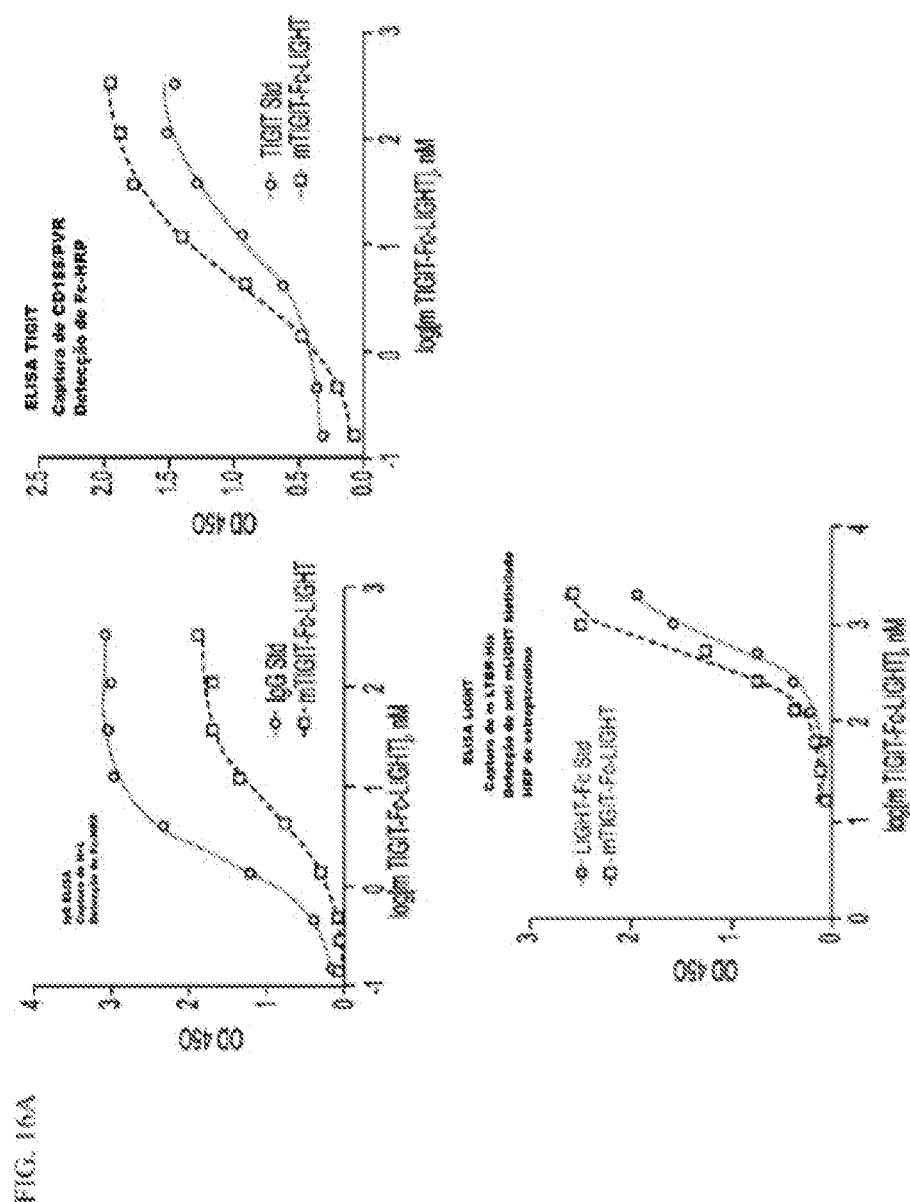
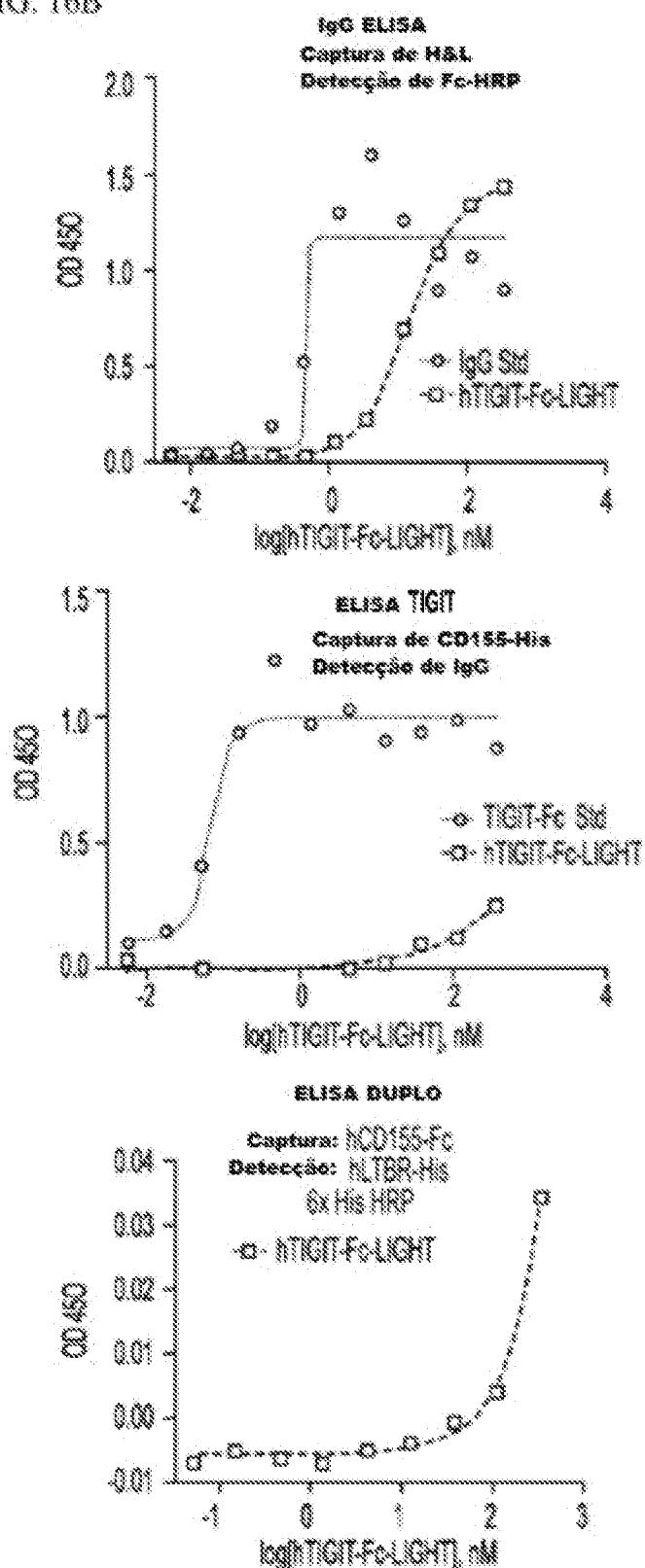
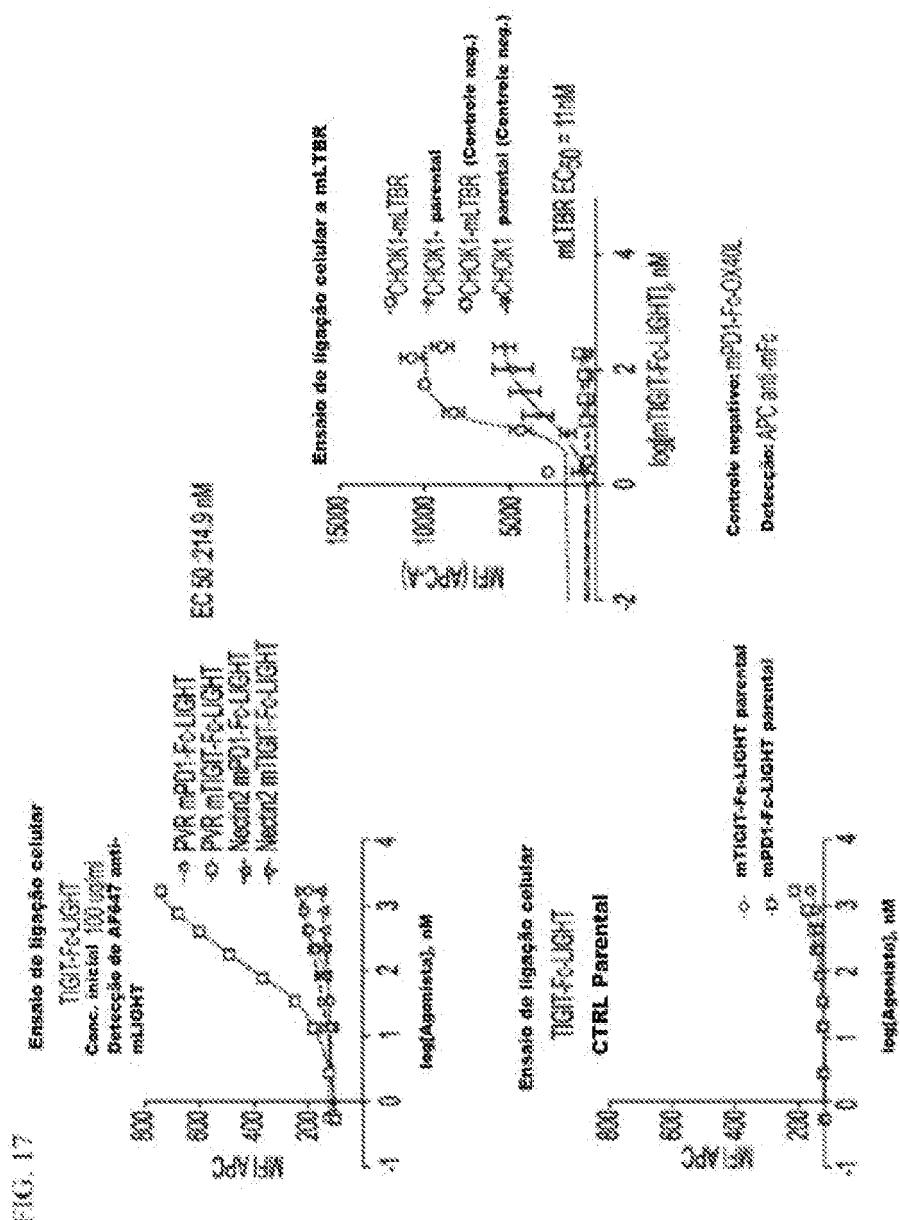


FIG. 16A

FIG. 16B





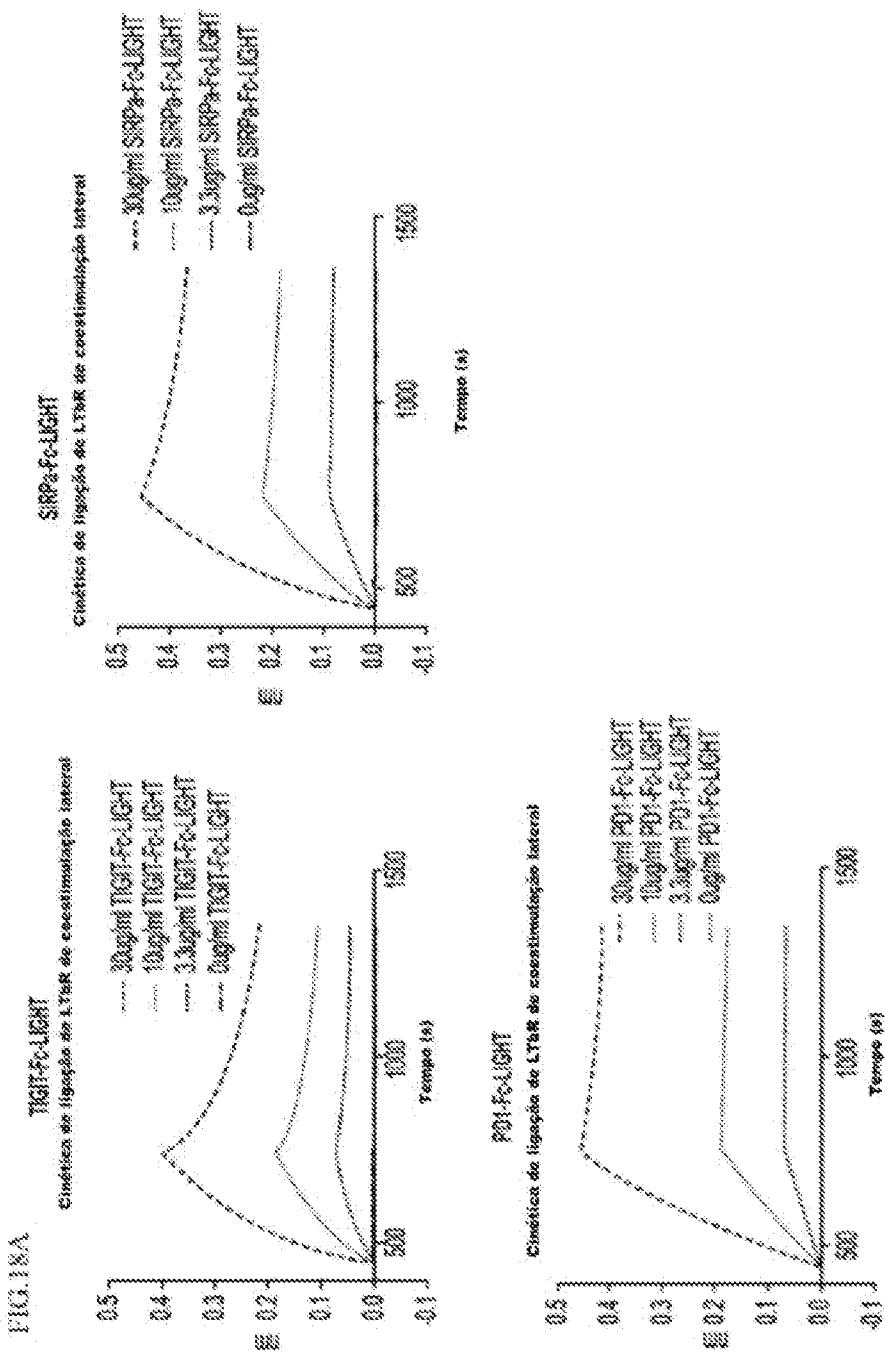


FIG. 18B

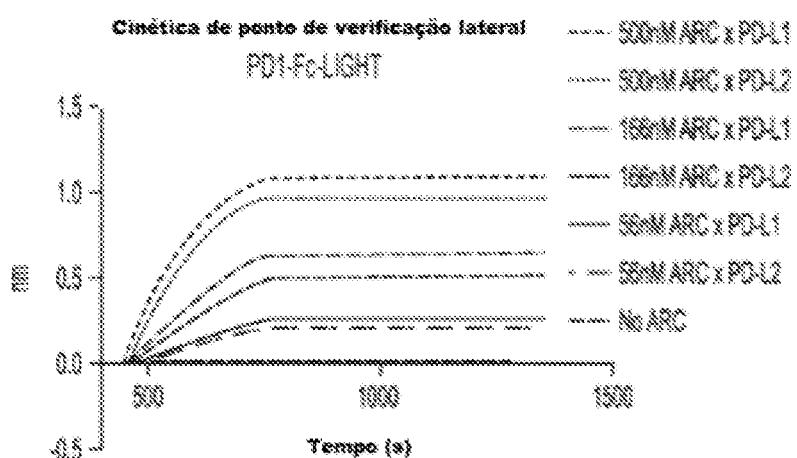


FIG. 19A

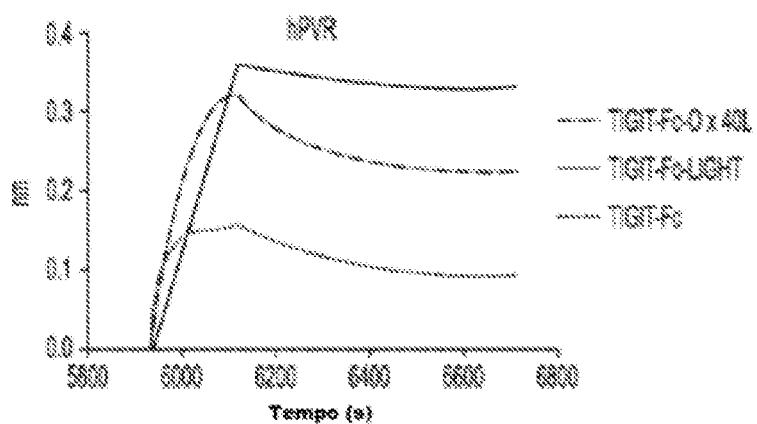


FIG. 19B

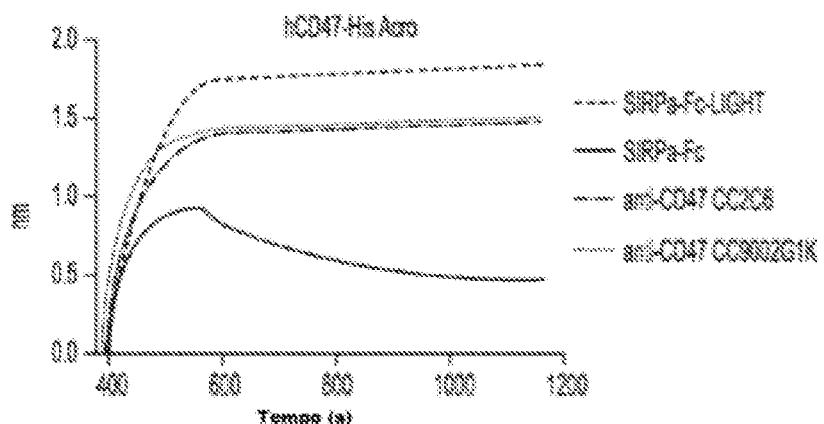
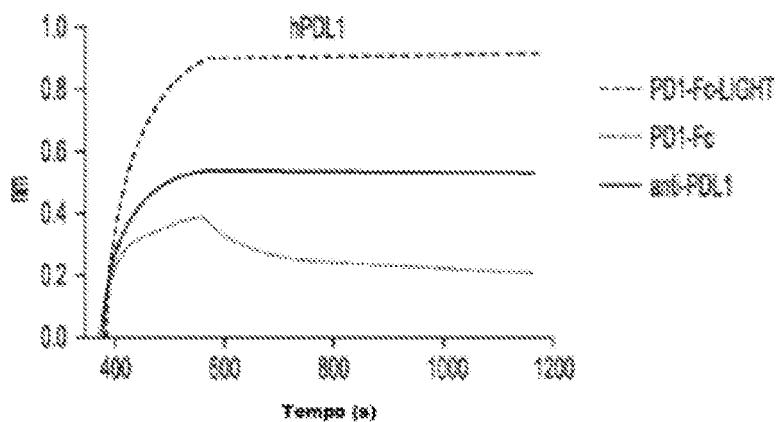
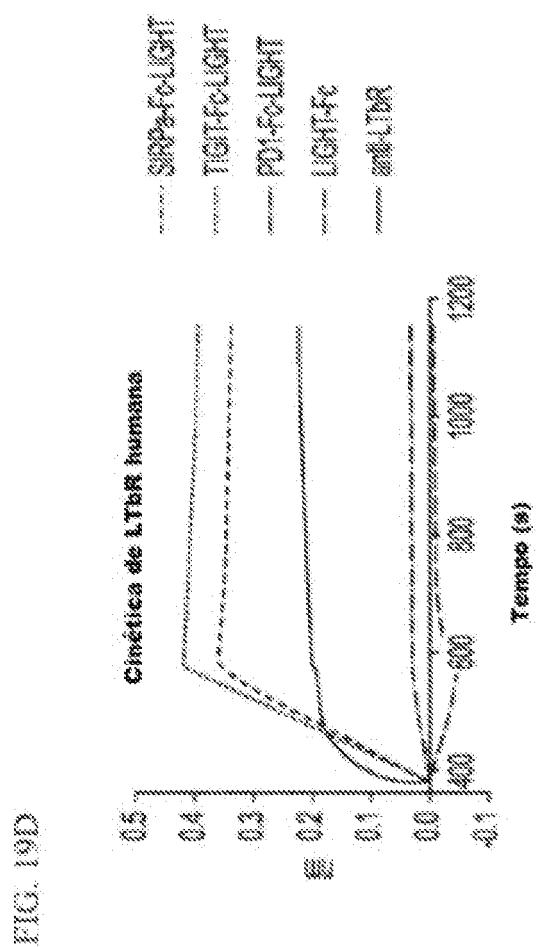
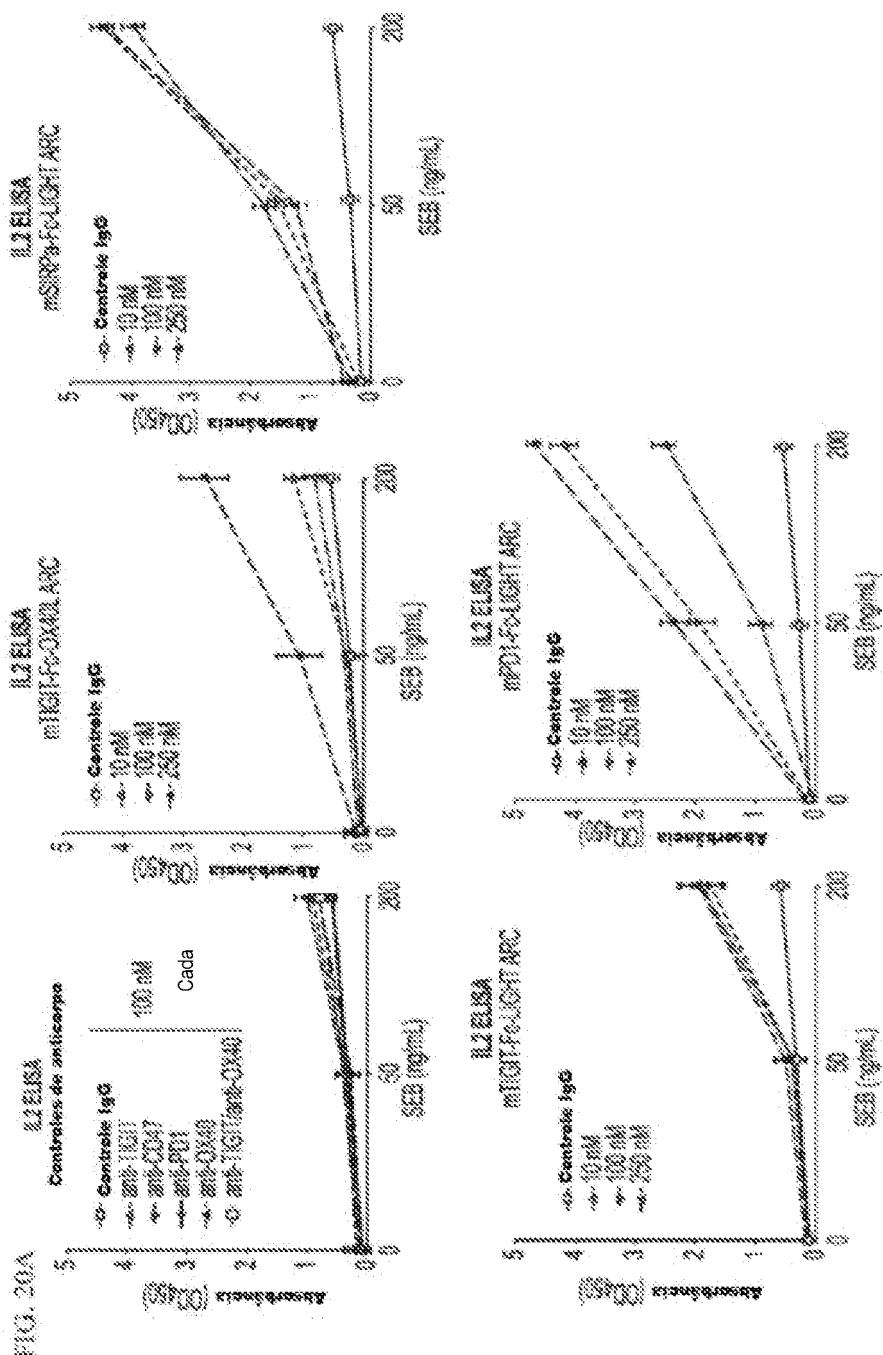
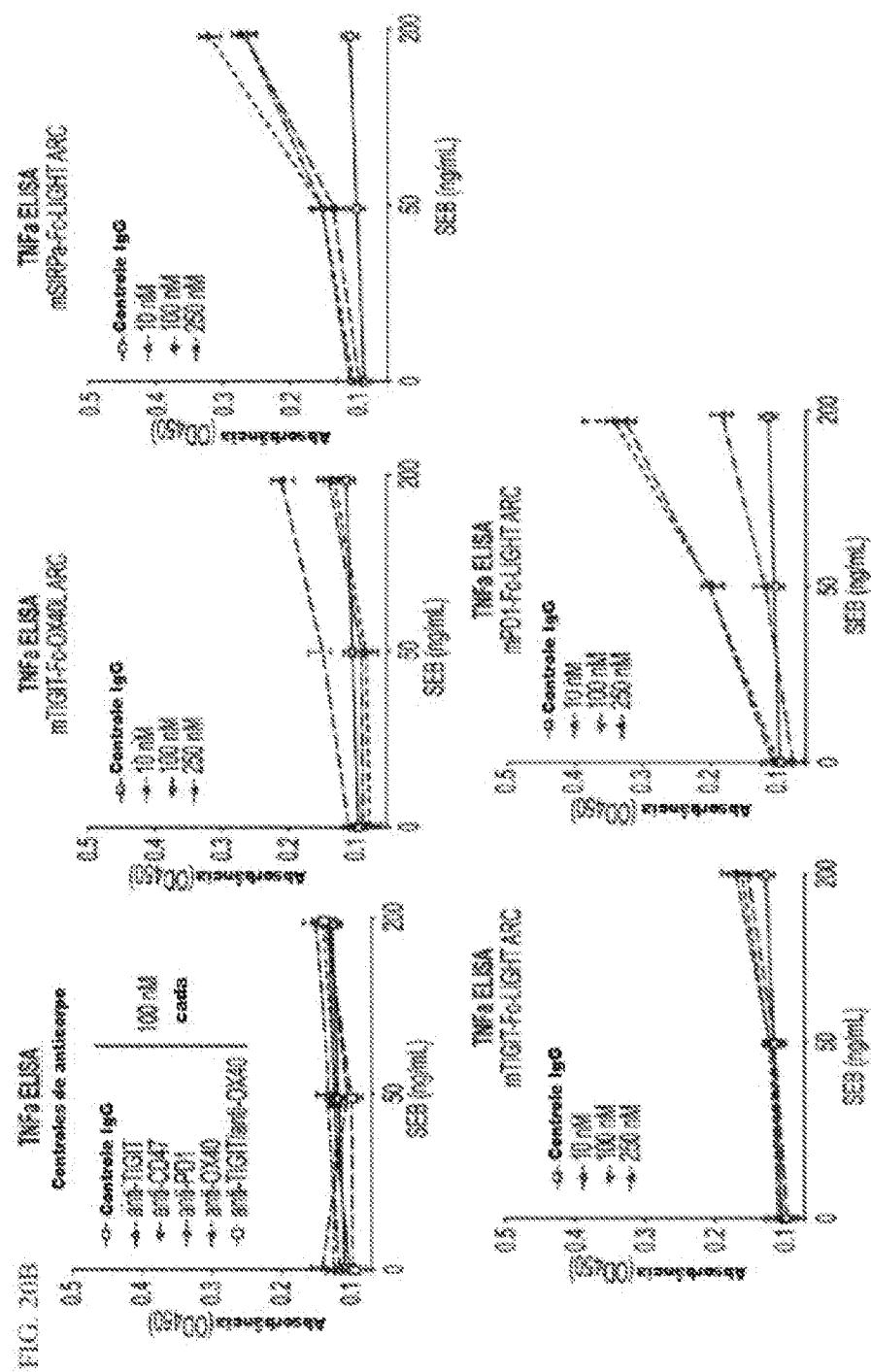


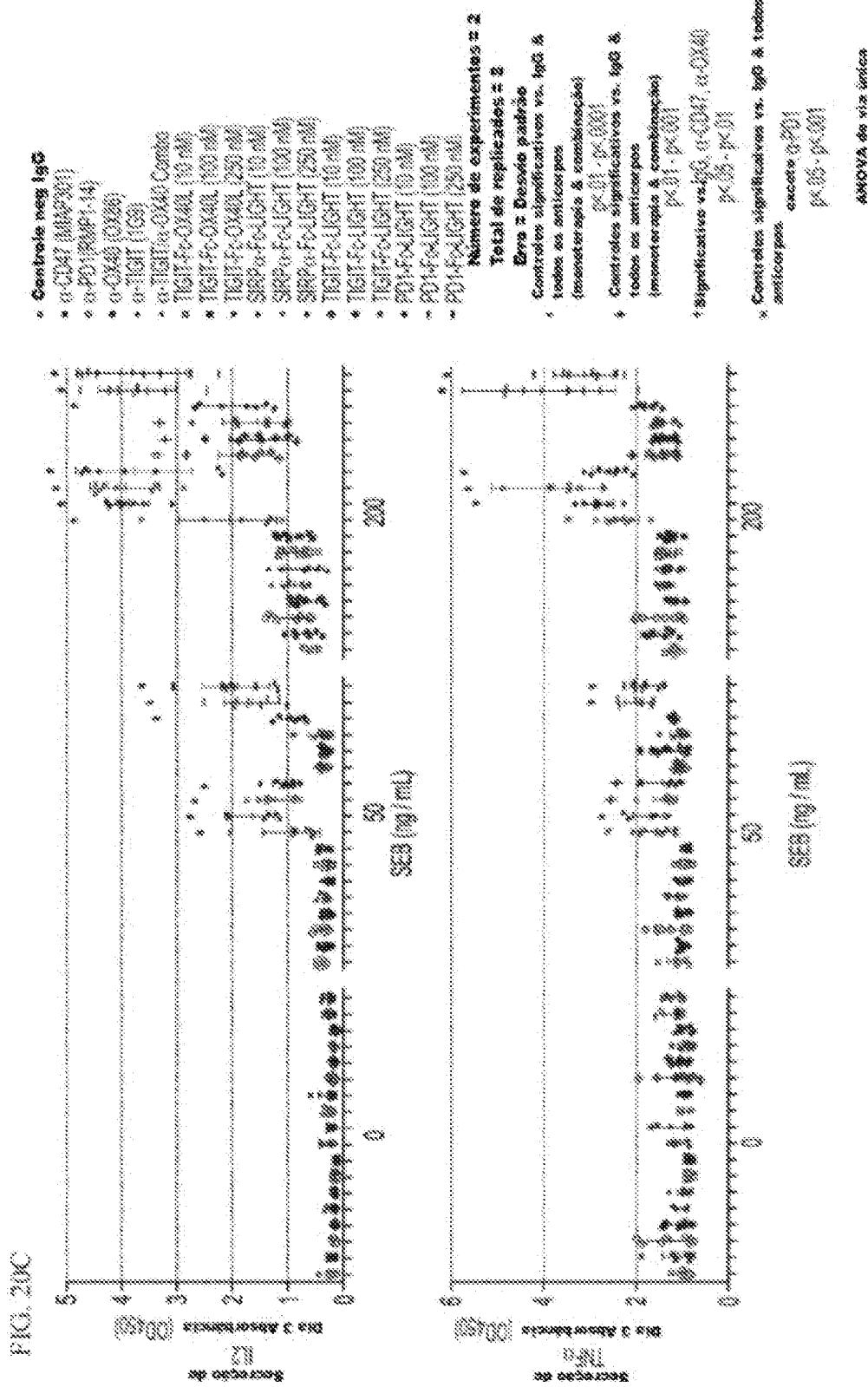
FIG. 19C

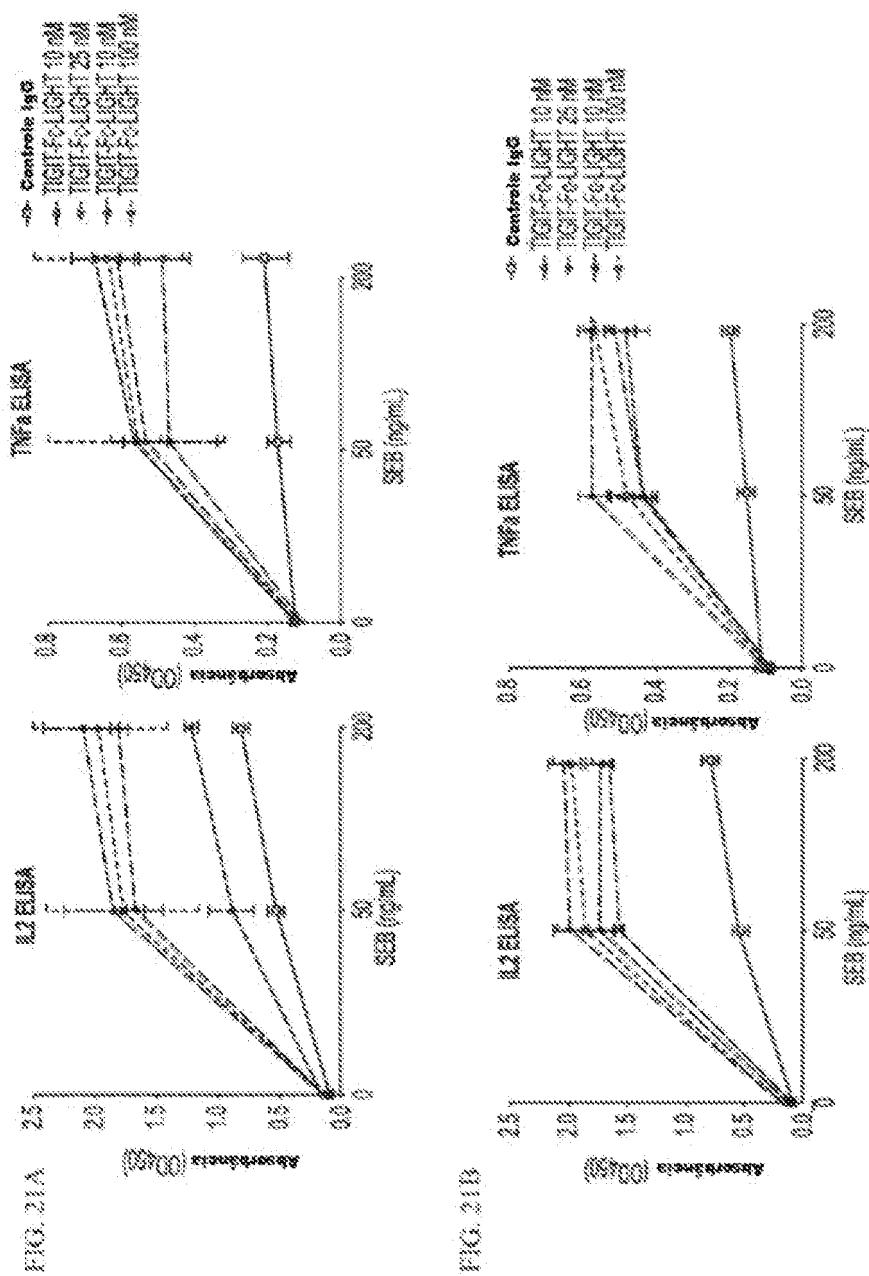


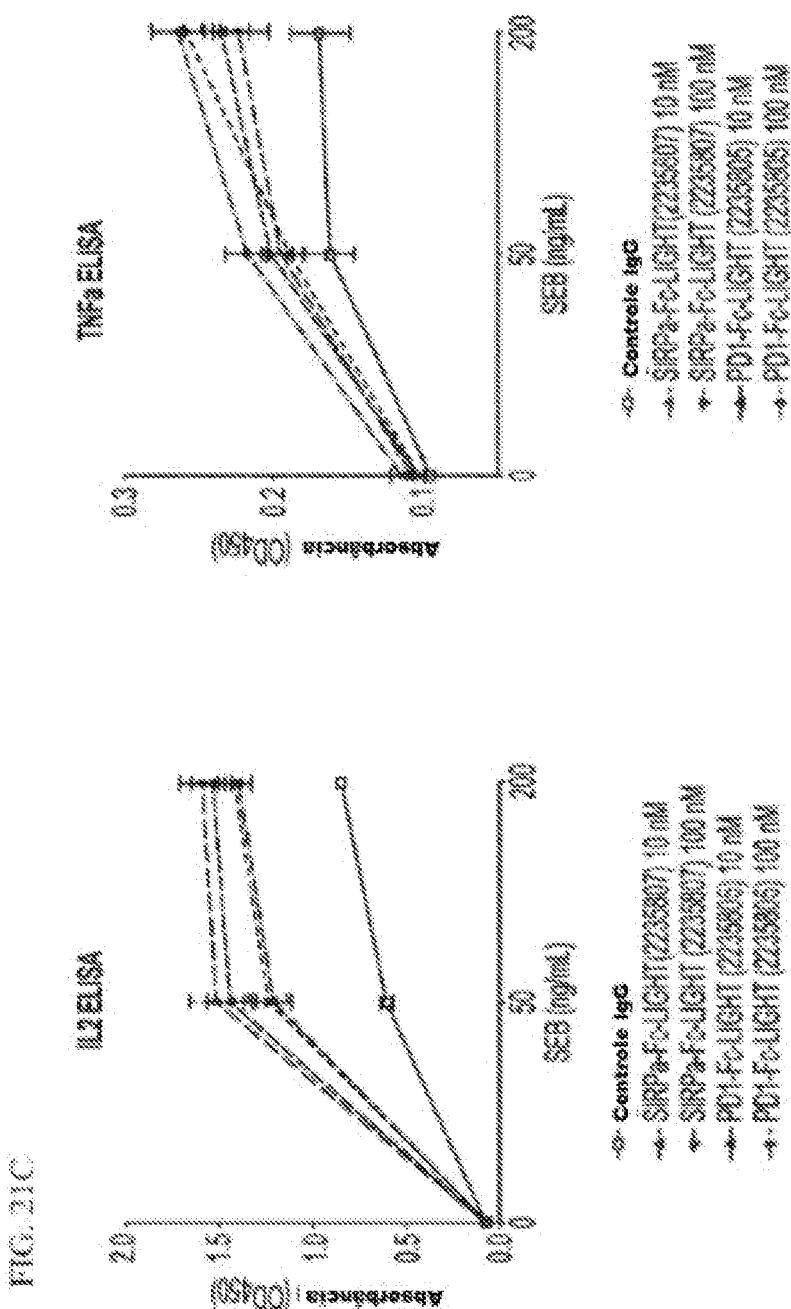












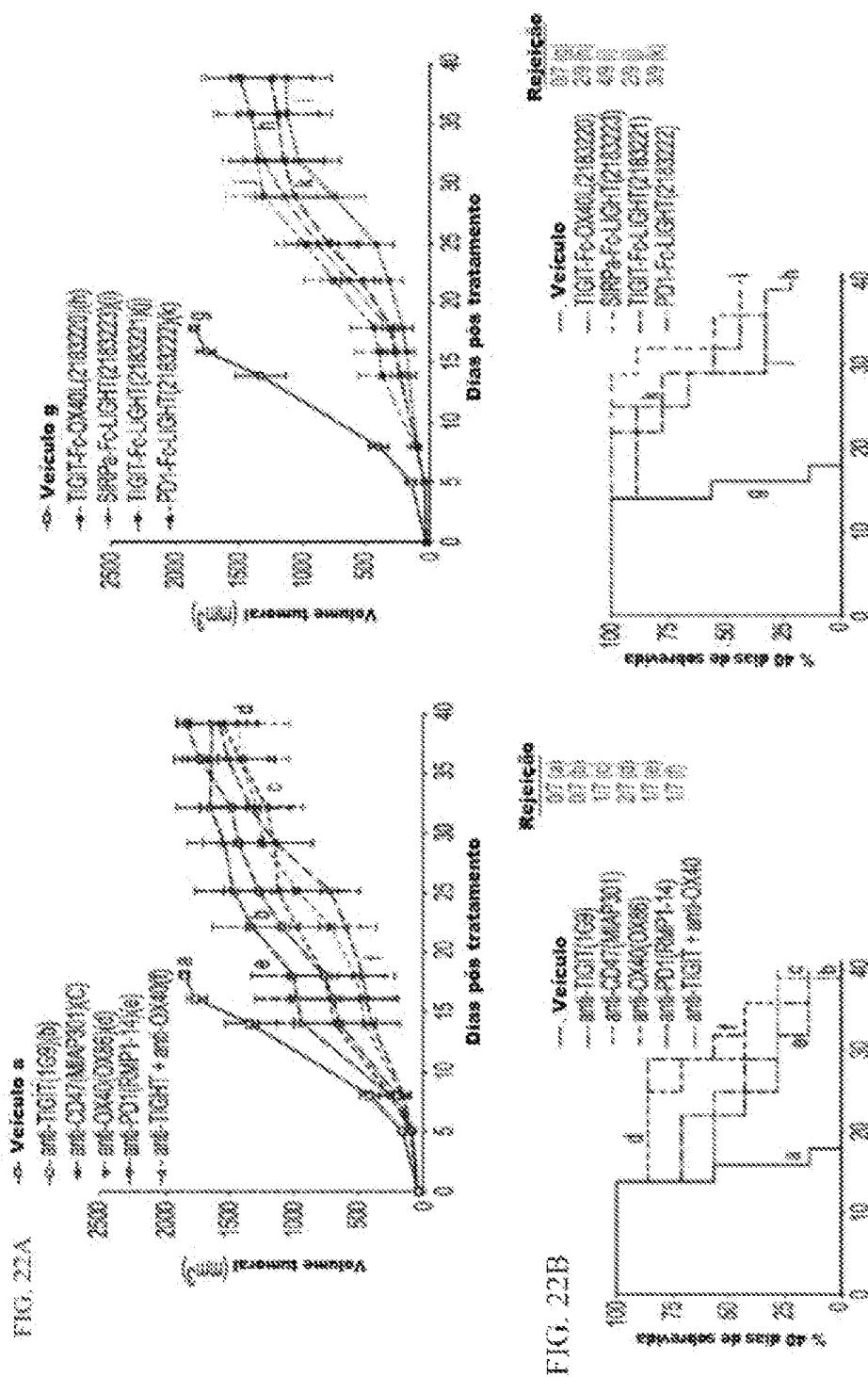


FIG. 23

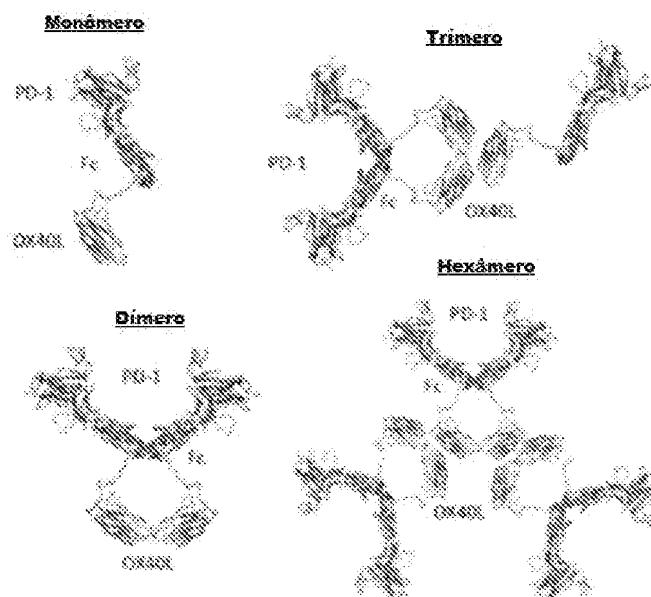


FIG. 24

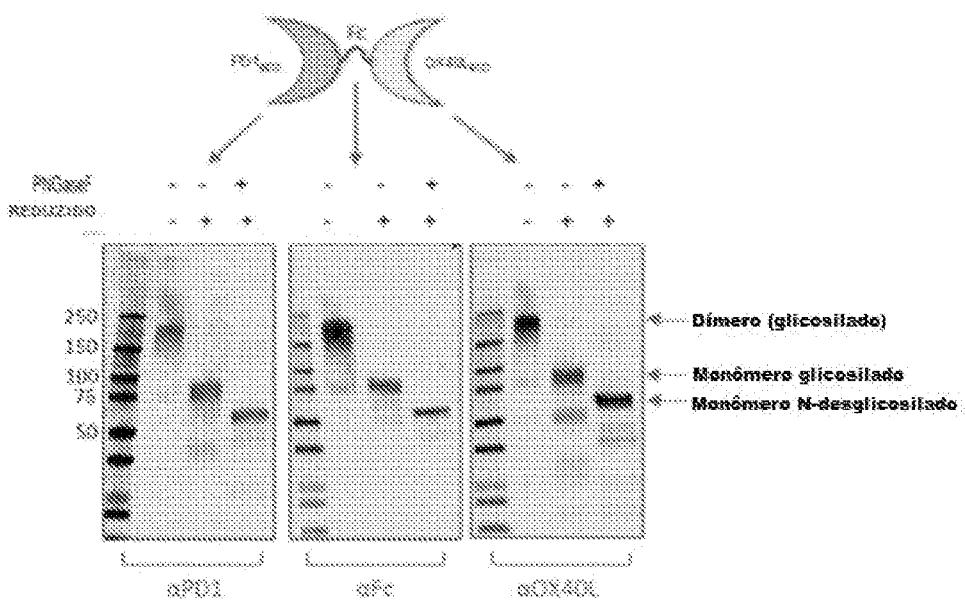


FIG. 25

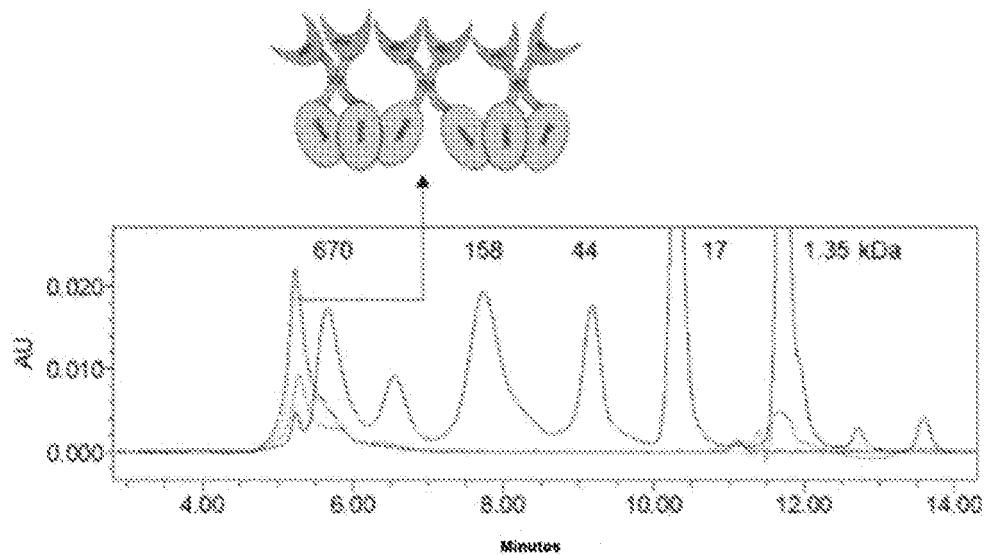


FIG. 26

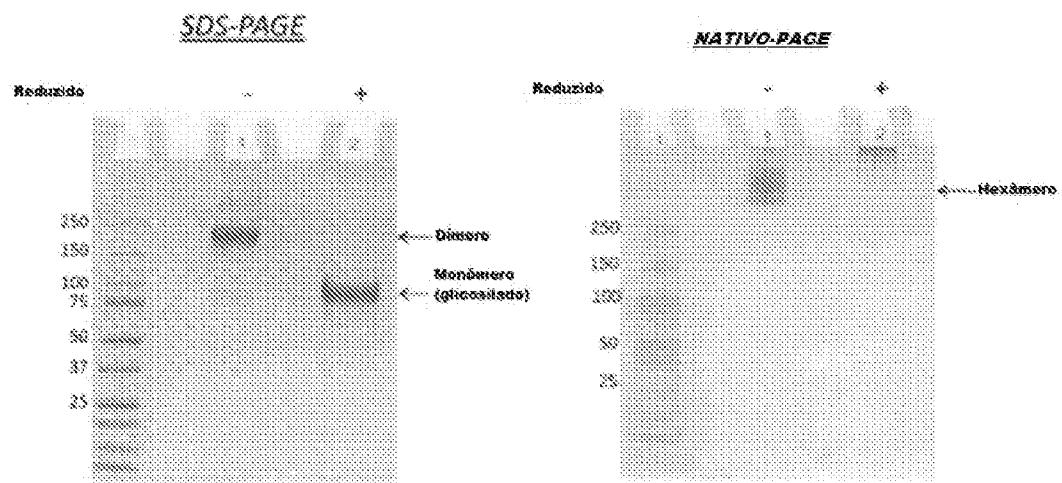


FIG. 27

Nativo-Page

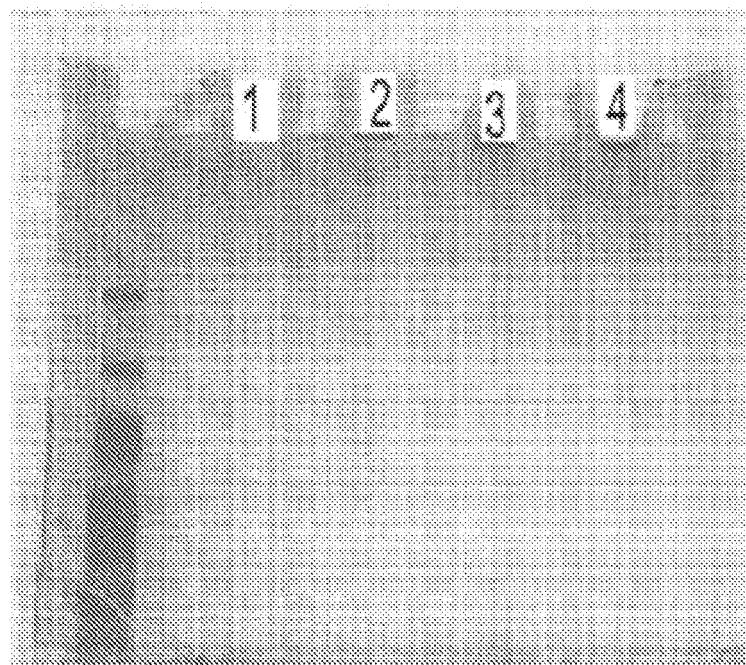


FIG. 28

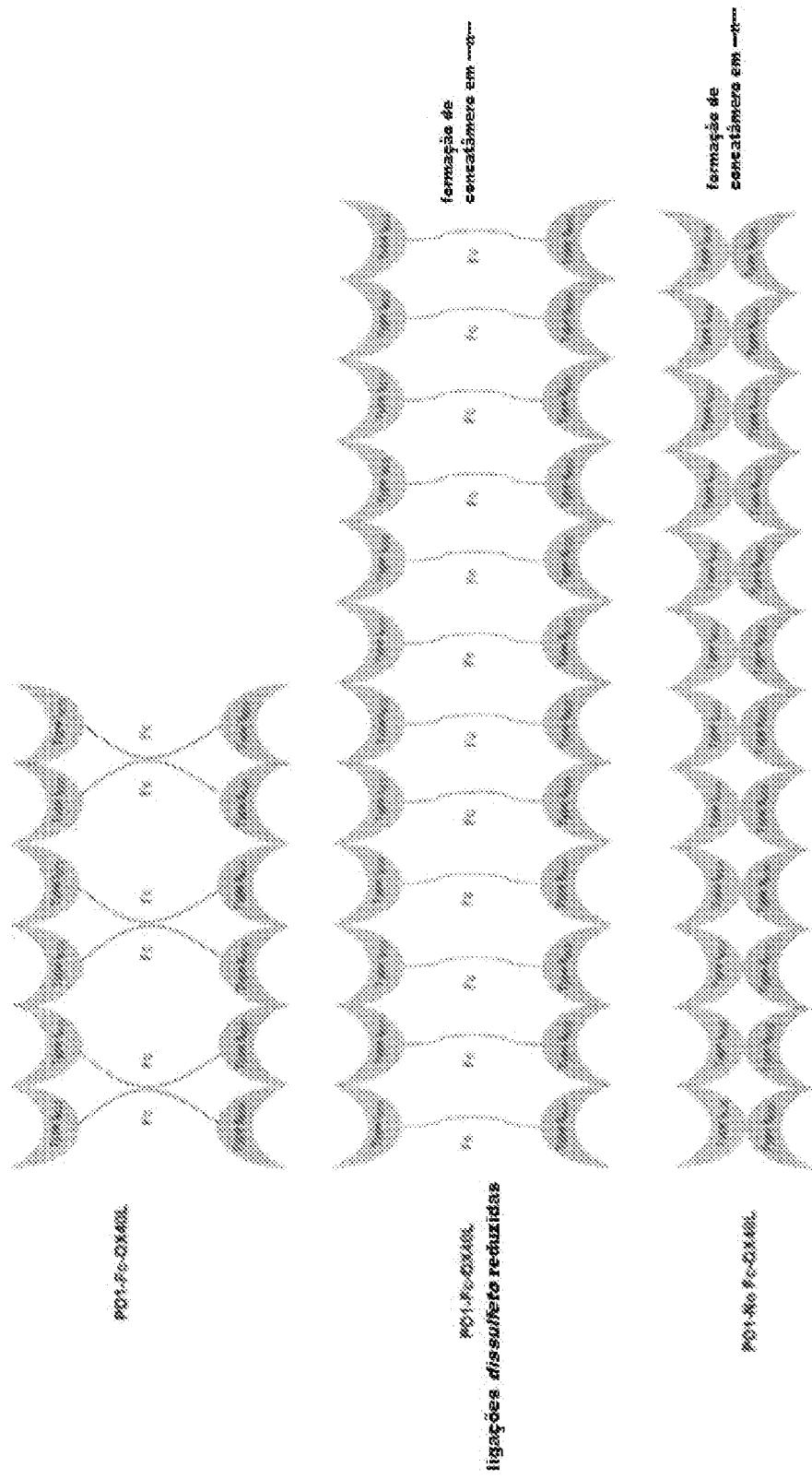


FIG. 204

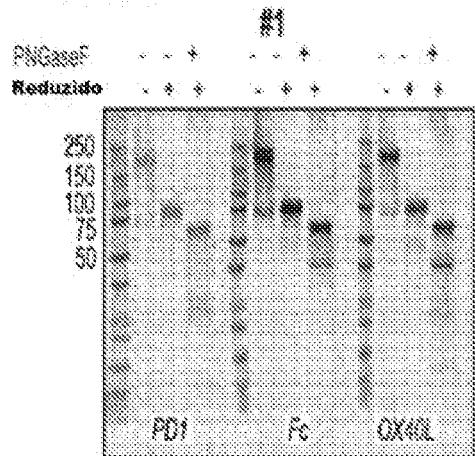


FIG. 293

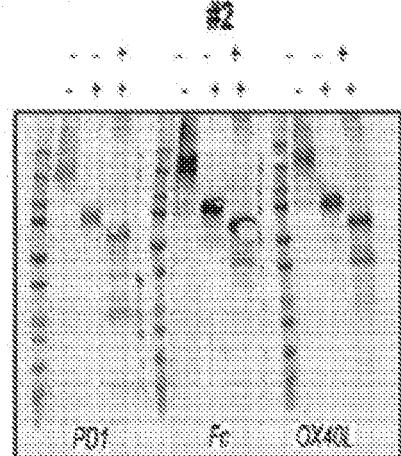


FIG. 290

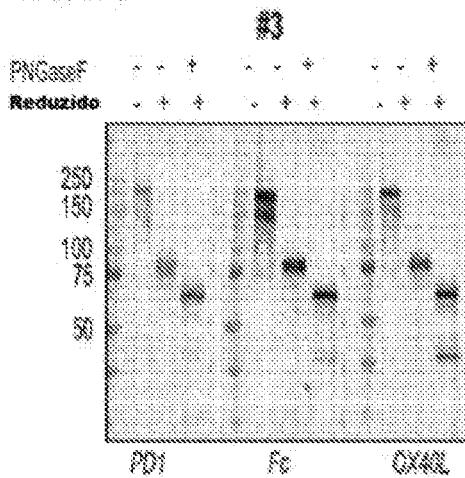


FIG. 290

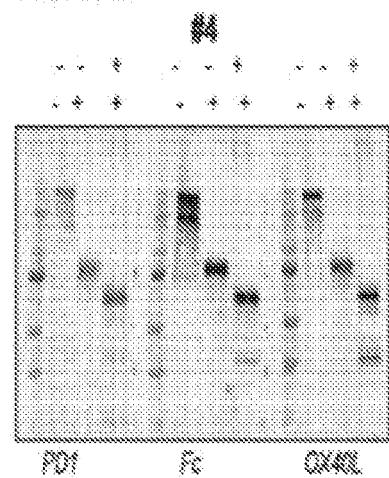


FIG. 29E

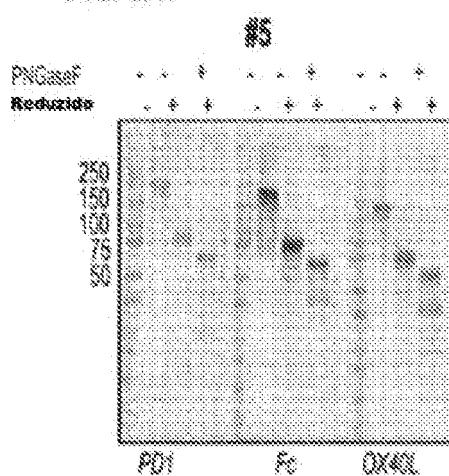


FIG. 29F

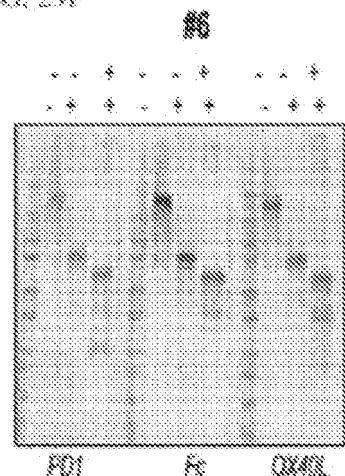


FIG. 29G

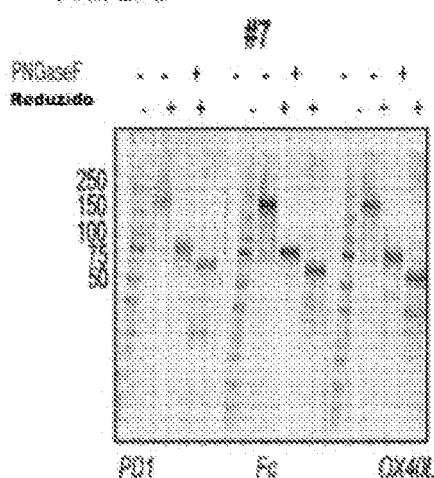


FIG. 29H

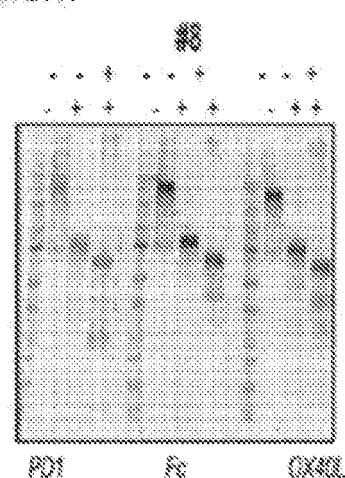


FIG. 29I

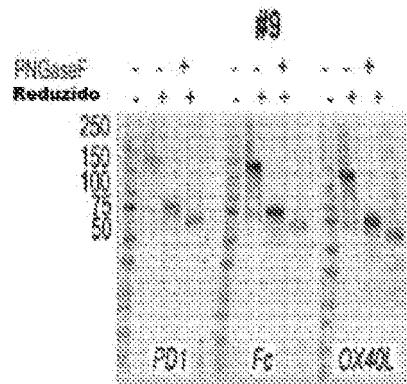


FIG. 29J

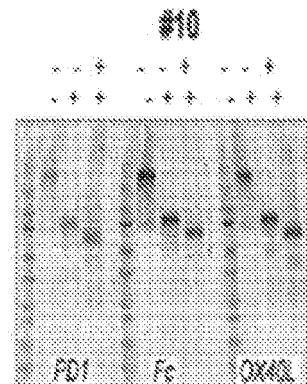


FIG. 29K

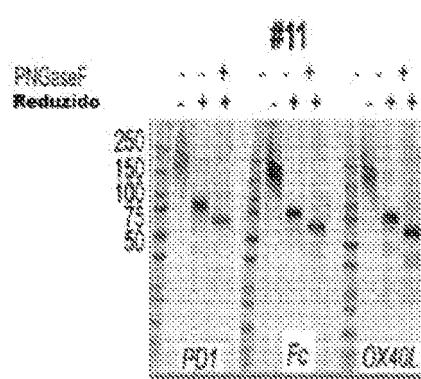


FIG. 29L

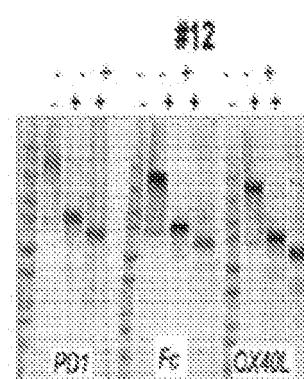


FIG. 29M

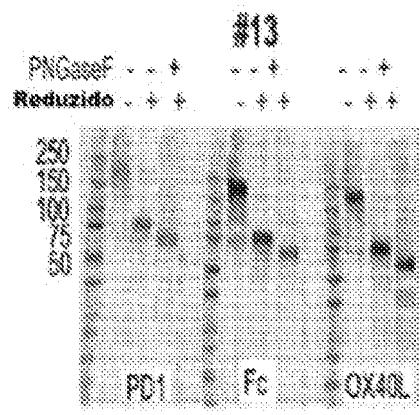


FIG. 29N

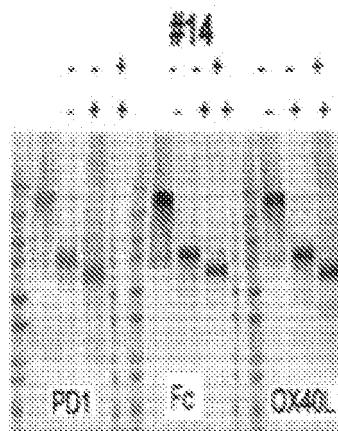


FIG. 29O

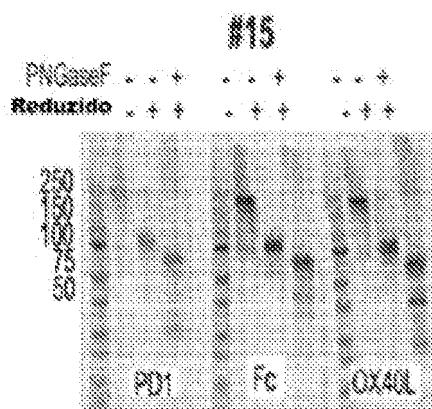


FIG. 29P

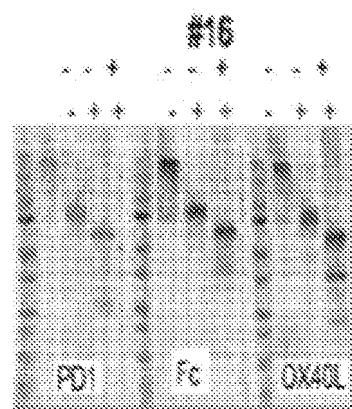


FIG. 340

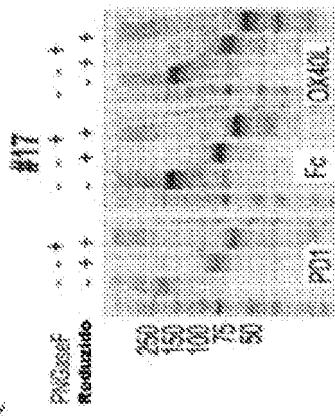


FIG. 36

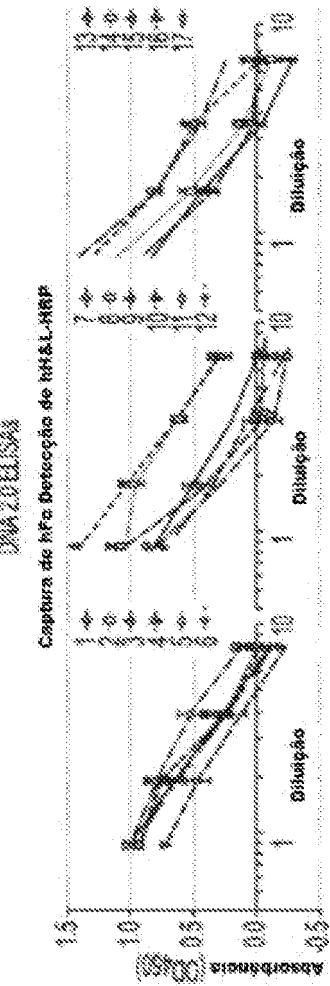


FIG. 31A

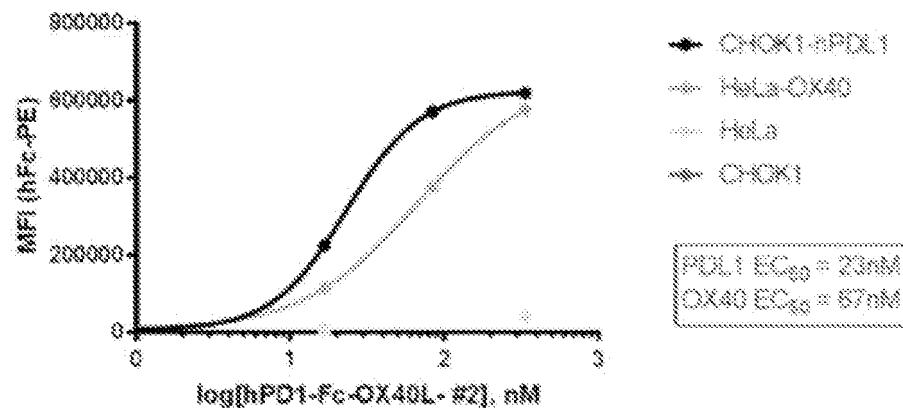


FIG. 31B

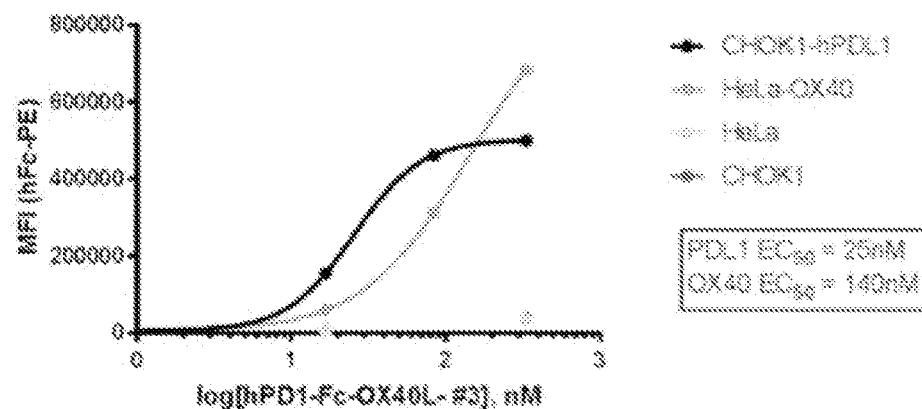


FIG. 31C

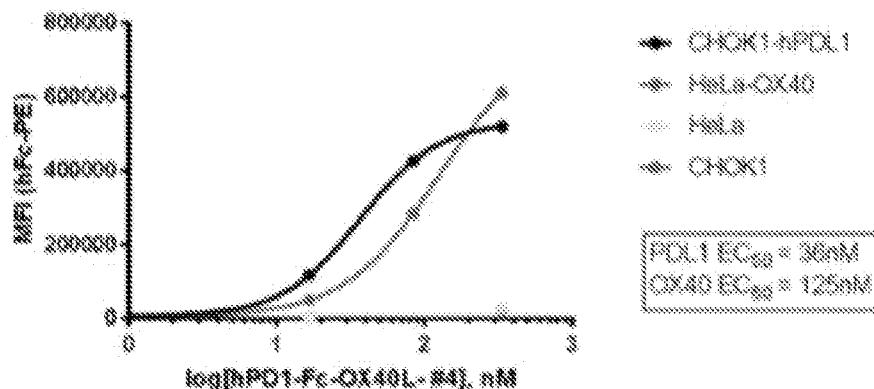


FIG. 31D

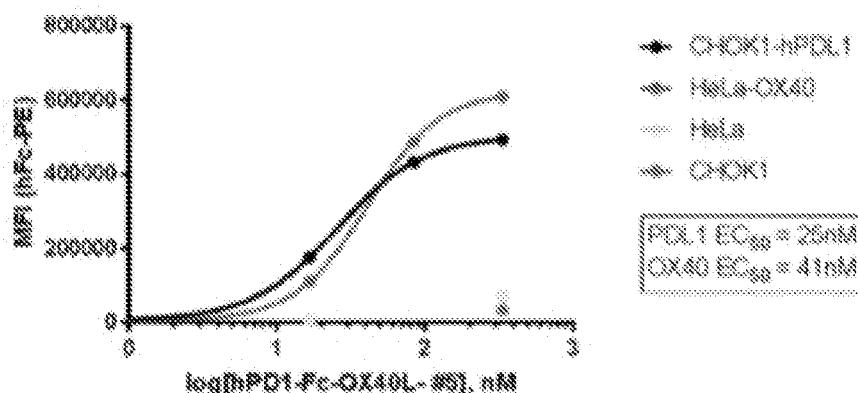


FIG. 3IE

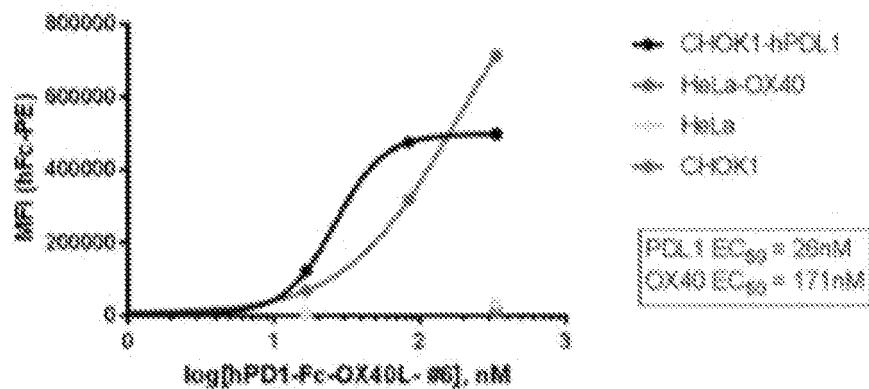


FIG. 3IF

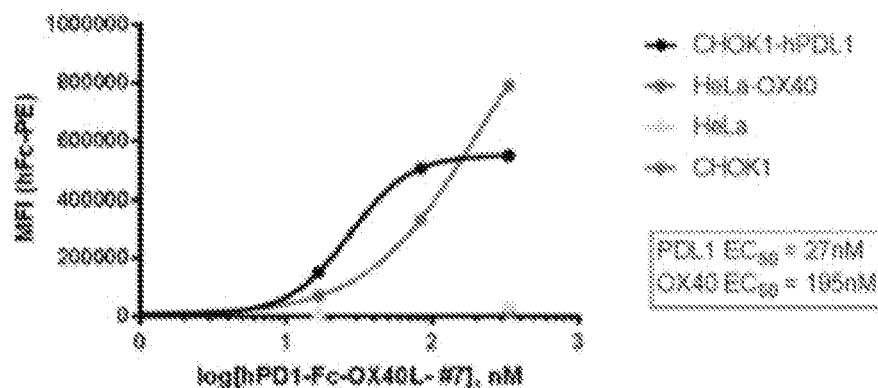


FIG. 31G

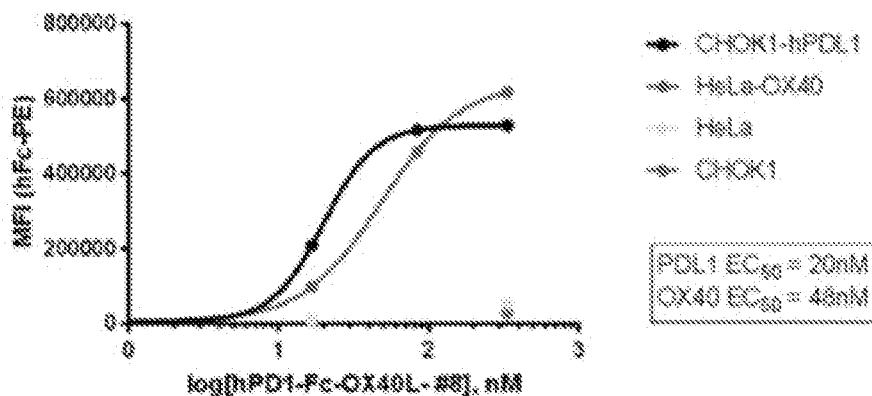


FIG. 31H

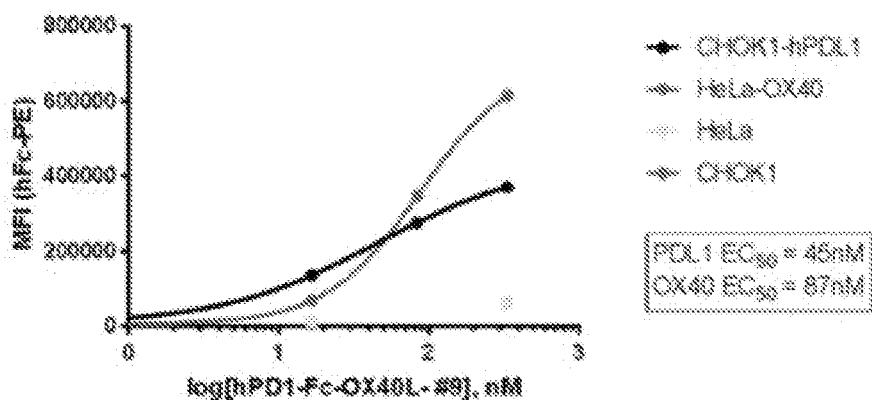


FIG. 3II

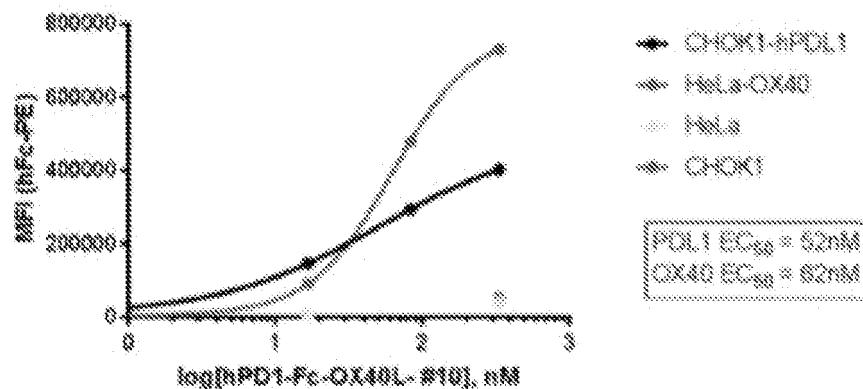


FIG. 3IU

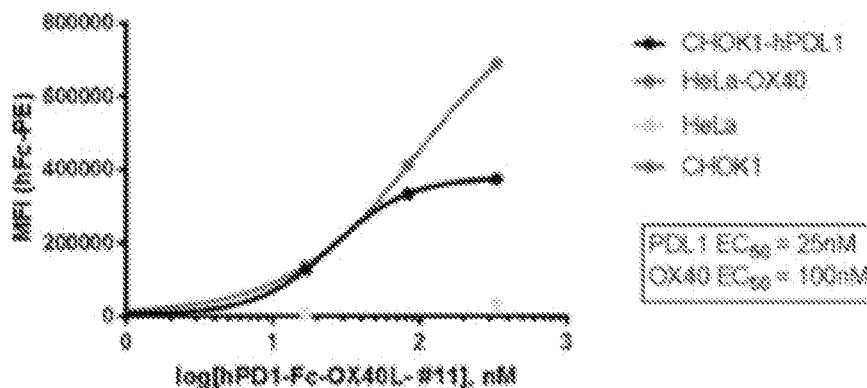


FIG. 3IK

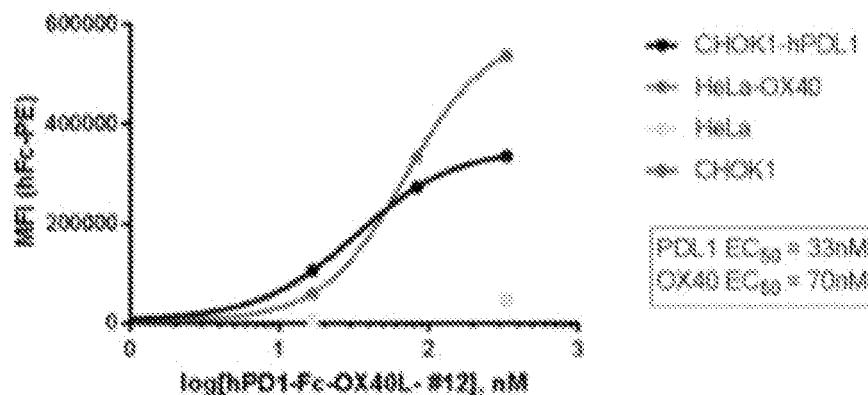


FIG. 3IL

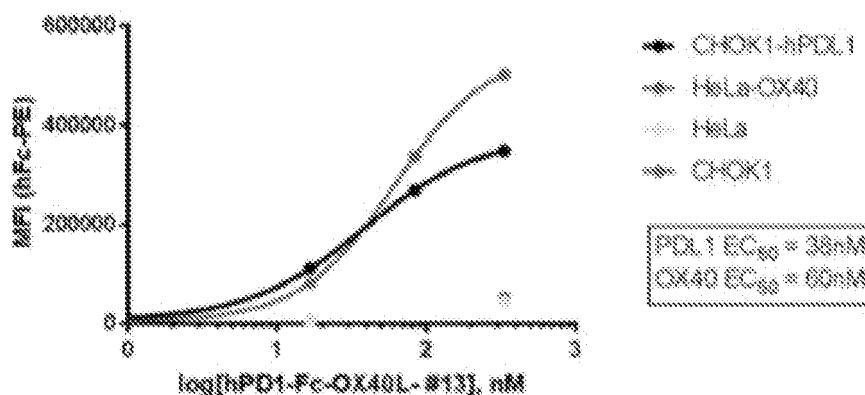


FIG. 3IM

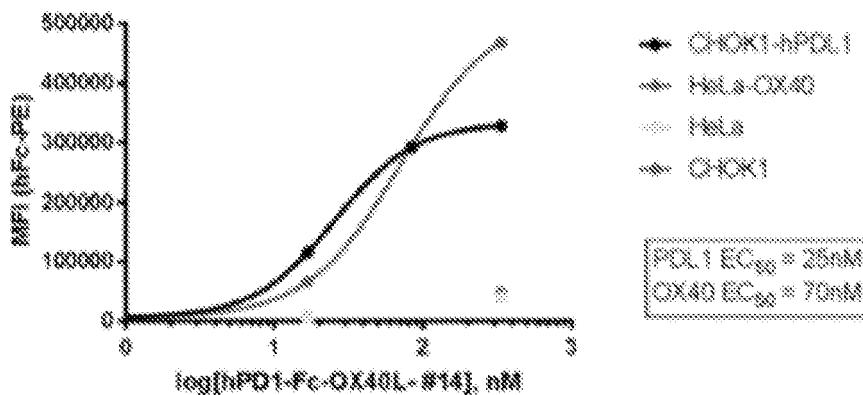


FIG. 3IN

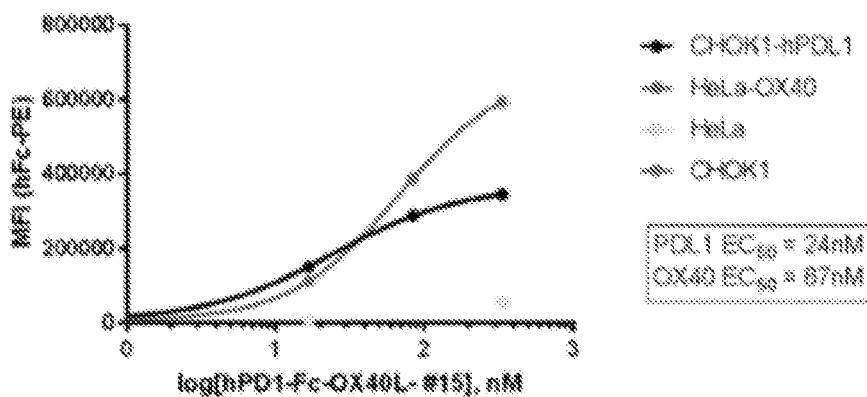


FIG. 31O

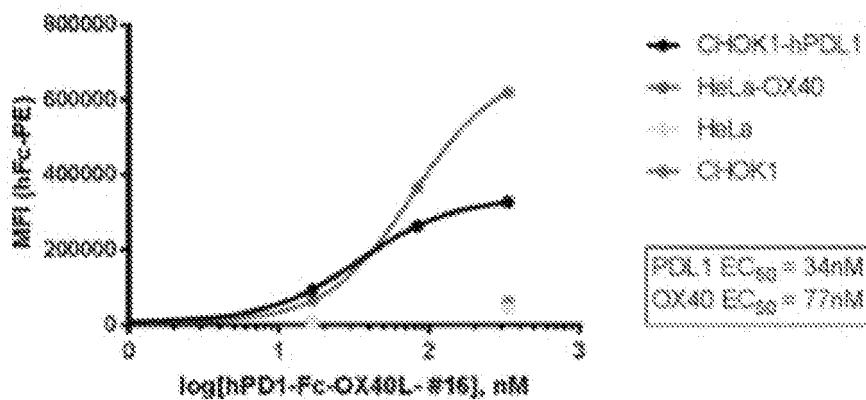
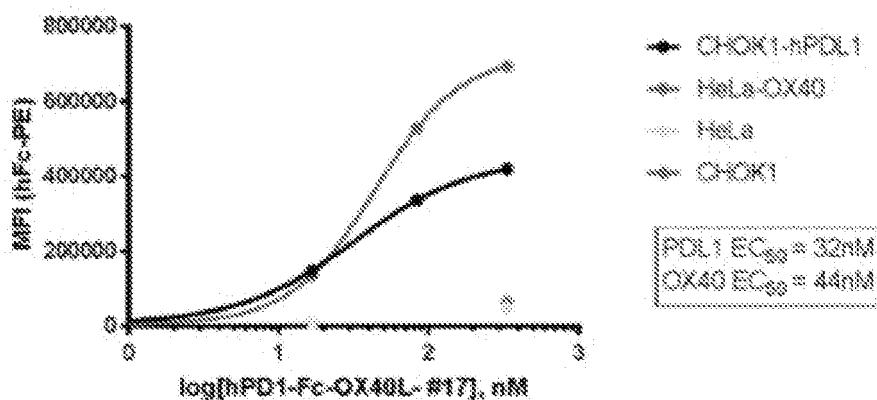


FIG. 31P



10

RESUMO

“PROTEÍNAS QUIMÉRICAS À BASE DE TIGIT E LIGHT”

A presente invenção se refere, *inter alia*, a composições e métodos, incluindo proteínas quiméricas à base de TIGIT e LIGHT, que encontram uso no tratamento de doenças, tais como câncer e uma doença inflamatória.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 20/08/2019
- Hora de Geração do Código: 12:45:52
- Código de Controle:
 - Campo 1: 69106F2C5F7EAD2B
 - Campo 2: 4CC43016B6B39EBA