



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

(21) BR 112021016829-0 A2



(22) Data do Depósito: 25/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 19/10/2021

(54) Título: PROTEÍNAS DE FUSÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO, DE ATIVAR SIMULTANEAMENTE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO, DE COESTIMULAR CÉLULAS T, DE INDUZIR UMA RESPOSTA DE LINFÓCITOS E DE INDUZIR O AUMENTO DA CITÓLISE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA PREVENIR, MELHORAR OU TRATAR CÂNCERES

(51) Int. Cl.: C07K 14/47; A61P 35/00; C07K 16/28; C07K 16/32; A61K 38/00.

(30) Prioridade Unionista: 26/02/2019 EP 19000100.8.

(71) Depositante(es): PIERIS PHARMACEUTICALS GMBH.

(72) Inventor(es): RACHIDA SIHAM BEL AIBA; BIRGIT BOSSENMAIER; THOMAS JAQUIN; JANET PEPER-GABRIEL; EVA-MARIA HANSBAUER; CORINNA SCHLOSSER; SHANE OLWILL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2020054821 de 25/02/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/173897 de 03/09/2020

(85) Data da Fase Nacional: 25/08/2021

(57) Resumo: PROTEÍNAS DE FUSÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO, DE ATIVAR SIMULTANEAMENTE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO, DE COESTIMULAR CÉLULAS T, DE INDUZIR UMA RESPOSTA DE LINFÓCITOS E DE INDUZIR O AUMENTO DA CITÓLISE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA PREVENIR, MELHORAR OU TRATAR CÂNCERES. A divulgação fornece proteínas de fusão específicas para CD137 e GPC3, cuja proteína de fusão pode ser usada para coestimular a ativação de linfócitos de uma maneira dependente do alvo GPC3. Tais proteínas de fusão podem ser usadas em diversas aplicações farmacêuticas, por exemplo, como agentes anticâncer e/ou moduladores imunológicos para o tratamento ou prevenção de doenças humanas, tal como uma variedade de tumores. A presente divulgação também diz respeito a métodos para a produção das proteínas de fusão aqui descritas, bem como composições compreendendo tais proteínas de fusão. A presente divulgação diz respeito ainda às moléculas de ácido nucleico que codificam tais proteínas de fusão e aos métodos para a geração de tais proteínas de fusão e moléculas de ácido nucleico. Além disso, o presente pedido descreve utilizações terapêuticas e/ou de diagnóstico de tais proteínas de fusão, bem como composições compreendendo uma ou mais dessas proteínas de fusão.



SEQ ID NOs: 87 e 82

SEQ ID NOs: 91 e 82

SEQ ID NOs: 95 e 82

SEQ ID NOs: 96 e 82

“PROTEÍNAS DE FUSÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO, DE ATIVAR SIMULTANEAMENTE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO, DE COESTIMULAR CÉLULAS T, DE INDUZIR UMA RESPOSTA DE LINFÓCITOS E DE INDUZIR O AUMENTO DA CITÓLISE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA PREVENIR, MELHORAR OU TRATAR CÂNCERES”

I. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[001] A Glipicana-3 (GPC3, também denominada DGSX, GTR2-2, MXR7, OCI-5, SDYS, SGB, SGBS e SGBS1) é um antígeno oncofetal que pertence à família glicosil-fosfatidilinositol de sulfato proteoglicanos de heparina ancorados em glicosil-fosfatidilinositol. A GPC3 é expressa em vários tecidos durante o desenvolvimento, desempenhando papéis significativos na morfogênese e crescimento através, por exemplo, do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), *Wnt* não canônico ou via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (Cheng *et al.*, *Carcinogenesis*, 2008, Song *et al.*, *J Biol Chem*, 2005, Song *et al.*, *J Biol Chem*, 1997). No entanto, a expressão de *GPC3* é regulada negativamente ou silenciada na maioria dos tecidos adultos normais. Além disso, a GPC3 pode regular o crescimento celular de forma positiva e negativa, dependendo do tipo de célula. Mutações de perda de função de GPC3 são responsáveis pela síndrome de dismorfia de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), um raro distúrbio de crescimento excessivo ligado ao cromossomo X, e pacientes com SGBS têm um risco aumentado de tumores embrionários (Pilia *et al.*, *Nat Genet*, 1996), incluindo os tumores de Wilms.

[002] A GPC3 é expressa em vários tipos de câncer, incluindo câncer de fígado, carcinoma gástrico, melanoma, carcinoma urotelial de alto grau, testicular e alguns cânceres uterinos e vaginais (Aydin *et al.*, *Diagn*

Pathol, 2015, Ushiku *et al.*, *Cancer Sci*, 2009, Gailey e Bellizzi, *Am J Clin Pathol*, 2013, Yamanaka *et al.*, *Oncologia*, 2007, Nakatsura *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2004, Zynger *et al.*, *Am J Surg Pathol*, 2006, Montalbano *et al.*, *Int J Oncol*, 2016, Midorikawa *et al.*, *Int J Cancer*, 2003). Em particular, a proteína GPC3 é altamente expressa no carcinoma hepatocelular (HCC) (Capurro *et al.*, *Gastroenterology*, 2003, Nakatsura *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, Sung *et al.*, *Cancer Sci*, 2003, Zhu *et al.*, *Gut*, 2001), uma forma importante de câncer de fígado que é responsável por 90% de todos os cânceres de fígado e que resulta em pelo menos 500.000 mortes por ano (Jelic *et al.*, *Ann Oncol*, 2010). Extensa investigação tem sido realizada sobre a GPC3 como um biomarcador diagnóstico e um alvo terapêutico para o HCC e outros tipos de cânceres. Vários anticorpos direcionados a GPC3, incluindo anticorpos de camundongo humanizado YP7 e GC33 e anticorpo humano HN3 e MDX-1414, foram gerados, no entanto, não mostraram a capacidade de inibir a proliferação de células de HCC ou induzir a apoptose (Feng e Ho, *FEBS Lett*, 2014). Excepcionalmente, a proteína GC33 está atualmente sendo avaliada em ensaios clínicos para CHC. O mecanismo da função de GC33 inclui citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), mas GC33 não inibe diretamente a proliferação de células tumorais GPC3-positivas (Takai *et al.*, *Cancer Biol Ther*, 2009, Nakano *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, Ishiguro *et al.*, *Cancer Res*, 2008). No entanto, embora GC33 tenha demonstrado inibição do crescimento tumoral *in vivo*, não forneceu eficácia clínica satisfatória. Enquanto isso, resultados experimentais de silenciamento gênico (*knock-down*) e siRNA sugerem que GPC3 não é um gene letal para as células de carcinoma hepatocelular, o que torna incerto se anticorpos anti-GPC3 poderiam causar uma eficiente regressão do tumor.

[003] O aglomerado de diferenciação 137 ou CD137 (do inglês,

Cluster of Differentiation 137), (também conhecido como 4-1BB ou TNFRS9), é um receptor imune coestimulador e um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Ele é expresso principalmente em células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, células B ativadas e células assassinas naturais (NK), mas também pode ser encontrado em monócitos em repouso e células dendríticas (Li e Liu, *Clin Pharmacol.*, 2013) ou células endoteliais (Snell *et al.*, *Immunol. Rev.*, 2011). O CD137 desempenha um papel importante na regulação das respostas imunes e, portanto, é um alvo para a imunoterapia contra o câncer. O ligante de CD137 (CD137L) é o único ligante natural conhecido para o CD137 e é constitutivamente expresso em diversos tipos de células apresentadoras de antígeno, tais como células B ativadas, monócitos e células dendríticas esplênicas, e pode ser induzido em linfócitos T.

[004] O CD137L é uma proteína trimérica que existe como uma forma ligada à membrana e como uma variante solúvel. Entretanto, a capacidade do CD137L solúvel de ativar CD137, por exemplo, em linfócitos que expressam CD137 é limitada, e grandes concentrações são necessárias para provocar um efeito (Wyzgol *et al.*, *J Immunol*, 2009). O modo natural de ativação do CD137 é através do engajamento de uma célula CD137-positiva com uma célula CD137L-positiva. A ativação de CD137 é então considerada induzida por agrupamento através de CD137L na célula oposta, levando à sinalização da via TRAF1, 2 e 3 (Yao *et al.*, *Nat Rev Drug Discov.*, 2013, Snell *et al.*, *Immunol Rev*, 2011) e outros efeitos concomitantes a jusante na célula T CD137-positiva. No caso de células T ativadas pelo reconhecimento de seus respectivos alvos cognatos, os efeitos provocados pela coestimulação do CD137 são uma ativação, maior sobrevivência e proliferação aprimorada, produção de citocinas pró-inflamatórias e capacidade melhorada para matar.

[005] O benefício da coestimulação de CD137 para a eliminação

de células cancerosas foi demonstrado em diversos modelos *in vivo*. A expressão forçada de CD137L em um tumor, por exemplo, leva à rejeição do tumor (Melero *et al.*, *Eur J Immunol*, 1998). Da mesma forma, a expressão forçada de um scFv anti-CD137 em um tumor leva a eliminação do tumor dependente de célula T CD4⁺ e células NK (Yang *et al.*, *Cancer Res*, 2007, Zhang *et al.*, *Mol Cancer Ther*, 2006, Ye *et al.*, *Nat Med*, 2002). Um anticorpo anti-CD137 administrado sistemicamente também demonstrou levar ao retardamento do crescimento tumoral (Martinet *et al.*, *Gene Ther*, 2002).

[006] Foi demonstrado que o CD137 é um excelente marcador para células T reativas ao tumor de ocorrência natural em tumores humanos (Ye *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2014), e que os anticorpos anti-CD137 podem ser utilizados para melhorar a expansão e a atividade de Linfócitos infiltrantes de tumor melanoma CD8⁺ para aplicação na terapia de células T adotivas (Chacon *et al.*, *PLoS One*, 2013).

[007] A demonstração pré-clínica do benefício terapêutico potencial da coestimulação de CD137 tem estimulado o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos que visam CD137, incluindo BMS-663513 (descrito na Patente US 7.288.638) e PF-05082566 (Fisher *et al.*, *Cancer Immunol Immunother*, 2012).

[008] A presente divulgação fornece, entre outras coisas, novas abordagens para envolver simultaneamente CD137 e GPC3 por meio de uma ou mais proteínas de fusão com propriedades de ligação especificidade para CD137 e especificidade de ligação para GPC3.

II. DEFINIÇÕES

[009] A lista a seguir define termos, frases e abreviaturas usados ao longo do presente relatório descritivo. Todos os termos listados e definidos no presente destinam-se a abranger todas as formas gramaticais.

[010] Tal como utilizado na presente invenção, a menos que especificado de outra forma, “CD137” significa CD137 humano (huCD137). O CD137 humano designa uma proteína de comprimento total definida pelo UniProt Q07011, um fragmento, ou variante da mesma. O CD137 também é conhecido como 4-1BB, membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral 9 (TNFRSF9) ou induzido pela ativação de linfócitos (ILA). Em exemplos de realização específicos, é usado um CD137 de espécie não humana, por exemplo, CD137 de macacos cinomolgos e CD137 de camundongo.

[011] Conforme utilizado na presente invenção, “Glipicana-3” ou “GPC3” significa GPC3 humana (huGPC3). A GPC3 humana designa uma proteína de comprimento total definida pelo UniProt P51654, um fragmento, ou variante da mesma. A GPC3 humana é codificada pelo gene *GPC3*. A GPC3 também é conhecida como DGSX, GTR2-2, MXR7, OCI-5, SDYS, SGB, SGBS ou SGBS1. Em exemplos de realização específicos, é utilizada uma GPC3 de espécie não humana, por exemplo, GPC3 de macacos cinomolgos e GPC3 de camundongo.

[012] Conforme usado no presente documento, “afinidade de ligação” descreve a capacidade de uma biomolécula (por exemplo, um peptídeo a proteína) da presente divulgação (por exemplo, uma muteína de lipocalina, anticorpo, proteína de fusão o outro peptídeo ou proteína) se ligar a um alvo selecionado e formar um complexo. A afinidade de ligação é medida por uma série de métodos conhecidos pelos versados na técnica incluindo, mas não se limitando a, titulação de fluorescência, ensaios baseados em ensaio imunoenzimático (ELISA), incluindo ensaio ELISA direto e competitivo, métodos calorimétricos, tais como calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e ressonância plasmônica de superfície (SPR). Esses métodos estão bem

estabelecidos no estado da técnica e alguns exemplos de tais métodos estão descritos no presente pedido. Assim, a afinidade de ligação é relatada como um valor de constante de dissociação (K_D), concentração que induz metade do efeito máximo (EC_{50}), ou concentração que inibe metade do efeito máximo (IC_{50}) medidos utilizando tais métodos. Um valor K_D , EC_{50} ou IC_{50} mais baixo reflete melhor (mais alta) capacidade de ligação (afinidade). Consequentemente, as afinidades de ligação de duas biomoléculas em relação a um alvo selecionado podem ser medidas e comparadas. Ao comparar as afinidades de ligação de duas biomoléculas em relação ao alvo selecionado, o termo “quase o mesmo”, “substancialmente o mesmo” ou “substancialmente semelhante” significa que uma biomolécula tem uma afinidade de ligação relatada como um valor K_D , EC_{50} ou IC_{50} que é idêntico ou semelhante a outra molécula dentro da variabilidade experimental da medição da afinidade de ligação. A variabilidade experimental de medição da afinidade de ligação é dependente do método específico usado e é conhecida pelos profissionais versados na técnica.

[013] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “substancialmente” pode referir-se à condição qualitativa exibindo extensão ou grau total ou quase total de uma característica ou propriedade de interesse. Um profissional hábil nas técnicas biológicas compreenderá que os fenômenos biológicos e químicos raramente, se alguma vez, cumpram e/ou procedam à integralidade ou atinjam ou evitem um resultado absoluto. O termo “substancialmente” é, portanto, usado na presente invenção para capturar a potencial falta de completude inerente em muitos fenômenos biológicos e químicos.

[014] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “detectar”, “detecção”, “detectável” ou “detectando”, tal como utilizado na

presente invenção, é entendido tanto em um nível quantitativo como qualitativo, bem como uma combinação destes. Isso inclui medidas quantitativas, semiquantitativas e qualitativas realizadas em uma biomolécula da divulgação.

[015] Conforme utilizado no presente documento, “afinidade detectável” significa a capacidade de ligação entre uma biomolécula e seu alvo divulgada como valor K_D , EC_{50} ou IC_{50} , e é de aproximadamente 10^{-5} M ou menos. Uma afinidade de ligação, relatada por um valor K_D , EC_{50} ou IC_{50} , superior a 10^{-5} M geralmente não é mais mensurável por métodos comuns como ELISA e SPR e é, portanto, de importância secundária.

[016] Deve-se observar que a formação do complexo entre a biomolécula da divulgação e seu alvo é influenciada por muitos fatores diferentes, como as concentrações do respectivo alvo, a presença de competidores, pH e força iônica do sistema tampão usado, o método experimental usado para determinação da afinidade de ligação (por exemplo, titulação de fluorescência, ELISA competitivo (também chamado de ELISA de competição) e ressonância plasmônica de superfície) e até mesmo o algoritmo matemático usado para avaliação dos dados experimentais. Portanto, está claro para o especialista no assunto que a afinidade de ligação divulgada por um valor K_D , EC_{50} ou IC_{50} pode variar dentro de certo intervalo experimental, dependendo do método e configuração experimental. Isso significa que pode haver um ligeiro desvio nos valores medidos de K_D , EC_{50} ou IC_{50} ou uma faixa de tolerância dependendo, por exemplo, se tais valores foram determinados por ELISA (incluindo ELISA direto ou competitivo), por SPR, ou por outro método.

[017] Conforme utilizado na presente invenção, “específico para”, “ligação específica”, “se liga especificamente” ou “especificidade de ligação” refere-se à capacidade de uma biomolécula de discriminar entre o alvo

desejado (por exemplo, CD137 e GPC3) e um ou mais alvos de referência (por exemplo, receptor celular para lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos). Entende-se que tal especificidade não é uma propriedade absoluta, mas relativa e pode ser determinada, por exemplo, por SPR, *Western blots*, ELISA, separação de células ativadas por fluorescência (FACS), radioimunoensaio (RIA), eletroquimioluminescência (ECL), ensaio imunorradiométrico (IRMA), Imuno-Histoquímica (IHQ) e varreduras de peptídeos.

[018] Quando usado neste documento no contexto da proteína de fusão da presente divulgação que se liga ao CD137 e GPC3, o termo “específico para”, “ligação específica”, “liga-se especificamente” ou “especificidade de ligação” significa que a proteína de fusão liga-se, reage com ou é direcionada contra CD137 e GPC3, conforme descrito na presente invenção, mas não se liga essencialmente a outra proteína. O termo “outra proteína” inclui quaisquer proteínas que não sejam CD137 ou GPC3 ou proteínas intimamente relacionadas ou homólogas ao CD137 ou GPC3. Entretanto, CD137 ou GPC3 de outras espécies que não humana e fragmentos e/ou variantes de CD137 ou GPC3 não são excluídos pelo termo “outra proteína”. O termo “não se liga essencialmente” significa que as proteínas de fusão da presente divulgação não se ligam a outra proteína com afinidade de ligação menor do que a ligação ao CD137 e/ou GPC3, ou seja, mostram uma reatividade cruzada de menos de 30%, de preferência 20%, mais preferencialmente 10%, particularmente preferencialmente menos de 9, 8, 7, 6 ou 5%. Se a proteína de fusão reage especificamente conforme definido acima, isso pode ser facilmente testado, *inter alia*, pela comparação da reação de uma proteína de fusão da presente divulgação com CD137 e/ou GPC3 e a reação da referida proteína de fusão com outra(s) proteína(s).

[019] Tal como utilizado na presente invenção, o termo

“lipocalina” refere-se a uma proteína monomérica de aproximadamente 18-20 kDA em peso, possuindo uma região estrutural supersecundária em folha β pregueada cilíndrica compreendendo uma pluralidade de fitas β (preferencialmente oito fitas β designadas de A até H) conectadas em pares por um pluralidade (preferencialmente quatro) de alças (*loops*) em uma extremidade para compreender assim um bolso de ligação (*binding pocket*) e definir a entrada para o bolso de ligação ao ligante. De um modo preferido, as alças que compreendem o bolso de ligação ao ligante utilizadas na presente invenção são alças que conectam as extremidades abertas das fitas β ; A e B, C e D, E e F, e G e H, e são alças designadas AB, CD, EF e GH. É bem estabelecido que essa diversidade das referidas alças no *scaffold* de lipocalina que de outra forma seria rígida, dá lugar a uma variedade de diferentes modos de ligação capazes de acomodar alvos de diferentes tamanhos, forma e caráter químico (revisto, por exemplo, em Skerra, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996). Entende-se que a família de proteínas lipocalinas evoluiu naturalmente para ligar a um amplo espectro de ligantes, compartilhando níveis não usualmente baixos de conservação geral na sequência (muitas vezes com identidades de sequência inferiores a 20%), mantendo um padrão de enovelamento geral altamente conservado. A correspondência entre posições em diversas lipocalinas é bem conhecida pelo técnico hábil no assunto (consulte, por exemplo, a Patente US 7.250.297). Proteínas que caem na definição de “lipocalina”, tal como utilizado na presente invenção, incluem, mas não se limitam a, lipocalinas humanas incluindo lipocalina de lágrima (CCF, Lcn1), Lipocalina-2 (Lcn2) ou lipocalina de neutrófilos associada à gelatinase (NGAL), apolipoproteína D (ApoD), apolipoproteína M, α 1-glicoproteína ácida 1, α 1- glicoproteína ácida 2, α 1-microglobulina, componente do complemento $\delta\gamma$, proteína de ligação ao retinol

(RBP), proteína de ligação ao ácido retinoico epididimal, glicodelina, proteína de ligação ao odorante IIa, proteína de ligação ao odorante IIb, lipocalina-15 (Lcn15) e prostaglandina D sintase.

[020] Tal como utilizado na presente invenção, a menos que especificado de outra forma, “lipocalina lacrimal” refere-se à lipocalina lacrimal humana (hTlc) e ainda refere-se à lipocalina lacrimal humana madura. O termo “maduro”, quando usado para caracterizar uma proteína, significa uma proteína essencialmente livre do peptídeo sinal. “hTlc madura” da presente divulgação refere-se à forma madura da lipocalina lacrimal humana, que está livre do peptídeo sinal. A hTlc madura é descrito pelos resíduos 19-176 da sequência depositada no banco *SWISS-PROT Data Bank* sob o Número de Acesso P31025, e o aminoácido que está indicado na SEQ ID NO: 1.

[021] Conforme utilizado na presente invenção, “Lipocalina-2” ou “lipocalina associada à gelatinase neutrofílica” refere-se à Lipocalina-2 humana (hLcn2) ou lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos humana (hNGAL) e refere-se ainda à Lipocalina-2 humana madura ou lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana madura. O termo “maduro”, quando usado para caracterizar uma proteína, significa uma proteína essencialmente livre do peptídeo sinal. Uma “hNGAL madura” da presente divulgação refere-se à forma madura da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana, que está livre do peptídeo sinal. A hNGAL madura é descrito pelos resíduos 21-198 da sequência depositada no banco *SWISS-PROT Data Bank* sob o Número de Acesso P80188, e o aminoácido que está indicado na SEQ ID NO: 2.

[022] Tal como utilizado na presente invenção, uma “sequência nativa” refere-se a uma proteína ou um polipeptídeo com uma sequência que ocorre na natureza ou com uma sequência tipo selvagem, independentemente do seu modo de preparação. Tal proteína ou polipeptídeo de sequência nativa

pode ser isolado a partir da natureza ou pode ser produzido por outros meios, como por métodos recombinantes ou sintéticos.

[023] Uma “lipocalina de sequência nativa” significa uma lipocalina que tem a mesma sequência de aminoácidos que o polipeptídeo correspondente derivado da natureza. Assim, uma lipocalina de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácidos da respectiva lipocalina de ocorrência natural (tipo selvagem) de qualquer organismo, em particular um mamífero. A expressão “sequência nativa”, quando utilizada no contexto de uma lipocalina, abrange especificamente aquelas formas truncadas de ocorrência natural ou secretadas de lipocalina, formas variantes que ocorrem naturalmente como formas derivadas do *splicing* alternativo e variantes alélicas de ocorrência natural da lipocalina. Os termos “lipocalina de sequência nativa”, “lipocalina tipo selvagem” são usados de maneira alternada na presente invenção.

[024] Conforme utilizado na presente invenção, uma “muteína”, uma entidade “mutada” (seja proteína ou ácido nucleico) ou “mutante” refere-se à troca, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos ou nucleotídeos em comparação com a proteína ou ácido nucleico de ocorrência natural (tipo selvagem). O referido termo também inclui fragmentos de uma muteína, tal como descrito no presente. A presente divulgação engloba explicitamente muteínas de lipocalina, tal como descrito na presente invenção, que tem uma região estrutural supersecundária em folha β pregueada cilíndrica compreendendo oito fitas β ligadas aos pares por quatro alças em uma extremidade para, deste modo, compreendem um bolso de ligação ao ligante e definem a entrada do bolso de ligação ao ligante, em que pelo menos um aminoácido de cada uma de pelo menos três das referidas quatro alças foi mutado em comparação com a lipocalina de sequência nativa. As muteínas de

lipocalina da presente invenção têm preferencialmente a função de ligação ao CD137, tal como descrito na presente invenção.

[025] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “fragmento”, em conexão com as muteínas de lipocalina da divulgação, refere-se a proteínas ou polipeptídeos derivados de hTlc madura completa ou hNGAL ou muteínas de lipocalina que são truncadas na extremidade N-terminal e/ou C-terminal, isto é, sem pelo menos um dos aminoácidos N-terminal e/ou C-terminal. Tais fragmentos podem incluir pelo menos 10 ou mais, tais como 20 ou 30 ou mais aminoácidos consecutivos da sequência primária da hTlc ou hNGAL madura ou a muteína de lipocalina da qual é derivada e são geralmente detectáveis em um imunoensaio de hTlc ou hNGAL madura. Tal fragmento pode carecer de até 2, até 3, até 4, até 5, até 10, até 15, até 20, até 25 ou até 30 (incluindo todos os números intermediários) aminoácidos N-terminais e/ou C-terminais. Como exemplo ilustrativo, tal fragmento pode carecer de um, dois, três, ou quatro aminoácidos N-terminais (His-His-Leu-Leu) e/ou um ou dois aminoácidos C-terminais (Ser-Asp) da hTlc madura. Entende-se que o fragmento é preferencialmente um fragmento funcional da hTlc ou hNGAL madura ou muteína de lipocalina da qual é derivada, o que significa que preferencialmente retém a especificidade de ligação, de preferência para o CD137, da qual a hTlc/hNGAL madura ou muteína de lipocalina é derivada. Como exemplo ilustrativo, tal fragmento funcional pode compreender pelo menos os aminoácidos nas posições 5- 153, 5-150, 9-148, 12-140, 20-135, ou 26-133 correspondentes com a sequência polipeptídica linear da hTlc madura. Como outro exemplo ilustrativo, tal fragmento funcional pode compreender pelo menos os aminoácidos nas posições 13-157, 15-150, 18-141, 20-134, 25-134 ou 28-134 correspondendo à sequência polipeptídica linear da hNGAL madura.

[026] Um “fragmento” em relação ao alvo correspondente CD137

ou GPC3 de uma proteína de fusão da presente divulgação, refere-se a CD137 ou GPC3 truncado na porção N-terminal e/ou C-terminal ou nos domínios de proteína de CD137 ou GPC3. Os fragmentos de CD137 ou fragmentos de GPC3, conforme descrito no presente documento, retêm a capacidade do CD137 ou GPC3 de comprimento total de ser reconhecido e/ou ligado por uma proteína de fusão da divulgação. Como um exemplo ilustrativo, o fragmento pode ser um domínio extracelular de CD137 ou GPC3. Como um exemplo ilustrativo, tais domínios extracelulares podem compreender aminoácidos dos subdomínios extracelulares de CD137, tal como as sequências de aminoácidos individuais ou combinadas do domínio 1 (resíduos 24-45 da UniProt Q07011), domínio 2 (resíduos 46- 86), domínio 3 (87-118) e domínio 4 (resíduos 119-159).

[027] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “variante” refere-se aos derivados de proteína ou peptídeo que incluem modificações na sequência de aminoácidos, por exemplo, por meio de substituição, deleção, inserção ou modificações químicas. Tais modificações e/ou modificações químicas, em alguns exemplos de realização, não reduzem a funcionalidade da proteína ou peptídeo. Tais substituições também podem ser conservadoras, ou seja, um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido quimicamente semelhante. Exemplos de substituições conservadoras são as substituições entre os membros dos seguintes grupos: 1) alanina, serina, treonina e valina; 2) ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina e asparagina e histidina; 3) arginina, lisina, glutamina, asparagina e histidina; 4) isoleucina, leucina, metionina, valina, alanina, fenilalanina, treonina e prolina; e 5) isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano. Tais variantes incluem proteínas ou polipeptídeos, em que um ou mais aminoácidos foram substituídos pelos seus respectivos estereoisômeros D ou por

aminoácidos diferentes dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente, tais como, por exemplo, ornitina, hidroxiprolina, citrulina, homoserina, hidroxilisina, norvalina. Tal variante também inclui, por exemplo, proteínas ou polipeptídeos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados ou deletados, na extremidade N- e/ou C-terminal do polipeptídeo. Em geral, uma variante tem pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% ou pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de aminoácidos com a proteína de sequência nativa ou polipeptídeo. Uma forma variante preferencialmente retém a atividade biológica, por exemplo, ligação ao mesmo ao alvo, da proteína ou polipeptídeo da qual ela deriva.

[028] O termo “variante”, tal como utilizado na presente invenção no que diz respeito ao ligante de proteína correspondente CD137 ou GPC3 de uma proteína de fusão da presente divulgação, refere-se ao CD137 ou GPC3 ou um fragmento dos mesmos, respectivamente, que tem uma ou mais, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou mais, substituições, deleções e/ou inserções de aminoácidos em comparação com a sequência nativa de CD137 ou GPC3 (CD137 ou GPC3 tipo selvagem), tal como a proteína CD137 depositada com a referência *UniProt* Q07011 ou GPC3 depositada com a referência *UniProt* P51654, conforme descrito na presente invenção. Uma variante de CD137 ou uma variante de GPC3, respectivamente, tem uma identidade de aminoácidos de pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95% com CD137 ou GPC3 tipo selvagem. Uma variante de CD137 ou um variante de GPC3, conforme descrito no presente documento, retém a capacidade de se ligar às proteínas de fusão específicas para CD137 e GPC3 divulgadas na presente invenção.

[029] O termo “variante”, conforme utilizado na presente invenção com relação a uma muteína de lipocalina, refere-se a uma muteína de

lipocalina ou fragmento da mesma de acordo com a presente divulgação, em que a sequência tem mutações, incluindo substituições, deleções e inserções e/ou modificações químicas. Uma muteína de lipocalina variante descrita na presente invenção retém a atividade biológica, por exemplo, a ligação ao CD137, da muteína de lipocalina da qual ela é derivada. Em geral, uma muteína de lipocalina variante tem pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92 %, 95%, 98% de identidade de sequência de aminoácidos com a muteína de lipocalina a partir da qual ela é derivada.

[030] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “mutagênese” refere-se à introdução de mutações em um polinucleotídeo ou sequência de aminoácidos. As mutações são preferencialmente introduzidas em condições experimentais de modo que o aminoácido que ocorre naturalmente em uma determinada posição da proteína ou sequência polipeptídica pode ser alterado, por exemplo, substituído por pelo menos um aminoácido. O termo “mutagênese” também inclui a modificação (adicional) do comprimento dos segmentos de sequência por deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos. Assim, está dentro do escopo da divulgação que, por exemplo, um aminoácido em uma posição de sequência escolhida é substituído por um trecho de três aminoácidos, levando a adição de dois resíduos de aminoácidos em comparação com o comprimento do respectivo segmento da proteína nativa ou sequência de aminoácidos do polipeptídeo. Tal inserção ou deleção pode ser introduzida de forma independente entre si, em qualquer um dos segmentos da sequência que podem ser submetidos à mutagênese na presente divulgação. Em um exemplo de realização da presente divulgação, uma inserção pode ser introduzida no segmento de sequência de aminoácidos correspondente à alça (*loop*) AB da sequência nativa da lipocalina (*cf.* Publicação Internacional WO 2005/019256, que é integralmente incorporada ao

presente por referência).

[031] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “mutagênese aleatória” significa que nenhuma mutação predeterminada (alteração de aminoácido) está presente em uma determinada posição da sequência, mas que pelo menos dois aminoácidos podem ser incorporados com certa probabilidade em uma posição da sequência predefinida durante a mutagênese.

[032] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “identidade de sequência” ou “identidade” denota uma propriedade de sequências que mede sua similaridade ou relação. O termo “identidade de sequência” ou “identidade” conforme utilizado na presente divulgação significa a percentagem de resíduos idênticos em pares - seguindo o alinhamento (homólogo) de uma sequência de proteína ou polipeptídeo da divulgação com uma sequência em questão - em relação ao número de resíduos na mais longa dessas duas sequências. A identidade de sequência é medida dividindo o número de resíduos de aminoácidos idênticos pelo número total de resíduos e multiplicando o produto por 100.

[033] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “homologia de sequência” ou “homologia” tem seu significado usual e aminoácidos homólogos incluem aminoácidos idênticos, bem como aminoácidos que são considerados substituições conservadoras em posições equivalentes na sequência de aminoácidos linear de uma proteína ou polipeptídeo da presente divulgação (por exemplo, quaisquer proteínas de fusão ou muteínas de lipocalina da presente divulgação).

[034] Um perito no assunto reconhecerá programas de computador disponíveis, por exemplo, BLAST (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 1997), BLAST2 (Altschul *et al.*, *J Mol Biol*, 1990), e Smith-Waterman

(Smith e Waterman, *J. Mol Biol*, 1981), para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência usando parâmetros padrão. A percentagem de homologia de sequência ou identidade de sequência pode, por exemplo, ser determinada utilizando o programa BLASTP, versão 2.2.5 (16 de novembro de 2002) (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 1997). Neste exemplo de realização, a percentagem de homologia baseia-se no alinhamento de toda a sequência da proteína ou polipeptídeo (matriz: *BLOSUM 62*; custos de lacunas (*gap costs*): 11,1; valor de corte (*cutoff*) ajustado para 10^{-3}) incluindo as sequências de pró-peptídeo, de preferência utilizando a proteína *scaffold* tipo selvagem como referência em uma comparação aos pares. Ela é calculada como a porcentagem de números “positivos” (aminoácidos homólogos) indicados como resultado na saída do programa BLASTP dividido pelo número total de aminoácidos selecionados pelo programa para o alinhamento.

[035] Especificamente, para determinar se um resíduo de aminoácido da sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina diferente de uma lipocalina tipo selvagem correspondendo a uma determinada posição na sequência de aminoácidos de uma lipocalina tipo selvagem, um especialista na técnica pode utilizar meios e métodos bem conhecidos no estado da técnica, por exemplo, alinhamentos, seja manualmente ou utilizando programas de computador como BLAST 2.0, acrônimo do inglês *Basic Local Alignment Search Tool* ou ClustalW ou qualquer outro programa adequado que seja adequado para gerar alinhamentos de sequência. Conseqüentemente, uma sequência da lipocalina tipo selvagem pode servir como “sequência-sujeito” ou “sequência de referência”, enquanto a sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina diferente da lipocalina tipo selvagem descrita na presente invenção serve como “sequência de consulta” (*query*). Os termos “sequência tipo selvagem”, “sequência de referência” e “sequência sujeito” são

usados de maneira alternada na presente invenção. Uma sequência de lipocalina tipo selvagem preferida é a sequência da hTLc como mostrada na SEQ ID NO: 1 ou hNGAL como mostrada na SEQ ID NO: 2.

[036] As “lacunas” ou “*gaps*” são espaços em um alinhamento que são resultado de adições ou deleções de aminoácidos. Assim, duas cópias com exatamente a mesma sequência possuem 100% de identidade, mas as sequências que são menos conservadas e que possuem deleções, adições ou substituições podem ter um menor grau de identidade de sequência.

[037] Tal como utilizado na presente invenção, o termo “posição” significa a posição de um aminoácido dentro de uma sequência de aminoácidos aqui representada ou a posição de um nucleotídeo dentro de uma sequência de ácido nucleico aqui representada. Deve ser entendido que quando o termo “corresponde” ou “correspondente”, tal como utilizado na presente invenção no contexto das posições da sequência de aminoácidos de uma ou mais muteínas de lipocalina, uma posição correspondente não é apenas determinada pelo número dos nucleotídeos ou aminoácidos anteriores. Consequentemente, a posição absoluta de um determinado aminoácido, de acordo com a divulgação pode variar a partir da posição correspondente devido à deleção ou adição de aminoácidos em outras posições em uma lipocalina (tipo selvagem ou mutante). De modo semelhante, a posição absoluta de um dado nucleotídeo de acordo com a presente divulgação pode variar da posição correspondente devido a deleções ou nucleotídeos adicionais em outro lugar em uma região 5'-não traduzida (UTR) de muteína ou lipocalina tipo selvagem incluindo o promotor e/ou quaisquer outras sequências ou genes reguladores (incluindo éxons e íntrons).

[038] Uma “posição correspondente” de acordo com a divulgação pode ser a posição de sequência que se alinha à posição de sequência à qual

corresponde em um alinhamento de sequências aos pares ou múltiplas de acordo com a presente divulgação. Deve ser entendido que para uma “posição correspondente” de acordo com a divulgação, as posições absolutas de nucleotídeos ou aminoácidos podem diferir dos nucleotídeos ou aminoácidos adjacentes, mas os referidos nucleotídeos ou aminoácidos adjacentes que podem ter sido trocados, deletados, ou adicionados podem ser compreendidos pelas mesmas “posições correspondentes”.

[039] Além disso, para uma posição correspondente em uma muteína de lipocalina com base em uma sequência de referência de acordo com a divulgação, deve ser entendido de preferência que as posições de nucleotídeos ou aminoácidos de uma muteína de lipocalina podem corresponder estruturalmente às posições em outros lugares em uma lipocalina de referência (lipocalina de tipo selvagem) ou outra muteína de lipocalina, mesmo que possam diferir nos números de posições absolutas, tal como reconhecido pelo especialista diante do padrão de enovelamento geral altamente conservado entre as lipocalinas.

[040] Conforme utilizado na presente invenção de maneira alternada, os termos “conjugado”, “conjugação”, “fundir”, “fusão” ou “ligado” referem-se à união de duas ou mais subunidades, por meio de todas as formas de ligação covalente ou não covalente, por meios incluindo, mas não se limitando a, fusão genética, conjugação química, acoplamento através de um ligante ou um agente de reticulação e associação não covalente.

[041] O termo “polipeptídeo de fusão” ou “proteína de fusão”, tal como utilizado na presente invenção, refere-se a um polipeptídeo ou proteína compreendendo duas ou mais subunidades. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão, conforme descrito neste documento, compreende duas ou mais subunidades, pelo menos uma dessas subunidades

sendo capaz de se ligar especificamente ao CD137 e outra subunidade capaz de se ligar especificamente à GPC3. Dentro da proteína de fusão, essas subunidades podem ser ligadas por ligação covalente ou não covalente. Preferencialmente, o polipeptídeo de fusão é uma fusão de tradução entre as duas ou mais subunidades. A fusão de tradução pode ser gerada por engenharia genética da sequência codificante de uma subunidade nas posições de leitura (*in frame*) com a sequência codificante de uma subunidade adicional. Ambas as subunidades podem ser intercaladas por uma sequência de nucleotídeos que codifica um ligante. Entretanto, as subunidades de um polipeptídeo de fusão da presente descrição também podem ser ligadas por uma conjugação química. As subunidades que formam a proteína de fusão são tipicamente ligadas umas às outras pelo C-terminal de uma subunidade ao N-terminal da outra subunidade, ou pelo C-terminal de uma subunidade ao C-terminal de outra subunidade, ou pelo N-terminal de uma subunidade ao N-terminal da outra subunidade, ou pelo N-terminal de uma subunidade ao C-terminal da outra subunidade. As subunidades das proteínas de fusão podem ser ligadas em qualquer ordem e podem incluir mais do que qualquer uma das subunidades constituintes. Se uma ou mais das subunidades fizerem parte de uma proteína (complexo) que consiste em mais de uma cadeia polipeptídica, o termo “proteína de fusão” também pode se referir à proteína que compreende as sequências fundidas e todas as outras cadeias polipeptídicas da proteína (complexo). Como exemplo ilustrativo, onde uma imunoglobulina de comprimento total é fundida a uma muteína de lipocalina por meio de uma cadeia pesada ou leve de imunoglobulina, o termo “proteína de fusão” pode se referir à única cadeia polipeptídica compreendendo a muteína de lipocalina e a cadeia pesada ou leve da imunoglobulina. O termo “proteína de fusão” também pode se referir a qualquer imunoglobulina (ambas as cadeias, leve e pesada) e

à muteína de lipocalina, fundida a uma ou ambas as cadeias, pesada e/ou leve.

[042] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “subunidade” de uma proteína de fusão divulgada na presente invenção refere-se a uma única proteína ou uma cadeia polipeptídica separada, que pode formar uma estrutura enovelada estável por si só e definir uma função única de fornecimento do motivo de ligação para um alvo. Em alguns exemplos de realização, uma subunidade preferida da divulgação é uma muteína de lipocalina. Em alguns exemplos de realização, uma subunidade preferida da divulgação é uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma.

[043] Um “ligante” que pode ser compreendido por uma proteína de fusão da presente divulgação une duas ou mais subunidades de proteína de fusão conforme descrito na presente invenção. A ligação pode ser covalente ou não covalente. Uma ligação covalente preferida é através de uma ligação peptídica, tal como uma ligação peptídica entre aminoácidos. Um ligante preferido é um ligante peptídico. Por conseguinte, em um exemplo de realização preferido, o referido ligante compreende um ou mais aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais aminoácidos. Ligantes peptídicos preferidos são descritos na presente invenção, incluindo ligantes glicina-serina (GS), ligantes GS glicosiladas, ligantes de polímero prolina-alanina-serina (PAS). Em alguns exemplos de realização preferidos, um ligante GS é um $(G_4S)_3$, conforme descrito na SEQ ID NO: 13, é usado para unir as subunidades de uma proteína de fusão. Outros ligantes preferidos incluem ligantes químicos.

[044] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “albumina” inclui todas as albuminas, tal como albumina de soro humano ou albumina de soro bovino ou albumina de soro de rato.

[045] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “molécula orgânica” ou “molécula orgânica pequena” indica uma molécula orgânica compreendendo pelo menos dois átomos de carbono, mas de preferência não mais do que 7 ou 12 ligações rotativas de carbono, possuindo um peso molecular variando entre 100 e 2.000 Dalton, de preferência entre 100 e 1.000 Dalton, incluindo opcionalmente um ou dois átomos de metal.

[046] Uma “amostra” é definida como uma amostra biológica retirada de qualquer sujeito. As amostras biológicas incluem, mas não estão limitadas a, sangue, soro, urina, fezes, sêmen ou tecido, incluindo tecido tumoral.

[047] Um “sujeito” é um vertebrado, de preferência um mamífero, mais preferencialmente um ser humano. O termo “mamífero” é utilizado na presente invenção para se referir a qualquer animal classificado como mamífero, incluindo, sem limitação, humanos, animais domésticos e de fazenda, animais de zoológicos, de esportes ou de estimação, como ovelhas, cães, cavalos, gatos, vacas, ratos, porcos, macacos como macacos cinomolgos e etc., para citar apenas alguns exemplos ilustrativos. Preferencialmente, o “mamífero” usado na presente invenção é humano.

[048] Uma “quantidade eficaz” é uma quantidade suficiente para render resultados benéficos ou desejados. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações ou doses individuais.

[049] Tal como utilizado na presente invenção, “anticorpo” inclui anticorpos inteiros ou qualquer fragmento de ligação ao antígeno (ou seja, “porção de ligação ao antígeno”) ou uma cadeia única do mesmo. Um anticorpo completo refere-se a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (HCs) e duas cadeias leves (LCs) interligadas por ligações dissulfídicas. Cada cadeia pesada é composta por um domínio variável de

cadeia pesada (V_H ou HCVR) e uma região constante da cadeia pesada (C_H). A região constante da cadeia pesada é composta por três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve é composta por um domínio variável de cadeia leve (V_L ou LCVR) e uma região constante da cadeia leve (C_L). A região constante de cadeia leve é compreendida por um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR, do inglês *Framework Region*). Cada V_H e V_L são compostas por três CDRs e quatro FRs, arranjadas na seguinte ordem da posição amino-terminal para carboxi-terminal: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno (por exemplo, GPC3). As regiões constantes dos anticorpos podem, opcionalmente, mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico.

[050] Conforme usado no presente documento, “fragmento de ligação ao antígeno” de um anticorpo refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de ligar-se especificamente a um antígeno (por exemplo, GPC3). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo “fragmento de ligação ao antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab que consiste nos domínios V_H , V_L , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$ compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fab' que consiste nos domínios V_H , V_L ,

CL e CH1 e a região entre os domínios CH1 e CH2; (iv) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (v) um fragmento Fv de cadeia única consistindo nos domínios VH e VL de um único braço de um anticorpo, (vi) um fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature*, 1989) consistindo em um domínio VH; e (vii) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que podem ser opcionalmente unidas por um ligante sintético; (viii) um “*diabody*” (diacorpo) compreendendo o VH e VL conectado na mesma cadeia polipeptídica usando um ligante curto (consulte, por exemplo, os documentos EP 404,097; WO 93/11161; e Holliger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993); (ix) um “fragmento de anticorpo de domínio” contendo apenas o VH ou VL, onde em alguns casos duas ou mais regiões VH são unidas covalentemente.

[051] Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais; xenogênicos, alogênicos ou singênicos; ou suas formas modificadas (por exemplo, humanizados, quiméricos ou multiespecíficos). Os anticorpos também podem ser totalmente humanos.

[052] Conforme utilizado na presente invenção, “região estrutural”, “arcabouço” ou “FR” (do inglês *Framework Region*) referem-se aos resíduos do domínio variável que não são os resíduos da região hipervariável (CDR).

[053] “Região do fragmento cristalizável” ou “região Fc” refere-se à região C-terminal de uma cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc da cadeia pesada de imunoglobulina possam variar, a região Fc da cadeia pesada da IgG humana é normalmente definida como se estendendo a partir de um resíduo de aminoácidos na posição Cys226, ou a partir da Pro230, até a região carboxi-terminal desta, seguindo a numeração de acordo com Índice EU

de Kabat (Johnson e Wu, *Nucleic Acids Res*, 2000). A lisina C-terminal (resíduo 477 de acordo com sistema de numeração índice EU de Kabat) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a produção ou purificação do anticorpo, ou pela construção de um ácido nucleico recombinante que codifica uma cadeia pesada do anticorpo. Conseqüentemente, uma composição de anticorpos intactos podem incluir populações de anticorpos com todos resíduos K447 removidos, populações de anticorpos sem a remoção dos resíduos K447, e populações de anticorpos com uma mistura de anticorpos com e sem o resíduo K447. As regiões Fc de sequência nativa adequadas para uso nos anticorpos da invenção incluem IgG₁, IgG₂ (IgG_{2A}, IgG_{2B}), IgG₃ e IgG₄ humanas.

[054] Os termos “receptor de Fc” ou “FcR” descrevem um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo.

[055] Conforme utilizado na presente invenção, “anticorpo isolado” refere-se a um anticorpo que é substancialmente livre de seu ambiente natural. Por exemplo, um anticorpo isolado está substancialmente isento de material celular e outras proteínas da célula ou tecido fonte da qual é derivado. Um “anticorpo isolado” refere-se ainda a um anticorpo que está substancialmente livre de outros anticorpos com diferentes especificidades antigênicas. No presente caso, um anticorpo isolado que se liga especificamente à GPC3 está substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos além da GPC3. No entanto, um anticorpo isolado que se liga especificamente à GPC3 pode ter reatividade cruzada com outros antígenos, como moléculas GPC3 de outras espécies.

[056] Conforme utilizado na presente invenção, “anticorpo monoclonal” refere-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exhibe

uma única especificidade de ligação e afinidade para um epítopo particular.

[057] Conforme utilizado na presente invenção, “anticorpo humanizado” refere-se a um anticorpo que consiste nas CDRs de anticorpos derivados de mamíferos que não sejam humanos, e a região FR e a região constante são de um anticorpo humano ou derivado de um anticorpo humano. Em alguns exemplos de realização, um anticorpo humanizado compreende um domínio variável que tem uma sequência de aminoácidos da região variável que, analisada como um todo, está mais próxima da do ser humano do que de outras espécies, conforme avaliado usando a ferramenta *DomainGapAlign* do Sistema de Informação de Imunogenética (IMGT), conforme descrito por Ehrenmann *et al.* (2010). Em alguns exemplos de realização, um anticorpo humanizado pode ser útil como um componente eficaz em um agente terapêutico devido à antigenicidade reduzida. O termo “agente terapêutico” ou “agente terapeuticamente ativo”, tal como utilizado na presente invenção, refere-se a um agente que é terapeuticamente útil. Um agente terapêutico pode ser qualquer agente para a prevenção, melhora ou tratamento de uma doença, condição fisiológica, sintoma ou para a avaliação ou diagnóstico dos mesmos.

[058] Conforme utilizado na presente invenção, “anticorpo humano” inclui anticorpos com regiões variáveis em que tanto a região estrutural (framework) quanto a CDR são derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo “anticorpo humano”,

conforme utilizado na presente invenção, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero, tal como um camundongo, foram enxertadas em sequências estruturais humanas.

III. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[059] A Figura 1 fornece uma visão geral sobre o projeto das proteínas de fusão representativas descritas no presente pedido que são biespecíficas para os alvos CD137 e GPC3. As proteínas de fusão representativas foram feitas com base em um anticorpo específico para GPC3 (por exemplo, um anticorpo em que a cadeia pesada é fornecida pela SEQ ID NO: 81, ou compreende um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78, ou compreende as sequências CDR de GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73) e TRFYSTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74), e as cadeias leves são fornecidas pela SEQ ID NO: 82 ou compreendem um domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 79, ou compreendem as sequências CDR de QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2, SEQ ID NO: 76) e SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77) e um ou mais muteína de lipocalina específica para CD137 (por exemplo, a muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 40 ou a muteína de lipocalina que possui 97% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 49 e designada CD137Ac1). Uma ou mais muteínas de lipocalina foram geneticamente fundidas ao C- e/ou C-terminal da cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo específico para GPC3 conforme representado na Figura 1A-1I, resultando nas proteínas de fusão, por exemplo, de SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID NOs: 88 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 89, SEQ ID NOs: 81 e 90, e CD137Ac1-Fusão 1, CD137Ac1-Fusão 2, CD137Ac1-Fusão 3, CD137Ac1-Fusão 4, CD137Ac1-Fusão 5, CD137Ac1-Fusão 6, e CD137Ac1-Fusão 7 (proteínas de

fusão com 97% de identidade de sequência com as sequências de SEQ ID NOs: 91 e 82, SEQ ID NOs: 92 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 93, SEQ ID NOs: 81 e 94, SEQ ID NOs: 95 e 82, ou SEQ ID NOs: 96 e 82). Além disso, as proteínas de fusão geradas podem ser bivalentes para CD137 (por exemplo, como representado na Figura 1A-1D), ou tetravalente para CD137 (por exemplo, como representado na Figura 1E-1H), ou ter valência ainda maior para CD137 (por exemplo, como representado em Figura 1I). Proteínas de fusão monoespecíficas adicionais foram geradas pela fusão de uma ou mais muteínas de lipocalina específicas para GPC-3 ou muteínas de lipocalina específicas para CD137 com a extremidade C-terminal da região Fc de um anticorpo fornecido como descrito na presente divulgação através de um ligante peptídico (por exemplo, como representado na figura 1J-1K). As proteínas de fusão monoespecíficas resultantes são fornecidas, por exemplo, nas SEQ ID NO: 97 e SEQ ID NO: 98.

[060] A Figura 2 mostra os resultados dos experimentos de ELISA em que a ligação ao CPC3 humano (Figura 2A), GPC3 de macacos cinomolgos (Figura 2B) e CD137 humano (Figura 2C) de proteínas de fusão representativas foi determinada conforme descrito no Exemplo 3. GPC3 ou CD137 marcado com His no C-terminal foi revestido em uma placa de microtitulação e os agentes testados foram titulados começando com a concentração mais alta de 100 nM. Os agentes ligados em estudo foram detectados via anti-Fc de IgG humana – peroxidase de rábano (HRP) ou anti-NGAL–HRP, respectivamente. Os dados foram ajustados com um modelo de ligação de 1:1 com valor EC_{50} e sinal máximo como parâmetros livres e uma inclinação que foi fixada na unidade. Os valores de EC_{50} resultantes são fornecidos na Tabela 4.

[061] A Figura 3 ilustra os resultados de experimentos de ELISA

exemplares nos quais a capacidade das proteínas de fusão representativas se ligarem aos alvos GPC3 e CD137 de forma simultânea, foi determinada como descrito no Exemplo 4. A huGPC3 (Figura 3A) ou huCD137–His (Figura 3B) recombinante foi revestida em uma placa de microtitulação, seguido por uma titulação das proteínas de fusão. Subsequentemente, foi adicionada uma concentração constante de huCD137–His biotinilado (Figura 3A) ou huGPC3 biotinilado (Figura 3B), respectivamente, que foi detectada via *ExtrAvidin*-Peroxidase. Os dados foram ajustados com um modelo de ligação de 1:1 com valor de EC_{50} e sinal máximo como parâmetros livres e uma inclinação que foi fixada na unidade. Os valores de EC_{50} resultantes são fornecidos na Tabela 3.

[062] A Figura 4 mostra os resultados de uma avaliação da ligação ao alvo de proteínas de fusão por citometria de fluxo utilizando células CHO expressando CD137 humano (Figura 4A), bem como células SK-HEP1 expressando GPC3 humana (Figura 4B), tal como descrito no Exemplo 6. Não foi observada ligação quando se utiliza células controle falsamente transfectadas (*mock*). As médias geométricas da intensidade de fluorescência foram usadas para calcular os valores de EC_{50} , que são fornecidos na Tabela 6.

[063] A Figura 5 mostra a ligação de proteínas de fusão às células tumorais positivas para GPC3 avaliadas usando citometria de fluxo. As linhagens de células tumorais com diferentes níveis de expressão de GPC3 (expressão alta a moderada: HepG2 (Figura 5A) > Hep3B (Figura 5B) > MKN-45 (Figura 5C)) e a linhagem de células negativa para GPC3, NCI-N87 (Figura 5D), foram incubadas com diferentes proteínas de fusão ou controles conforme descrito no Exemplo 7 e as afinidades de ligação correspondentes (EC_{50}) estão resumidas na Tabela 7.

[064] A Figura 6 mostra o potencial das proteínas de fusão

representativas de coestimular a ativação de células T de uma maneira dependente do alvo GPC3, avaliada utilizando um bioensaio de CD137. Células Jurkat NFκB-Luc2/CD137 foram cocultivadas com a linhagem de células de tumor expressando GPC3 (expressão alta a moderada: HepG2 > Hep3B > MKN-45, e negativas para GPC3: NCI-N87, Figura 6A, 6B, 6C, e 6D, respectivamente) na presença de várias concentrações das proteínas de fusão ou controles. Após 4 horas, o reagente de ensaio de luciferase foi adicionado e os sinais luminescentes foram medidos. A análise da curva logística de quatro parâmetros foi realizada para calcular os valores de EC₅₀ (veja a Tabela 7). As proteínas de fusão apenas coestimulam a ativação de células T na abundância de GPC3 (Figura 6 A e 6B), mas não quando há GPC3 insuficiente ou nenhuma GPC3 (Figura 6C e 6 D). Em contraste, o mAb anti-CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) exibe ativação semelhante, independentemente do nível de expressão de GPC3, na ausência de células que expressam GPC3 e na ausência de quaisquer células tumorais.

[065] A Figura 7 demonstra a capacidade de uma proteína de fusão representativa de coestimular a ativação de células T na presença de GPC3. O anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82), uma muteína de lipocalina GPC3-específica (fusão Fc) (SEQ ID NO: 97), uma proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NO: 83), e um controle isotópico (SEQ ID NOs: 24 e 25) foram testados em paralelo. As células SK-Hep1 transfectadas com GPC3 humana (Figura 7 A) ou falsamente transfectadas (*mock*) (negativas para GPC3 humana, Figura 7B) ou GPC3 (Figura 7C) expressando a linhagem de células tumorais Hep-G2 foram semeadas em placas revestidas com anti-CD3 humano. Células Pan T, bem como várias concentrações de moléculas de teste, foram adicionadas e incubadas por três dias. Os níveis de IL-2 secretada no sobrenadante foram

determinados por um ensaio baseado em eletroquimioluminescência, conforme descrito no Exemplo 9. A proteína de fusão de SEQ ID NOs: 87 e 82 induz um forte aumento dependente da dose na secreção de IL-2 apenas na presença de GPC3, mais fortemente do que a proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida de SEQ ID NO: 83.

[066] A Figura 8 mostra a capacidade das proteínas de fusão representativas de coestimular a ativação de células T de uma maneira dependente do alvo GPC3. Várias linhagens de células tumorais que expressam diferentes níveis de GPC3 (expressão alta a moderada: HepG2 > Hep3B > MKN-45, Figura 8A, 8B e 8C, respectivamente; GPC3 negativo: NCI-N87, Figura 8D) foram semeadas em placas revestidas com anto-CD3 humano. Células Pan T e várias concentrações de proteínas de fusão e blocos de construção individuais foram adicionados e incubados por 3 dias. Os níveis de IL-2 secretada foram determinados por um ensaio baseado em eletroquimioluminescência, conforme descrito no Exemplo 10. A proteína de fusão é capaz de aumentar a secreção de IL-2 de uma maneira dependente de GPC3. Em contraste, a secreção de IL-2 induzida por um anticorpo CD137 de referência testado em paralelo (SEQ ID NOs: 26 e 27) não é dependente de GPC3.

[067] A Figura 9 mostra a capacidade de proteínas de fusão representativas em ativar a via de sinalização coestimuladora CD137 e induzir a citólise mediada por células T de células tumorais que expressam GPC3, demonstrada em um ensaio de morte celular com efectoras células T baseado em impedância. As células HepG2 expressando GPC3 ou células NCI-N87 negativas para GPC3 foram semeadas e aderiram a uma placa de microtitulação eletrônica, seguida pela adição de um anticorpo anti-CD3, a molécula de teste e células T CD8⁺ não aderentes. A impedância foi medida

como o parâmetro de “índice celular” (CI) sem unidade a cada 15 minutos por três dias, conforme descrito no Exemplo 11. A proteína de fusão de SEQ ID NOs: 87 e 82 é capaz de ativar a via CD137 de uma maneira dependente de GPC3 e induzir uma lise mediada por células T dependente da dose de células tumorais que expressam GPC3, em um nível mais alto do que o nível de lise conseguida com uma proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida de SEQ ID NO: 83.

[068] A Figura 10 mostra o volume tumoral ao longo do tempo após o tratamento com 0,5, 5 e 20 mg/kg de uma proteína de fusão exemplar, concentrações equimolares (0,39 e 3,9 mg/kg) do anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão, uma concentração equimolar (3,9 mg/kg) de um anticorpo CD137 de referência, ou veículo usado como controle (PBS) em um modelo de tumor em camundongo humanizado, conforme descrito no Exemplo 12. Camundongos NOG foram enxertados s.c. com tumores HepG2 que foram deixados crescer até um tamanho de 80-100 mm³. Os camundongos foram então randomizados em grupos de tratamento (ou controle) e receberam 5 × 10⁶ PBMCs humanas frescas por via intravenosa e injeções intraperitoneais das moléculas de teste nas doses indicadas no dia 1, dia 8 e dia 15. O crescimento tumoral foi registrado cada 3 a 4 dias. Os dados são apresentados como mediana com barras de erro do intervalo interquartil. As linhas tracejadas indicam número reduzido de animais por grupo em comparação com os dias anteriores. A proteína de fusão inibiu completamente o crescimento do tumor ao longo do estudo em níveis de dose mais elevados (5 e 20 mg/kg), tendo ao mesmo tempo um efeito dependente da dose, mas com um efeito menor sobre o crescimento tumoral nas concentrações mais baixas (0,5 ou 0,39 mg/kg, respectivamente).

[069] A Figura 11 fornece os resultados das análises de

farmacocinética em camundongos de uma proteína de fusão exemplar e o anticorpo de GPC3 como incluído na proteína de fusão, em comparação com duas proteínas de fusão biespecífica CD137/GPC3 anteriormente conhecidas (SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84), conforme descrito no Exemplo 13. Camundongos CD-1 (2 camundongos por ponto de tempo) receberam injeções por via intravenosa das proteínas de fusão em uma dose de 2 mg/kg ou 10 mg/kg. Os níveis de fármaco foram detectados utilizando um teste ELISA sanduíche a detecção da molécula completa através do alvo de GPC3 e anti-Fc humano ou anti-NGAL. A proteína de fusão da presente divulgação (SEQ ID NOs: 87 e 82) mostra um forte aumento do comportamento farmacocinético e meia-vida prolongada em comparação com as proteínas de fusão biespecíficas CD137/GPC3 anteriormente conhecidas (SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84).

IV. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[070] Conforme aqui descrito, a presente divulgação abrange o reconhecimento de que um ligante CD137 bivalente, tal como um anticorpo, pode não ser suficiente por si só para agrupar CD137 sobre células T ou células NK e levar a uma ativação eficiente. Além disso, um trabalho recente em torno dos membros da família TNFR ilustra os mecanismos dos anticorpos anti-TNFR pelos quais os anticorpos interagem por meio de suas regiões Fc com os receptores Fc-gama, envolvendo células imunes que expressam o receptor Fc-gama de ativação e facilitam a atividade antitumoral subsequente (Bulliard *et al.*, *Immunol Cell Biol*, 2014, Bulliard *et al.*, *J Exp Med.*, 2013). Isso, portanto, sugere que um anticorpo anti-CD137 pode desencadear o agrupamento de CD137 dependendo da abundância de células positivas para o receptor Fc-gama, que não estão seletivamente localizadas no tumor, mas distribuídas por todo o corpo. Consequentemente, a eficácia e a especificidade do alvo na monoterapia com anti-CD137 podem ser preocupantes. Na verdade,

alguns terapêuticos anti-CD137 em estudos clínicos, como urelumabe e utomilumabe, mostram resultados de eficácia decepcionantes com dose baixa e/ou revelam toxicidade em dose alta ou dose eficaz (Bulliard *et al.*, *Immunol Cell Biol*, 2014, Bulliard *et al.*, *J Exp Med*, 2013). Assim, há uma necessidade não atendida de terapêuticos direcionados ao CD137 que sejam eficazes e seguros. Um agente de direcionamento de CD137 ideal deve levar ao agrupamento de CD137, e fazê-lo de uma forma localizada no tumor em linfócitos infiltrantes de tumores. Conforme descrito no presente documento, para obter tal agente de direcionamento ao CD137, os agentes biespecíficos podem ser projetados para visar o CD137 em uma extremidade e visar um alvo tumoral diferencialmente expresso na outra extremidade.

[071] A presente divulgação abrange o reconhecimento de que um agente que visa GPC3 monoespecífico pode não ser potente o suficiente para o tratamento curativo de tumores, como o HCC, e que a atividade antitumoral de um agente anti-GPC3 que é capaz de recrutar células imunes para o local do tumor e/ou inibir diretamente a proliferação e/ou sobrevivência de células cancerosas pode ser relevante. Portanto, há a necessidade não atendida de terapêuticos direcionados a GPC3 com efeitos antitumorais aditivos e que tenham a capacidade de fornecer atividade antitumoral aumentada em comparação com um agente que visa GPC3 monoespecífico, sozinho.

[072] A presente divulgação fornece, entre outros, novas abordagens para envolver simultaneamente CD137 e GPC3 por meio de proteínas de fusão com especificidade de ligação para CD137 e especificidade de ligação para GPC3. Para envolver CD137 e GPC3, as proteínas de fusão de muteína de lipocalina específicas de anticorpo anti-GPC3 e anti-CD137 foram descritas, por exemplo, no documento WO2016/184882. No entanto, ainda é

desejável que as proteínas de fusão induzam a resposta imune / destruição de células por células T dependente de GPC3 para suprimir o crescimento do tumor que expressa GPC3 com alta eficiência e seletividade. Vários aspectos da presente divulgação proporcionam proteínas de fusão que promovem o agrupamento de CD137 pela ligação com células T CD137-positivas com GPC3 expressa no microambiente tumoral, de modo que ao combinar a ativação de células T induzida pelo CD137 e expansão com destruição de células tumorais por citotoxicidade mediada por anti-GPC3. A presente divulgação também fornece proteínas de fusão que também proporcionam potenciais terapias combinatórias em uma molécula e ao mesmo tempo permitem a indução localizada de células T antígeno-específicas no microambiente tumoral, reduzindo potencialmente a toxicidade periférica. A este respeito, as proteínas de fusão da divulgação podem fornecer produção aumentada de IL-2, respostas imunes, citólise mediada por células T e/ou efeitos antitumorais em comparação com a terapia monomérica de CD137 ou GPC3.

[073] Além disso, como os macacos cinomolgos têm sido amplamente utilizados em estudos farmacocinéticos ou de segurança de medicamentos no desenvolvimento de novas terapias, incluindo novos produtos biológicos, e tais estudos podem ser pré-requisitos necessários para a aprovação regulatória, é desejável ter proteínas de fusão com uma fração de ligação à GPC3 que apresenta reação cruzada com a GPC3 humana e de cinomolgo. Nenhuma dessas proteínas de fusão com a porção de ligação à GPC3 com essas características de reatividade cruzada foi descrita anteriormente.

[074] Além disso, como as moléculas biespecíficas ou multiespecíficas podem diferir de seus blocos de construção em certas

propriedades, incluindo afinidade e especificidade do alvo, estabilidades, farmacocinética no sangue e mecanismo de ação (Spiess *et al.*, *Mol Immunol*, 2015, Sedykh *et al.*, *Drug Des Develop Ther*, 2018), conforme fornecido neste documento, a seleção cuidadosa dos blocos de construção e a otimização da fabricação e outras práticas são, em alguns exemplos de realização, fornecidas para produzir candidatos clínicos de qualidade. Por exemplo, moléculas biespecíficas ou multiespecíficas podem perder, parcial ou completamente, as afinidades de ligação ao alvo e as especificidades dos blocos de construção, resultando em indesejada ligação fora do alvo. A ligação fora do alvo pode afetar ainda mais a farmacocinética, distribuição no tecido, eficácia, e toxicidade de tais moléculas biespecíficas ou multiespecíficas para fins terapêuticos. Particularmente, perfis farmacocinéticos fracos podem levar a dificuldades em alcançar o perfil de dose necessário para eficácia terapêutica e abandono do paciente (Alavijeh e Palmer, *IDrugs*, 2004), e a farmacocinética favorável permite que a dosagem seja reduzida, permitindo que formulações subcutâneas sejam desenvolvidas e COGs sejam reduzidos, prolongando o intervalo de dosagem para uma vez por semana, a cada 2 semanas, a cada 3 semanas ou a cada 4 semanas (Ryman e Meibohm, *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2017). As propriedades farmacocinéticas também são afetadas pelo ponto isoelétrico (pI). Um aumento no pI pode resultar em aumento da depuração sanguínea e aumento da retenção tecidual levando a uma meia-vida mais curta, enquanto que um pI mais baixo pode diminuir e absorção pelos tecidos e levar a uma meia-vida mais longa. Embora as observações possam ser conflitantes em relação à correlação entre a depuração de proteínas e o pI, os anticorpos terapêuticos geralmente têm valores de pI ligeiramente acima do pH fisiológico de 7,4, pois a maioria das superfícies das células têm carga negativa. A este respeito, vários aspectos da

presente divulgação fornecem proteínas de fusão que são biespecíficas para CD137 e GPC3 com alta afinidade e especificidade, estabilidade aprimorada, pl adequado e propriedades farmacocinéticas favoráveis.

[075] Nenhuma proteína de fusão com tais recursos que atenda aos usos fornecidos pela presente divulgação foi descrita anteriormente. Em contraste com as proteínas de fusão aqui fornecidas, as proteínas de fusão previamente conhecidas que visam tanto CD137 quanto GPC3 sofrem de um ou mais dentre PK fraca, grau inaceitável de ligação fora do alvo, grau inaceitável de ativação não específica (por exemplo, independente de GPC3), por exemplo, do sistema imunológico e/ou capacidade reduzida ou degradada de mediar a ativação, proliferação e/ou infiltração de células T.

A. PROTEÍNAS DE FUSÃO EXEMPLARES ESPECÍFICAS PARA CD137 E GPC3 DA PRESENTE DIVULGAÇÃO.

[076] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida contém pelo menos duas subunidades em qualquer ordem: (1) uma primeira subunidade que compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno específico para GPC3, e (2) uma segunda subunidade que compreende uma muteína de lipocalina específica para CD137.

[077] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada no N-terminal ao C-terminal de cada cadeia pesada (HC) da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[078] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada no C-terminal ao N-terminal de cada HC da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[079] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada no N-terminal ao C-terminal de cada cadeia leve (LC) da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[080] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada no C-terminal ao N-terminal de cada LC da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[081] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um

domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada no N-terminal ao C-terminal de cada região constante de cadeia pesada (CH) da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[082] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada no N-terminal ao C-terminal de cada região constante de cadeia leve (CL) da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[083] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida também pode conter pelo menos uma subunidade adicional, por exemplo, uma terceira subunidade. Por exemplo, a proteína de fusão pode conter uma subunidade específica para CD137. Em alguns exemplos de realização, a referida terceira subunidade pode ser ou compreender uma muteína de lipocalina específica para CD137. Por exemplo, duas muteínas de lipocalina podem ser fundidas a uma primeira subunidade de imunoglobulina, uma no C-terminal e uma no N-terminal da imunoglobulina. Em alguns exemplos de realização, as muteínas de lipocalina podem ser fundidas à cadeia pesada ou cadeia leve de uma imunoglobulina.

[084] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem compreender uma ou mais subunidades adicionais (por exemplo, uma quarta, quinta ou sexta subunidade).

[085] Em alguns exemplos de realização, pelo menos uma

subunidade pode ser fundida em sua extremidade N-terminal e/ou C-terminal a outra subunidade.

[086] Em alguns exemplos de realização, pelo menos uma subunidade pode ser ligada a outra subunidade por meio de um ligante. Em outros exemplos de realização, um ligante é um ligante peptídico, por exemplo, um ligante de glicina-serina (GS) não estruturado, um ligante de GS glicosilado ou um ligante polimérico de prolina-alanina-serina (PAS). Em alguns exemplos de realização, um ligante GS é um ligante $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ $((\text{G}_4\text{S})_3)$ como mostrado na SEQ ID NO: 13. Outros ligantes exemplares são mostrados nas SEQ ID NOs: 14-23. Em alguns exemplos de realização, um ligante peptídico pode ter de 1 a 50 aminoácidos, como 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 aminoácidos. Por exemplo, quando uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total, uma segunda subunidade pode ser ligada através de um ligante peptídico N-terminal da segunda subunidade e C-terminal de uma região constante de cadeia pesada (C_H) da referida imunoglobulina. Em outros exemplos de realização, uma terceira subunidade pode ser ligada por meio de um ligante peptídico entre o N-terminal da terceira subunidade e o C-terminal de uma região constante de cadeia leve (C_L) da referida imunoglobulina.

[087] Em alguns exemplos de realização, uma subunidade pode ser ligada a outra subunidade conforme descrito essencialmente na Figura 1. Em geral, uma subunidade pode ser fundida em sua extremidade N-terminal e/ou C-terminal com outra subunidade. Por exemplo, em alguns exemplos de realização, uma subunidade da muteína de lipocalina pode estar fundida em sua extremidade N-terminal e/ou C-terminal a uma subunidade de imunoglobulina, preferencialmente via um ligante peptídico. Para exemplos adicionais, uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser ligada em seu

N-terminal ao C-terminal do domínio de cadeia pesada (HC) de uma subunidade de imunoglobulina (Figura 1A), uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser ligada em sua extremidade C-terminal ao N-terminal da HC de uma subunidade de imunoglobulina (Figura 1C), uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser ligada em sua extremidade N-terminal ao C-terminal da cadeia leve (LC) de uma subunidade de imunoglobulina (Figura 1B) e/ou uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser ligada em sua extremidade C-terminal ao N-terminal da LC de uma subunidade de imunoglobulina (Figura 1D).

[088] Em alguns exemplos de realização, uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser fundida em sua extremidade N-terminal e/ou C-terminal a um fragmento de imunoglobulina. Por exemplo, em alguns exemplos de realização, uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser ligada, de preferência através de um ligante peptídico, em seu N-terminal ao C-terminal de uma região constante de cadeia pesada (CH) de uma subunidade de imunoglobulina, ou uma subunidade de muteína de lipocalina pode ser ligada, de preferência através de um ligante peptídico, em seu N-terminal ao C-terminal de uma região constante de cadeia leve (CL) de uma subunidade de imunoglobulina.

[089] Em alguns exemplos de realização, quando uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total (completa), uma segunda subunidade pode ser ligada entre o N-terminal da segunda subunidade e o C-terminal de uma região constante de cadeia pesada (CH) da referida imunoglobulina.

[090] Em outros exemplos de realização adicionais, uma terceira subunidade pode ser ligada entre o N-terminal da terceira subunidade e o C-terminal de uma região constante de cadeia leve (CL) da referida

imunoglobulina.

[091] Em alguns exemplos de realização, com relação a uma proteína de fusão da presente divulgação, em que uma das subunidades pode ser ou compreender uma imunoglobulina de comprimento total, a função Fc da região Fc da imunoglobulina de comprimento total para a célula positiva para receptor Fc pode ser ao mesmo tempo preservada, enquanto a proteína de fusão está simultaneamente se ligando ao CD137 e GPC3.

[092] Em alguns exemplos de realização, em que pelo menos uma subunidade de uma proteína de fusão fornecida pode ser ou compreender uma imunoglobulina de comprimento total, a função Fc da região Fc da imunoglobulina de comprimento total para células positivas para o receptor de Fc pode ser reduzida ou totalmente suprimida pela manipulação/modificação de proteínas enquanto a proteína de fusão está simultaneamente se ligando ao CD137 e GPC3. Em alguns exemplos de realização, isto pode ser conseguido, por exemplo, pela alteração da estrutura central da IgG₁ para IgG₄, uma vez que a IgG₄ é conhecida por apresentar interações reduzidas do receptor Fc-gama em comparação com a IgG₁. Em alguns exemplos de realização, para reduzir ainda mais a ligação residual aos receptores Fc-gama, podem ser introduzidas mutações na cadeia principal da IgG₄, tal como F234A e L235A. Em alguns exemplos de realização, uma mutação S228P pode ser introduzida na estrutura principal da IgG₄ para minimizar a troca de meio-anticorpo IgG₄ (Silva *et al.*, *J Biol Chem*, 2015). Em alguns exemplos de realização, as mutações F234A e L235A podem ser introduzidas para diminuir a ADCC e ADCP (Glaesner *et al.*, *Diabetes Metab Res Rev*, 2010) e/ou as mutações M428L e N434S ou mutações M252Y, S254T e T256E podem ser introduzidas para estender a meia-vida sérica (Dall'Acqua *et al.*, *J Biol Chem*, 2006, Zalevsky *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2010). Em alguns exemplos de realização, uma

mutação N297A adicional pode estar presente na cadeia pesada da imunoglobulina da proteína de fusão de modo a remover o motivo de glicosilação natural.

[093] Em alguns exemplos de realização, a porção Fc de uma imunoglobulina incluída em uma proteína de fusão da divulgação pode contribuir para manter os níveis séricos da proteína de fusão. Por exemplo, quando a porção Fc se liga aos receptores Fc nas células endoteliais e fagócitos, a proteína de fusão pode ser internalizada e reciclada de volta para a corrente sanguínea, aumentando sua meia-vida dentro do corpo.

[094] Em um aspecto, as proteínas de fusão da divulgação ligam CD137 com alta afinidade. Em outro aspecto, as proteínas de fusão fornecidas ligam-se à GPC3 com alta afinidade. Em alguns exemplos de realização preferidos, as proteínas de fusão fornecidas ligam-se simultaneamente ao CD137 e GPC3. Em alguns exemplos de realização, a ligação simultânea ao CD137 e GPC3 permite fornecer proteínas de fusão que exibem uma resposta antitumoral ou anti-infecção durável.

[095] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ter um ponto n isoeletrico (pI) de cerca de 6,5 ou superior, tal como cerca de 6,8 ou superior, cerca de 7,1 ou superior, cerca de 7,4 ou superior, cerca de 7,5 ou superior, cerca de 7,7 ou superior, cerca de 8,0 ou superior, cerca de 8,5 ou superior, ou cerca de 9,0 ou mesmo superior. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ter um pI maior do que o pI de uma proteína de fusão previamente conhecida que se liga ao CD137 e GPC3 e compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

[096] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da presente divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor K_D de

no máximo cerca de 2 nM ou menos, tal como cerca de 1,5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,8 nM ou menos, ou cerca de 0,7 nM ou menos. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor K_D comparável a ou menor do que o valor K_D da imunoglobulina específica para GPC3 incluída em tal proteína de fusão, tal como o anticorpo que possui as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82. Os valores K_D das proteínas de fusão fornecidas podem ser medidos, por exemplo, em um ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR), tal como um ensaio SPR como essencialmente descrito no Exemplo 2.

[097] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da presente divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 1 nM ou menos, tal como cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,3 nM ou menos, cerca de 0,2 nM ou menos, cerca de 0,15 nM ou menos, ou cerca de 0,1 nM ou menos. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor de EC_{50} comparável a ou menor do que o valor EC_{50} da imunoglobulina específica para GPC3 incluída em uma proteína de fusão particular, tal como o anticorpo que possui as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82. Os valores EC_{50} das proteínas de fusão fornecidas podem ser medidos, por exemplo, em um ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA), tal como um ensaio ELISA conforme essencialmente descrito no Exemplo 3.

[098] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da presente divulgação pode ser capaz de se ligar ao CD137 com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 5 nM ou ainda menos, tal como cerca de 3 nM ou menos, cerca de 2 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou

menos, cerca de 0,2 nM ou menos, ou cerca de 0,1 nM ou menos. Os valores de EC_{50} das proteínas de fusão fornecidas podem ser medidos, por exemplo, em um ensaio ELISA, tal como um ensaio ELISA conforme essencialmente descrito no Exemplo 3.

[099] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da presente divulgação pode apresentar reação cruzada com GPC3 de macacos cinomolgos. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida na presente divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 de macaco cinomolgo com um valor K_D de no máximo cerca de 2 nM ou ainda menos, tal como cerca de 1,5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,8 nM ou menos, ou cerca de 0,7 nM ou menos. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 de macacos cinomolgos com um valor K_D comparável a ou menor do que o valor K_D da imunoglobulina específica para GPC3 incluída em tal proteína de fusão, tal como o anticorpo que possui as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82. Os valores K_D das proteínas de fusão fornecidas podem ser medidos, por exemplo, em um ensaio SPR, tal como um ensaio SPR como essencialmente descrito no Exemplo 2. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida pode ser capaz de se ligar à GPC3 de cinomolgos com um valor EC_{50} de, no máximo, cerca de 1 nM ou ainda menos, tal como cerca de 0,5 nM ou menos, tal como cerca de 0,2 nM ou menos, cerca de 0,1 nM ou menos. Os valores de EC_{50} das proteínas de fusão fornecidas podem ser medidos, por exemplo, em um ensaio ELISA, tal como um ensaio ELISA como essencialmente descrito no Exemplo 3.

[100] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da presente divulgação pode ser capaz de se ligar simultaneamente a CD137 e GPC3. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida

pode ser capaz de se ligar simultaneamente a CD137 e GPC3, com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 10 nM ou ainda menos, tal como 5 nM ou menos, 3 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, ou 0,5 nM ou menos. Em outros exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida pode ser capaz de se ligar simultaneamente ao CD137 e GPC3, com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 10 nM ou ainda menos, tal como cerca de 8 nM ou menos ou cerca de 5 nM ou menos ou cerca de 3 nM ou menos ou cerca de 2 nM ou menos. A ligação simultânea pode ser determinada, por exemplo, em um ensaio ELISA, tal como um ensaio ELISA conforme descrito essencialmente no Exemplo 4.

[101] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ser capaz de se ligar ao CD137 expresso em uma célula com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 50 nM ou ainda menos, tal como cerca de 30 nM ou ainda menos, cerca de 25 nM ou ainda menos, cerca de 20 nM ou menos, cerca de 15 nM ou menos, cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 3 nM ou menos, ou cerca de 1 nM ou ainda menos. O valor de EC_{50} de uma proteína de fusão fornecida pode ser medido, por exemplo, em uma análise de citometria de fluxo, conforme descrito essencialmente no Exemplo 6. A célula que expressa CD137 pode ser, por exemplo, uma célula CHO transfectada com CD137 humano.

[102] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ser capaz de se ligar à GPC3 expressa em uma célula com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 50 nM ou ainda menos, tal como cerca de 30 nM ou ainda menos, cerca de 25 nM ou ainda menos, cerca de 20 nM ou menos, cerca de 15 nM ou menos, cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 3 nM ou menos, ou cerca de 1 nM ou ainda menos. O valor de EC_{50} de uma proteína de fusão fornecida pode ser medido, por

exemplo, em uma análise de citometria de fluxo, conforme descrito essencialmente no Exemplo 6. A célula que expressa GPC3 pode ser, por exemplo, uma célula SK-Hep1 transfectada com GPC3 humana.

[103] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem ser capazes de se ligar à GPC3 expressa em células tumorais. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida pode ser capaz de se ligar à GPC3 expressa em uma célula de tumor com um valor de EC_{50} de no máximo cerca de 50 nM ou ainda menos, tal como cerca de 30 nM ou ainda menos, cerca de 25 nM ou ainda menos, cerca de 20 nM ou menos, cerca de 15 nM ou menos, cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 3 nM ou menos, ou cerca de 1 nM ou ainda menos. O valor de EC_{50} para uma proteína de fusão se ligar às células tumorais que expressam GPC3 pode ser medido, por exemplo, em uma análise de citometria de fluxo, conforme descrito essencialmente no Exemplo 7. As células tumorais que expressam GPC3 podem ser, por exemplo, células HepG2, Hep3B e MKN-45.

[104] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação não se ligam substancialmente a alvos diferentes de CD137 ou GPC3. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida tem ligação fora do alvo reduzida para outros alvos além de CD137 ou GPC3, em comparação com uma proteína de fusão anteriormente conhecida que se liga tanto ao CD137 quanto à GPC3 e que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. Tal avaliação da ligação ao alvo pode ser realizada por um ensaio ELISA conforme descrito no Exemplo 5.

[105] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem ser capazes de coestimular e respostas de células T. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas levam a uma

ativação de células T comparável ou mais forte em comparação com o anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão com as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82, um anticorpo CD137 de referência com as cadeias pesadas e cadeias leves fornecidas nas SEQ ID NOs: 26 e 27, ou uma proteína de fusão previamente conhecida que se liga ao CD137 e à GPC3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas levam à ativação de células T com uma eficiência comparável, ou melhor, em comparação com o anticorpo GPC3 quando incluído na proteína de fusão e possuindo as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82, um anticorpo CD137 de referência possuindo as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 26 e 27, ou uma proteína de fusão previamente conhecida que se liga ao CD137 e GPC3 e que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. A resposta de células T estimuladas ou ativação de células T pode ser medida, por exemplo, em um bioensaio de CD137, conforme descrito essencialmente no Exemplo 8, ou em um ensaio de ativação de células T funcional, conforme descrito essencialmente no Exemplo 9, Exemplo 10, e Exemplo 11.

[106] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem ser capazes de induzir o aumento da secreção de IL-2. Em alguns exemplos de realização preferidos, as proteínas de fusão fornecidas podem ser capazes de induzir uma secreção de IL-2 de maneira dependente da concentração e/ou demonstrar uma tendência em induzir a secreção aumentada de IL-2 em concentrações mais elevadas. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem levar ao aumento da secreção de IL-2 com uma eficiência comparável, ou melhor, em comparação com o anticorpo GPC3 conforme incluído na proteína de fusão possuindo as

cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82, ou uma proteína de fusão previamente conhecida que se liga ao CD137 e GPC3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. A secreção de IL-2 pode ser medida, por exemplo, em um ensaio de ativação de células T funcional como descrito essencialmente no Exemplo 9 e Exemplo 10.

[107] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem ser capazes de induzir citotoxicidade mediada por células T. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem levar a citólise mediada por células T dependente da dose. Em algumas formas de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem induzir a ativação de células T citotóxicas com uma eficácia comparável, ou melhor, em comparação com o anticorpo GPC3 quando incluído nas proteínas de fusão fornecidas com cadeias pesada e leve previstas nas SEQ ID NOs: 81 e 82. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem induzir a ativação de células T citotóxicas com uma eficácia comparável, ou melhor, em comparação com um anticorpo CD137 com as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 26 e 27, um anticorpo CD137 de referência com as cadeias pesadas e cadeias leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 26 e 27, ou uma proteína de fusão previamente conhecida que se liga ao CD137 e GPC3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. A citotoxicidade mediada por células T pode ser determinada, por exemplo, em um ensaio de morte celular com células T baseado em impedância, essencialmente como descrito no Exemplo 11.

[108] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem ser capazes de coestimular e respostas de células T de maneira dependente de GPC3. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem levar à indução local da produção de

células T na vizinhança de células GPC3-positivas, tais como células transfectadas com GPC3 ou células de tumor que expressam GPC3. A expressão “na vizinhança de células GPC3-positivas”, quando utilizada, refere-se a uma célula T e uma célula positiva para GPC3 que são aproximadas uma da outra através de uma proteína de fusão fornecida que se liga ao CD137 e GPC3 simultaneamente. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem levar à morte localizada mediada por células T de células tumorais que expressam GPC3. A ativação dependente de GPC3 de células T por proteínas de fusão fornecidas pode ser determinada, por exemplo, em um bioensaio de CD137 conforme descrito essencialmente no Exemplo 8, ou em um ensaio de ativação de células T funcional conforme descrito essencialmente no Exemplo 9, Exemplo 10 e Exemplo 11.

[109] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas não são capazes de coestimular respostas de células T na ausência de GPC3. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas não são capazes de coestimular respostas de células T na ausência de células expressando GPC3. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida pode ser capaz de discernir a presença de GPC3 e levar à ativação de células T correspondente melhor do que um anticorpo CD137 com as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 26 e 27. A ação dependente de GPC3 das proteínas de fusão pode ser determinada, por exemplo, em um bioensaio de CD137 essencialmente como descrito no Exemplo 8, ou em um ensaio de ativação de célula T funcional, essencialmente como descrito no Exemplo 9, Exemplo 10, e Exemplo 11.

[110] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem levar a atividades antitumorais. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem inibir o crescimento

tumoral de células HepG2 de carcinoma hepatocelular. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem inibir o crescimento tumoral de células HepG2 de carcinoma hepatocelular com eficácia comparável ou melhor em comparação com o anticorpo GPC3 incluído nas proteínas de fusão com as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82. Tais atividades antitumorais podem ser determinadas, por exemplo, usando um modelo de xenoenxerto de HepG2 essencialmente como descrito no Exemplo 12.

[111] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem elevar os níveis de linfócitos infiltrantes de tumor. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas podem levar ao aumento da filtração intratumoral de células T CD3, CD4 ou CD8, em comparação com o anticorpo GPC3 incluído nas proteínas de fusão com as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82. Os linfócitos infiltrantes de tumor podem ser analisados, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 13.

[112] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão fornecidas têm estabilidade e perfis farmacocinéticos favoráveis. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida tem um perfil farmacocinético comparável ao do anticorpo GPC3 incluído na proteína de fusão com as cadeias pesadas e leves fornecidas pelas SEQ ID NOs: 81 e 82. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida tem uma farmacocinética semelhante a de anticorpo. Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida tem uma meia-vida terminal de cerca de 50 horas ou mais, 75 horas ou mais, 100 horas ou mais, 125 horas ou mais, cerca de 150 horas ou mais, cerca de 175 horas ou mais, cerca de 200 horas ou mais, cerca de 250 horas ou mais, ou uma meia-vida ainda mais longa. Em

alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida tem uma meia-vida terminal em camundongos de cerca de 50 horas ou mais, 75 horas ou mais, 100 horas ou mais, 125 horas ou mais, cerca de 150 horas ou mais, cerca de 175 horas ou mais, cerca de 200 horas ou mais, cerca de 250 horas ou mais, ou uma meia-vida ainda mais longa. Os perfis farmacocinéticos das proteínas de fusão fornecidas podem ser analisados conforme descrito no Exemplo 13.

[113] Em alguns exemplos de realização, um proteína de fusão fornecida compreende uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 87 - 96.

[114] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende uma sequência de aminoácidos com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95 %, pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência ou uma identidade ainda maior com as sequências de aminoácidos mostradas em qualquer uma das SEQ ID NOs: 87-96.

[115] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID NOs: 88 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 89, SEQ ID NOs: 81 e 90, SEQ ID NOs: 91 e 82, SEQ ID NOs: 92 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 93, SEQ ID NOs: 81 e 94, SEQ ID NOs: 95 e 82, ou SEQ ID NOs: 96 e 82.

[116] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão fornecida compreende as sequências de aminoácidos com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, em pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência ou uma identidade até mesmo maior com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID

NOs: 88 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 89, SEQ ID NOs: 81 e 90, SEQ ID NOs: 91 e 82, SEQ ID NOs: 92 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 93, SEQ ID NOs: 81 e 94, SEQ ID NOs: 95 e 82, ou SEQ ID NOs: 96 e 82.

B. EXEMPLOS DE IMUNOGLOBULINAS INCLUÍDAS NAS PROTEÍNAS DE FUSÃO

[117] Em alguns exemplos de realização, no que diz respeito a uma proteína de fusão fornecida, uma primeira subunidade pode ser ou compreender uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma específica para GPC3. Em alguns exemplos de realização, uma imunoglobulina pode ser, por exemplo, IgG₁, IgG₂ ou IgG₄. Em alguns exemplos de realização, uma imunoglobulina é ou compreende IgG₄. Em alguns exemplos de realização, uma imunoglobulina é um anticorpo monoclonal contra GPC3.

[118] Exemplos ilustrativos de anticorpos de ligação à GPC3 da divulgação podem compreender uma região de ligação ao antígeno que bloqueia ou se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo de ligação à GPC3 compreendendo as regiões do domínio variável de cadeia pesada (V_H) e do domínio variável de cadeia leve (V_L) de um anticorpo conhecido, como codrituzumabe (também conhecido como GC33 ou RO5137382), YP7 (incluindo YP7 humanizado), HN3 e HS20. Em alguns exemplos de realização, um anticorpo de ligação à GPC3 da presente divulgação pode compreender uma região de ligação ao antígeno, tal como qualquer uma das três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e as três CDR de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) de um anticorpo selecionado a partir do grupo que consiste em codrituzumabe, YP7, HN3 e HS20.

[119] Em alguns exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo pode ter uma região

variável de cadeia pesada (HCVR) selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 78, 114, 119, 126 e 129, e/ou uma região variável de cadeia leve (LCVR) selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 79, 115 e 127.

[120] Em alguns exemplos de realização, o par de cadeias pesada e leve de um anticorpo GPC3 fornecido ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo são ou compreendem uma HCVR e LCVR, respectivamente, com as seguintes sequências de SEQ ID NOs: 78 e 79, SEQ ID NO: 129 e 79, SEQ ID NOs: 114 e 115, ou SEQ ID NOs: 126 e 127.

[121] Em alguns exemplos de realização, o par de cadeias pesada e leve de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, são ou compreendem uma HCVR e LCVR, respectivamente, que têm uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 78 e 79, SEQ ID NOs: 129 e 79, SEQ ID NOs: 114 e 115, ou SEQ ID NOs: 126 e 127.

[122] Em alguns exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter uma cadeia pesada que é de qualquer uma das SEQ ID NOs: 80 e 81 e/ou uma cadeia leve que é de SEQ ID NO: 82.

[123] Em alguns exemplos de realização, o par de cadeias pesada e leve de um anticorpo GPC3 fornecido é ou compreende as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 80 e 82 ou SEQ ID NO: 81 e 82.

[124] Em alguns exemplos de realização, o par de cadeias

pesada e leve de um anticorpo GPC3 fornecido são ou compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que tem uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência, ou ainda mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 80 e 82 ou SEQ ID NO: 81 e 82.

[125] Em alguns exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter uma HCVR com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% identidade de sequência ou mesmo uma identidade ainda mais elevada para uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 78, 114, 119, 126, e 129, e/ou uma LCVR com a pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% identidade de sequência ou mesmo uma identidade ainda mais elevada para uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 79, 115 e 127. Em outros exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter uma cadeia pesada com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% identidade de sequência ou mesmo uma identidade ainda mais elevada para uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 80 e 81, e/ou uma cadeia leve com a pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% identidade de sequência ou mesmo uma identidade

ainda mais elevada para uma sequência de SEQ ID NO: 82.

[126] Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia pesada de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), TRFYSTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74). Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia pesada de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: GFTFNKNA (HCDR1, SEQ ID NO: 108), IRNKTNNYAT (HCDR2, SEQ ID NO: 109), VAGNSFAY (HCDR3; SEQ ID NO: 110). Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia pesada de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: YDFDYSYE (HCDR1, SEQ ID NO: 116), IYHSGST (HCDR2, SEQ ID NO: 117), ARVNMDRFDY (HCDR3; SEQ ID NO: 118). Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia pesada de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: GFTFSSYA (HCDR1, SEQ ID NO: 120), IQKQGLPT (HCDR2, SEQ ID NO: 121), AKNRAKFDY (HCDR3; SEQ ID NO: 122).

[127] Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia leve de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2), SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77). Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia leve de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: QSLLYSSNQKNY (LCDR1, SEQ ID NO: 111), WAS (LCDR2), QQYYNYPLT

(LCDR3; SEQ ID NO: 113). Em alguns exemplos de realização, a região variável de cadeia leve de um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, pode ter as três CDRs com as seguintes sequências: QSISSY (LCDR1, SEQ ID NO: 123), NAS (LCDR2), QQNRGFPLT (LCDR3; SEQ ID NO: 125).

[128] Em alguns exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que tem as três CDRs com as seguintes sequências: GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), TRFYSTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74), e uma região variável de cadeia leve que tem as três CDRs com as seguintes sequências: QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2), SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77). Em alguns exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que tem as três CDRs com as seguintes sequências: GFTFNKNA (HCDR1, SEQ ID NO: 108), IRNKTNNYAT (HCDR2, SEQ ID NO: 109), VAGNSFAY (HCDR3; SEQ ID NO: 110), e uma região variável de cadeia leve que tem as três CDRs com as seguintes sequências: QSLLYSSNQKNY (LCDR1, SEQ ID NO: 111), WAS (LCDR2), QQYYNYPLT (LCDR3; SEQ ID NO: 113). Em alguns exemplos de realização, um anticorpo GPC3 fornecido, ou o domínio de ligação ao antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que tem as três CDRs com as seguintes sequências: GFTFSSYA (HCDR1, SEQ ID NO: 120), IQKQGLPT (HCDR2, SEQ ID NO: 121), AKNRAKFDY (HCDR3; SEQ ID NO: 122), e uma região variável de cadeia leve que tem as três CDRs com as seguintes sequências: QSISSY (LCDR1, SEQ ID NO: 123), NAS (LCDR2), QQNRGFPLT (LCDR3; SEQ ID NO: 125).

[129] A menos que indicado de outra forma, todas as sequências de CDRs divulgadas neste documento são definidas de acordo com o método IMGT conforme descrito em Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999). A CDR1 consiste nas posições 27 a 38, a CDR2 consiste nas posições 56 a 65, a CDR3 para genes da linhagem germinativa V consiste nas posições 105 a 116, a CDR3 para genes rearranjados V-J ou V-D-J consistem nas posições 105 a 117 (posição anterior J-PHE ou J-TRP 118) com lacunas no topo da alça para CDR3-IMGT reorganizado com menos de 13 aminoácidos, ou com posições adicionais 112.1, 111.1, 112.2, 111.2, etc. para CDR3-IMGT reorganizado com mais de 13 aminoácidos. As posições fornecidas neste parágrafo estão de acordo com a numeração IMGT descrita em Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999).

[130] Os anticorpos que se ligam especificamente à GPC3, tal como incluído em proteínas de fusão da presente divulgação, podem compreender uma porção Fc que permite a extensão da meia-vida *in vivo* da molécula de ligação biespecífica da presente divulgação. Em alguns exemplos de realização, essa porção Fc é preferencialmente de origem humana, mais preferencialmente uma parte Fc humana de um anticorpo IgG₁ ou IgG₄, ainda mais preferencialmente uma parte Fc humana projetada de uma IgG₁ ou IgG₄ com funções efetoras de ativação ou silenciamento. Em alguns exemplos de realização, as funções efetoras de silenciamento podem ser preferidas em vez de funções efetoras de ativação. Em alguns exemplos de realização, tal porção Fc é projetada para silenciar funções efetoras com mutação(ões) nas posições 234 e/ou 235, numeração de acordo com o índice EU de Kabat (Johnson e Wu, *Nucleic Acids Res*, 2000). Em alguns exemplos de realização, as mutações nas posições F234 e L235 de um anticorpo anti-GPC3 fornecido podem ser introduzidas para silenciar as funções efetoras. Em outros exemplos de

realização, mutações nas posições D265 e P329 de um anticorpo anti-GPC3 fornecido podem ser introduzidas para silenciar a função efetora. A numeração de ambos os conjuntos dessas mutações potenciais está de acordo com o índice EU de Kabat (Shields *et al.*, *J Biol Chem*, 2001).

[131] Várias técnicas para a produção de anticorpos e fragmentos dos mesmos são bem conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, em Altshuler *et al.* (2010). Assim, por exemplo, anticorpos policlonais podem ser obtidos a partir do sangue de um animal após imunização com um antígeno em mistura com aditivos e adjuvantes e anticorpos monoclonais podem ser produzidos por qualquer técnica que forneça anticorpos produzidos por culturas contínuas de linhagens de células. Exemplos de tais técnicas são descritos, por exemplo, por Harlow e Lane (1999), (1988), e incluem a técnica de hibridoma originalmente descrita por Köhler e Milstein, 1975, a técnica de trioma, a técnica de hibridoma de células B humanas (consulte, por exemplo, Li *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, Kozbor e Roder, *Immunol Today*, 1983) e a técnica de hibridoma de EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, *Cancer Res*, 1984). Além disso, os anticorpos recombinantes podem ser obtidos a partir de anticorpos monoclonais ou podem ser preparados *de novo* usando vários métodos de exibição, tais como exibição por fago, ribossomal, mRNA ou exibição de células. Em alguns exemplos de realização, um sistema adequado para a expressão dos anticorpos recombinantes (humanizados) ou fragmentos dos mesmos pode ser selecionado, por exemplo, a partir de bactérias, leveduras, insetos, linhagens de células de mamíferos ou animais ou plantas transgênicas (consulte, por exemplo, a Patente US No 6.080.560; Holliger e Hudson, *Nat Biotechnol*, 2005). Além disso, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia simples (consulte, entre outros, a Patente US 4.946.778) podem ser

adaptadas para produzir anticorpos de cadeia simples específicos para o alvo da presente invenção. A ressonância plasmônica de superfície conforme utilizada no sistema BIAcore, pode ser usada para aumentar a eficiência dos anticorpos de fagos.

C. MUTEÍNAS DE LIPOCALINA EXEMPLARES DA DIVULGAÇÃO

[132] As lipocalinas são moléculas de ligação proteínáceas que naturalmente evoluíram para ligar ligantes. As lipocalinas ocorrem em muitos organismos, incluindo vertebrados, insetos, plantas e bactérias. Os membros da família de proteínas lipocalinas (Pervaiz e Brew, *FASEB J*, 1987) são proteínas tipicamente pequenas secretadas e têm uma única cadeia polipeptídica. Elas são caracterizadas por uma gama de diferentes propriedades de reconhecimento molecular: a capacidade dessas proteínas de ligar várias moléculas, principalmente hidrofóbicas (como retinoides, ácidos graxos, colesterol, prostaglandinas, biliverdinas, feromônios, saborizantes e odorantes), e a ligação a receptores de superfície específicos de células, e formação de complexos macromoleculares. Embora, no passado, tenham sido classificadas principalmente como proteínas de transporte, está claro atualmente que as lipocalinas cumprem uma variedade de funções fisiológicas. Dentre estas funções, estão incluídos papéis no transporte de retinol, olfação, sinalização de feromônios e síntese de prostaglandinas. As lipocalinas também foram implicadas na regulação da resposta imune e na mediação da homeostase celular (revisado, por exemplo, em Flower *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996).

[133] As lipocalinas compartilham níveis excepcionalmente baixos de conservação geral de sequência, muitas vezes com identidades de sequência inferiores a 20%. Em forte contraste, seu padrão de enovelamento geral é altamente conservado. A parte central da estrutura da lipocalina

consiste em uma única folha β antiparalela de oito cadeias fechada envolta de si mesma para formar um barril β ligado a través de hidrogênio continuamente. Este barril β forma uma cavidade central. Uma extremidade do barril é estericamente bloqueada pelo segmento do peptídeo N-terminal que atravessa seu fundo, bem como três alças (*loops*) peptídicas que conectam as fitas β . A outra extremidade do barril β é aberta ao solvente e abrange um sítio de ligação ao alvo, que é formado por quatro alças de peptídeos flexíveis (AB, CD, EF, e GH). É essa diversidade das alças no scaffold de lipocalina de outra forma rígido que dá lugar a uma variedade de diferentes modos de ligação capazes de acomodar alvos de diferentes tamanhos, forma e caráter químico (revisado, por exemplo, em Skerra, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, 2000, Flower, *Biochem J*, 1996).

[134] Uma muteína de lipocalina de acordo com a presente divulgação pode ser uma muteína de qualquer lipocalina. Exemplos de lipocalinas adequadas (também às vezes designadas como “lipocalina de referência”, “lipocalina tipo selvagem”, “estruturas (*scaffolds*) de proteína de referência” ou simplesmente “estruturas ou *scaffolds*”) das quais uma muteína pode ser usada incluem, mas não estão limitados a, lipocalina lacrimal (lipocalina-1, Tlc ou proteína da glândula de von Ebner), proteína de ligação ao retinol, D-sintase de prostaglandina tipo lipocalina de neutrófilo, β -lactoglobulina, proteína de ligação à bilina (BBP), apolipoproteína D (APO D), lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), proteína relacionada à α 2-microglobulina (A2m), 24p3/uterocalina (24p3), proteína 1 da glândula de von Ebners (VEGP 1), proteína 2 da glândula von Ebners (VEGP 2) e precursor principal de alérgeno Can f1 (ALL-1). Em exemplos de realização relacionados, uma muteína de lipocalina é derivada do grupo de lipocalina que consiste em lipocalina lacrimal humana (hTlc), lipocalina associada à gelatinase de

neutrófilos humanos (hNGAL), apolipoproteína D humana (hAPOD) e a proteína de ligação à bilina de *Pieris brassicae*.

[135] A sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina de acordo com a divulgação pode ter uma alta identidade de sequência em comparação com a lipocalina de referência (ou tipo selvagem) da qual é derivada, por exemplo, hTlc ou hNGAL, quando comparada à identidade de sequência com outra lipocalina (veja também acima). Neste contexto geral, a sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina de acordo com a divulgação é pelo menos substancialmente semelhante à sequência de aminoácidos da lipocalina de referência (tipo selvagem) correspondente, com a condição de que possa haver lacunas (conforme definido neste documento) em um alinhamento que é resultado de adições ou deleções de aminoácidos. Uma sequência respectiva de uma muteína de lipocalina da divulgação, sendo substancialmente semelhante às sequências da lipocalina de referência (tipo selvagem) correspondente, tem, em alguns exemplos de realização, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, em pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 82%, pelo menos 85%, pelo menos 87%, pelo menos 90% de identidade, incluindo pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência da lipocalina correspondente. A este respeito, uma muteína de lipocalina da divulgação, é claro, pode conter substituições, conforme descrito neste documento, que torna a muteína de lipocalina capaz de se ligar ao CD137.

[136] Normalmente, uma muteína de lipocalina contém um ou mais resíduos de aminoácidos mutados - em relação à sequência de aminoácidos da lipocalina tipo selvagem ou de referência, por exemplo, hTlc e hNGAL - nas quatro alças na extremidade aberta que compreendem um bolso de ligação ao ligante e define a entrada do bolso de ligação ao ligante (cf.

acima). Conforme explicado acima, essas regiões são essenciais para determinar a especificidade de ligação de uma muteína de lipocalina para um alvo desejado. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da divulgação também pode conter regiões de resíduos de aminoácidos mutadas fora das quatro alças. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da divulgação pode conter um ou mais resíduos de aminoácidos mutados em uma ou mais das três alças peptídicas (designadas BC, DE e FG) conectando as fitas β na extremidade fechada da lipocalina. Em alguns exemplos de realização, uma muteína derivada de um polipeptídeo de lipocalina de lágrima, lipocalina NGAL ou um homólogo da mesma, pode ter um, dois, três, quatro ou mais resíduos de aminoácidos mutados em qualquer posição de sequência na região N-terminal e/ou nas três alças peptídicas BC, DE e FG dispostas na extremidade da estrutura de barril β que está localizada oposta ao bolso de ligação da lipocalina natural. Em alguns exemplos de realização, uma muteína derivada de um polipeptídeo de lipocalina lacrimal, lipocalina NGAL, ou um homólogo desta, pode não ter resíduos de aminoácidos mutados na alça peptídica DE dispostos na extremidade da estrutura do barril β , em comparação com a sequência tipo selvagem da lipocalina lacrimal.

[137] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina de acordo com a divulgação pode incluir um ou mais, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou ainda mais resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência de aminoácidos de uma lipocalina de referência correspondente (tipo selvagem), desde que tal muteína de lipocalina seja capaz de se ligar ao CD137. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da divulgação inclui pelo menos dois, incluindo 2, 3, 4, 5, ou ainda mais, resíduos de aminoácidos mutado, de modo

que um resíduo de aminoácido nativo da lipocalina de referência correspondente (tipo selvagem) é substituído por um resíduo de arginina.

[138] Quaisquer tipos e quantidades de mutações, incluindo substituições, deleções e inserções, são considerados, desde que uma muteína de lipocalina fornecida retenha sua capacidade de se ligar ao CD137 e/ou tenha uma identidade de sequência de pelo menos 60%, tal como pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da lipocalina de referência (tipo selvagem), por exemplo, hTlc madura ou hNGAL madura.

[139] Em alguns exemplos de realização, uma substituição é uma substituição conservadora. Em alguns exemplos de realização, uma substituição é uma substituição não conservadora ou uma ou mais das substituições exemplares abaixo.

[140] Especificamente, para determinar se um resíduo de aminoácido da sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina diferente de uma lipocalina de referência (tipo selvagem) corresponde a uma determinada posição na sequência de aminoácidos de uma lipocalina tipo selvagem de referência (tipo selvagem), um especialista na técnica pode utilizar meios e métodos bem conhecidos no estado da técnica, por exemplo, alinhamentos, seja manualmente ou utilizando programas de computador como BLAST2.0, acrônimo do inglês *Basic Local Alignment Search Tool* ou ClustalW ou qualquer outro programa adequado que seja adequado para gerar alinhamentos de sequência. Consequentemente, a sequência de aminoácidos de uma lipocalina de referência (tipo selvagem) pode servir como “sequência sujeito” ou “sequência de referência”, enquanto a sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina serve como “sequência de consulta” (veja também

acima).

[141] As substituições conservadoras são geralmente as seguintes substituições, listadas de acordo com o aminoácido a ser mutado, cada uma das substituições seguida por uma ou mais substituições que podem ser consideradas como conservadoras: Ala → Ser, Thr, ou Val; Arg → Lys, Gln, Asn, ou His; Asn → Gln, Glu, Asp, ou His; Asp → Glu, Gln, Asn, ou His; Gln → Asn, Asp, Glu, ou His; Glu → Asp, Asn, Gln, ou His; His → Arg, Lys, Asn, Gln, Asp, ou Glu; Ile → Thr, Leu, Met, Phe, Val, Trp, Tyr, Ala, ou Pro; Leu → Thr, Ile, Val, Met, Ala, Phe, Pro, Tyr, ou Trp; Lys → Arg, His, Gln, ou Asn; Met → Thr, Leu, Tyr, Ile, Phe, Val, Ala, Pro, ou Trp; Phe → Thr, Met, Leu, Tyr, Ile, Pro, Trp, Val, ou Ala; Ser → Thr, Ala, ou Val; Thr → Ser, Ala, Val, Ile, Met, Val, Phe, Pro, ou Leu; Trp → Tyr, Phe, Met, Ile, ou Leu; Tyr → Trp, Phe, Ile, Leu, ou Met; Val → Thr, Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Ser, ou Pro. Outras substituições também são permitidas e podem ser determinadas de forma empírica ou de acordo com outras substituições conservadoras ou não conservadoras conhecidas. Como uma orientação adicional, os seguintes grupos contêm aminoácidos que normalmente podem ser usados para definir substituições conservadoras entre si:

- (a) Alanina (Ala), Serina (Ser), Treonina (Thr), Valina (Val);
- (b) Ácido aspártico (Asp), Ácido glutâmico (Glu), Glutamina (Gln), Asparagina (Asn), Histidina (His);
- (c) Arginina (Arg), Lisina (Lys), Glutamina (Gln), Asparagina (Asn), Histidina (His);
- (d) Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Valina (Val), Alanina (Ala), Fenilalanina (Phe), Treonina (Thr), Prolina (Pro); e
- (e) Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr), Triptofano (Trp).

[142] Se tais substituições conservadoras resultarem em uma mudança na atividade biológica, então mudanças mais substanciais com as seguintes ou como descrito mais adiante em referência a classes de aminoácidos, podem ser introduzidas e os produtos selecionados. Exemplos dessas alterações mais substanciais são: Ala → Leu ou Phe; Arg → Glu; Asn → Ile, Val, ou Trp; Asp → Met; Cys → Pro; Gln → Phe; Glu → Arg; His → Gly; Ile → Lys, Glu, ou Gln; Leu → Lys ou Ser; Lys → Tyr; Met → Glu; Phe → Glu, Gln, ou Asp; Trp → Cys; Tyr → Glu ou Asp; Val → Lys, Arg, His.

[143] Em alguns exemplos de realização, modificações substanciais nas propriedades físicas e biológicas da (mteína de) lipocalina são obtidas por meio da seleção de substituições que diferem significativamente em seus efeitos sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, por exemplo, na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio desejado; ou (c) do volume da cadeia lateral.

[144] Os resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral: (1) hidrofóbicos: norleucina, metionina, alanina, valina, leucina, isoleucina; (2) hidrófilo neutro: cisteína, serina, treonina; (3) ácido: ácido aspártico, ácido glutâmico; (4) básico: asparagina, glutamina, histidina, lisina, arginina; (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: glicina, prolina; e (6) aromáticos: triptofano, tirosina, fenilalanina. Em alguns exemplos de realização, substituições não conservadoras podem causar a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe.

[145] Qualquer resíduo da cisteína não envolvida na manutenção da conformação apropriada da respectiva lipocalina também pode ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da

molécula e para impedir ligações cruzadas aberrantes. Inversamente, ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) à lipocalina para melhorar sua estabilidade.

D. MUTEÍNAS DE LIPOCALINA ESPECÍFICAS PARA CD137 EXEMPLARES DA

PRESENTE DIVULGAÇÃO

[146] Conforme observado acima, uma lipocalina é um polipeptídeo definido por sua estrutura supersecundária, nomeadamente, uma região estrutural supersecundária de folha β pregueada compreendendo oito fitas β conectadas em pares por quatro alças em uma extremidade para definir assim um bolso de ligação. A presente divulgação não se limita às muteínas de lipocalina descritas especificamente aqui. A este respeito, a divulgação se refere a uma muteína de lipocalina possuindo uma região estrutural de superfície supersecundária de folha β pregueada cilíndrica compreendendo oito fitas β , ligadas em pares por quatro alças em uma extremidade para definir assim um bolso de ligação, em que pelo menos um aminoácido em pelo menos cada uma das três alças referidas foi mutado e a referida lipocalina é eficaz para se ligar ao CD137 com afinidade detectável.

[147] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de lipocalina divulgadas na presente invenção podem ser ou compreender uma muteína de lipocalina de lágrima humana (hTlc) madura. Uma muteína de hTlc madura pode ser designada aqui como uma “muteína de hTlc”. Em outros exemplos de realização, uma muteína de lipocalina divulgada na presente invenção é uma muteína de lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) madura. Uma muteína de hNGAL madura pode ser designada aqui como uma “muteína de hNGAL”.

[148] Em um aspecto, a presente divulgação inclui qualquer número de muteínas de lipocalina derivadas de uma lipocalina de referência

(tipo selvagem), de preferência derivada de hTlc madura ou hNGAL madura, que se ligam ao CD137 com afinidade detectável. Em um aspecto relacionado, a divulgação inclui diversas muteínas de lipocalina que são capazes de ativar vias de sinalização a jusante de CD137 pela ligação ao CD137. Neste sentido, o CD137 pode ser considerado como um alvo não natural da lipocalina de referência (tipo selvagem), de preferência hTlc ou hNGAL, onde “alvo não natural” se refere a uma substância que não se liga às lipocalinas de referência (tipo selvagem) em condições fisiológicas. Ao modificar as lipocalinas de referência (tipo selvagem) com uma ou mais mutações em determinadas posições da sequência, os presentes inventores demonstraram que é possível obter uma alta afinidade e alta especificidade para o alvo não natural, o CD137. Em alguns exemplos de realização, uma mutagênese aleatória em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou mais tripletos de nucleotídeos que codificam certas posições da sequência nas lipocalinas tipo selvagem pode ser realizada pela substituição nessas posições por um subconjunto de tripletos, com o objetivo de gerar uma muteína de lipocalina capaz de ligar ao CD137.

[149] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de lipocalina da divulgação podem ter mutado, incluindo por substituições, deleções e inserções de resíduo(s) de aminoácido(s) em uma ou mais posições de sequência correspondentes à sequência polipeptídica linear de uma lipocalina de referência, de preferência hTlc ou hNGAL. Em alguns exemplos de realização, o número de resíduos de aminoácidos de uma muteína de lipocalina da divulgação que é mutada em comparação com a sequência de aminoácidos da lipocalina de referência, de preferência hTlc ou hNGAL, é 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais, tal como 25, 30, 35, 40, 45 ou 50, com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 sendo preferidos e 9, 10 ou 11 sendo ainda mais preferidos. Entretanto, é preferido que uma muteína

de lipocalina da divulgação seja capaz de se ligar ao CD137.

[150] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da presente divulgação pode faltar 1, 2, 3, 4 ou mais aminoácidos em sua extremidade N-terminal e/ou 1, 2 ou mais aminoácidos na sua extremidade C-terminal, em comparação com as respectivas lipocalina de referência (tipo selvagem); por exemplo, SEQ ID NOs: 32-38. Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação abrange também muteínas de hTlc conforme definido acima, nas quais o primeiro resíduo ou os primeiros dois, três ou quatro resíduos de aminoácidos N-terminais da sequência de hTlc madura (His-His-Leu-Leu; posições 1-4) e/ou o último ou os dois últimos resíduos de aminoácidos C-terminais (posições Ser-Asp; 157-158) da sequência polipeptídica linear da hTlc madura foram deletados (por exemplo, SEQ ID NO: 32-38). Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação abrange também muteínas de hNGAL conforme definido acima, nas quais os resíduos de aminoácidos (Lis-Asp-Pro, posições 46-48) da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura foram deletados (SEQ ID NO: 43). Além disso, uma muteína de lipocalina da divulgação pode incluir a sequência de aminoácidos de tipo selvagem (natural) da lipocalina de referência (tipo selvagem), de preferência hTlc ou hNGAL, fora das posições da sequência de aminoácidos mutada.

[151] Em alguns exemplos de realização, um ou mais resíduos de aminoácidos mutados incorporados em uma muteína de lipocalina da divulgação que não dificulta ou interfere substancialmente com a atividade de ligação ao alvo designado e enovelamento da muteína. Essas mutações, incluindo substituição, deleção e inserção, podem ser realizadas no nível do DNA usando métodos padrão estabelecidos (Sambrook e Russell, 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*). Em alguns exemplos de realização, resíduo(s) de aminoácido(s) mutado(s) em uma ou mais posições de sequência

correspondentes à sequência polipeptídica linear da lipocalina de referência (tipo selvagem), de preferência hTlc ou hNGAL, é introduzido por mutagênese aleatória por substituição do tripleto de nucleotídeos que codifica as posições de sequência correspondentes da lipocalina de referência com um subconjunto de tripletos de nucleotídeos.

[152] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina fornecida que se liga ao CD137 com afinidade detectável pode incluir pelo menos uma substituição de aminoácido de um resíduo de cisteína nativo por outro aminoácido, por exemplo, um resíduo de serina. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina que se liga ao CD137 com afinidade detectável pode incluir um ou mais resíduos de cisteína não nativos substituindo um ou mais aminoácidos da lipocalina de referência (tipo selvagem), preferencialmente hTlc e hNGAL. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina de acordo com a presente divulgação inclui pelo menos duas substituições de aminoácidos de um aminoácido nativo por um resíduo de cisteína para formar uma ou mais pontes de cisteína. Em alguns exemplos de realização, a referida ponte de cisteína pode se ligar a pelo menos duas regiões de *loop*. A definição dessas regiões é usada aqui de acordo com (*Biochim Biophys Acta*, 2000), Flower (1996) e Breustedt *et al.* (2005).

[153] Em geral, uma muteína de lipocalina da presente divulgação pode ter cerca de pelo menos 70%, incluindo pelo menos cerca de 80%, tal como pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, com a sequência de aminoácidos da hTlc madura (SEQ ID NO: 1) ou hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[154] Em alguns aspectos, a presente divulgação fornece muteínas de hTlc que se liga ao CD137. A este respeito, a presente divulgação

provê uma ou mais muteínas de hTlc que são capazes de ligar ao CD137 com uma afinidade medida por uma K_D de cerca de 300 nM, 200 mM, 150 mM, 100 mM, ou menos. Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc fornecidas são capazes de se ligar ao CD137 com um valor de EC_{50} de cerca de 250 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM ou menos. Em outros exemplos de realização, as muteínas de hTlc de ligação ao CD137 podem ter reatividade cruzada com CD137 de cinomolgo (cyCD137).

[155] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc da divulgação pode interferir com a ligação do CD137L ao CD137.

[156] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em uma ou mais posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[157] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc podem compreender um resíduo de aminoácido mutante em uma ou mais posições correspondentes às posições 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106, e 108 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[158] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc podem compreender ainda um resíduo de aminoácido mutante em uma ou mais posições correspondentes às posições 101, 111, 114 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[159] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ou mais posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e

153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Em alguns exemplos de realização preferidos, as muteínas de hTlc fornecidas são capazes de se ligar ao CD137, em particular ao CD137 humano.

[160] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc podem compreender um resíduo de aminoácido mutante em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou mais posições correspondentes às posições 26-34, 55-58, 60-61, 65, 104-106, e 108 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Em alguns exemplos de realização preferidos, as muteínas de hTlc fornecidas são capazes de se ligar ao CD137, em particular ao CD137 humano.

[161] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina de acordo com a presente divulgação pode incluir pelo menos uma substituição de aminoácido de um resíduo de cisteína nativo, por exemplo, por um resíduo de serina. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc de acordo com a divulgação inclui uma substituição de aminoácido de um resíduo de cisteína nativa nas posições correspondentes às posições 61 e/ou 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1) por outro aminoácido, tal como um resíduo de serina. Neste contexto, observou-se que a remoção da ligação de bissulfeto estrutural (no nível de uma respectiva biblioteca de ácido nucleico *naïve*) da hTlc tipo selvagem que é formada pelos resíduos de cisteína 61 e 153 (consulte, (cf. Breustedt *et al.*, *J Biol Chem*, 2005) pode fornecer muteínas de hTlc que não apenas são enoveladas de forma estável, como também são capazes de se ligar a um determinado alvo não natural com alta afinidade. Em alguns exemplos de realização, a eliminação da ligação de dissulfeto estrutural pode proporcionar a vantagem adicional de permitir a geração ou a introdução deliberada de ligações de dissulfeto não naturais em muteínas da divulgação, aumentando assim a

estabilidade das muteínas. No entanto, as muteínas de hTlc que se ligam ao CD137 e que possuem a ligação de dissulfeto formada entre Cis 61 e Cis 153 também fazem parte da presente divulgação.

[162] Em alguns exemplos de realização específicos, uma muteína de hTlc da divulgação pode incluir uma ou mais das substituições de aminoácidos Cys 61 → Ala, Phe, Lys, Arg, Thr, Asn, Gly, Gln, Asp, Asn, Leu, Tyr, Met, Ser, Pro ou Trp e/ou Cys 153 → Ser ou Ala, nas posições correspondentes às posições 61 e/ou 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[163] Em alguns exemplos de realização, dois ou todos os três códon de cisteína nas posições correspondentes às posições 61, 101 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1) são substituídos por um códon de outro amino ácido. Além disso, em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc de acordo com a divulgação inclui uma substituição de aminoácido de um resíduo de cisteína nativo na posição correspondente à posição 101 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1) por um resíduo de serina ou um resíduo de histidina.

[164] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de acordo com a divulgação compreende uma substituição de aminoácido de um aminoácido nativo por um resíduo de cisteína nas posições correspondentes às posições 28 ou 105 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Além disso, em alguns exemplos de realização, uma muteína de acordo com a divulgação compreende uma substituição de aminoácido de um resíduo de arginina nativo na posição correspondente à posição 111 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1) por um resíduo de prolina. Além disso, em alguns exemplos de realização, uma muteína de

acordo com a divulgação compreende uma substituição de aminoácido de um resíduo de lisina natural na posição correspondente à posição 114 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1) por um resíduo de triptofano ou um ácido glutâmico.

[165] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc de ligação ao CD137 fornecidas podem compreender em uma ou mais posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Ala 5 → Val ou Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg ou Asn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → Arg ou Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc da divulgação compreende dois ou mais, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, ou mais, ou mesmo todos os resíduos de aminoácidos mutados nestas posições da sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1).

[166] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hTlc de ligação ao CD137 podem compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência polipeptídica linear de hTlc madura (SEQ ID NO: 1):

(a) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser

58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(c) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu

56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser; e

(g) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser.

[167] Em alguns exemplos de realização, a região residual, ou seja, a região que difere das posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1), de uma muteína de hTlc da divulgação pode compreender a sequência de aminoácidos tipo selvagem (natural) da sequência polipeptídica linear de hTlc madura fora das posições da sequência de aminoácidos mutadas.

[168] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc da divulgação tem pelo menos 70% de identidade de sequência ou pelo menos 70% de homologia de sequência com a sequência de hTlc madura (SEQ ID NO: 1). Como um exemplo ilustrativo, a muteína de SEQ ID NO: 32 tem uma identidade de sequência de aminoácidos ou uma homologia de sequência de aproximadamente 84% com a sequência de aminoácidos da hTlc madura.

[169] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc da divulgação compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida em qualquer uma das SEQ ID NOs: 32-38 ou um fragmento ou variante destas sequências.

[170] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hTlc da divulgação tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou mais, de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32-38.

[171] A presente divulgação também inclui homólogos estruturais de uma muteína de hTlc possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 32-38, cujos homólogos estruturais possuem uma homologia ou identidade de sequência de aminoácidos maior que 60%, de preferência maior que 65%, maior que 70%, maior que 75%, maior que 80%, maior que 85%, maior que 90%, maior que 92% e mais preferencialmente maior que 95% em relação à referida muteína de hTlc.

[172] Em alguns aspectos, a presente divulgação fornece muteínas de hNGAL que se ligam ao CD137. A este respeito, a divulgação fornece uma ou mais muteínas de hNGAL que são capazes de se ligar ao CD137 com uma afinidade medida por uma K_D de cerca de 800 nM, 700 nM, 200 nM, 140 nM, 100 nM ou menos, de preferência cerca de 70 nM, 50 nM, 30 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM ou ainda menos. Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas são capazes de se ligar ao CD137 com um valor de EC_{50} de cerca de 1000 nM, 500 nM, 100 nM, 80 nM, 50 nM, 25 nM, 18 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM ou menos.

[173] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL que se ligam ao CD137 fornecidas podem ter reatividade cruzada com CD137 de macacos cinomolgos. Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas são capazes de se ligar ao CD137 de cinomolgos com uma afinidade medida por uma K_D de cerca de 50 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 2 nM ou

ainda menor. Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas são capazes de se ligar ao CD137 de cinomolgos com um valor de EC_{50} de cerca de 100 nM, 80 nM, 50 nM, 30 nM ou ainda menos.

[174] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação pode competir pela ligação ou interferir com a ligação de CD137L ao CD137. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação pode ser capaz de se ligar ao CD137 na presença de CD137L e/ou se ligar ao complexo CD137/CD137L.

[175] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em uma ou mais posições correspondentes às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[176] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, ou ainda mais, posições correspondentes à posição 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132, e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2). Em alguns exemplos de realização preferidos, as muteínas de hNGAL fornecidas são capazes de se ligar ao CD137, em particular ao CD137 humano.

[177] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em uma ou mais posições correspondentes às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 87, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2). Em alguns exemplos de realização preferidos, as muteínas de hNGAL fornecidas são capazes de se

ligar ao CD137, em particular ao CD137 humano.

[178] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL proporcionadas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em uma ou mais posições correspondentes às posições 36, 87, e 96 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2) e em uma ou mais posições correspondentes para as posições 28, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 94, 100, 103, 106, 125, 127, 132, e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[179] Em outros exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em uma ou mais posições correspondentes às posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[180] Em outros exemplos de realização, as muteínas de hNGAL fornecidas podem compreender um resíduo de aminoácido mutado em uma ou mais posições correspondentes às posições 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2) e em uma ou mais posições correspondentes às posições 20, 25, 33, 44, 59, 71, 78, 80, 82, 87, 92, 98, 101 e 122 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[181] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina de acordo com a presente divulgação pode compreender pelo menos uma substituição de aminoácido de um resíduo de cisteína nativo, por exemplo, por um resíduo de serina. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL de acordo com a divulgação pode compreender uma substituição de aminoácidos de um resíduo de cisteína nativo nas posições correspondentes às posições 76 e/ou 175 da sequência polipeptídica linear de hNGAL matura

(SEQ ID NO: 2) por outro aminoácido, tal como um resíduo de serina. Neste contexto, observou-se que a remoção da ligação de bissulfeto estrutural (no nível de uma respectiva biblioteca de ácido nucleico *naïve*) da hNGAL tipo selvagem que é formada pelos resíduos de cisteína 76 e 175 (consulte, (cf. Breustedt *et al.*, *J Biol Chem*, 2005) pode fornecer muteínas de hNGAL que não apenas são enoveladas de forma estável, como também são capazes de se ligar a um determinado alvo não natural com alta afinidade. Em alguns exemplos de realização, a eliminação da ligação de dissulfeto estrutural pode proporcionar a vantagem adicional de permitir a geração ou a introdução deliberada de ligações de dissulfeto não naturais em muteínas da divulgação, aumentando assim a estabilidade das muteínas. No entanto, as muteínas de hNGAL que se ligam ao CD137 e que possuem a ligação de dissulfeto formada entre Cis 76 e Cis 175 também fazem parte da presente divulgação.

[182] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL de ligação ao CD137 fornecidas podem compreender, em uma ou mais posições correspondentes às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2) um ou mais dos resíduos de aminoácidos mutados: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg ou Lys; Gln 49 → Val, Ile, His, Ser ou Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, Ala ou Gly; Leu 70 → Ala, Lys, Ser ou Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, Thr ou Asn; Trp 79 → Ala ou Asp; Arg 81 → Met, Trp ou Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu e Lys 134 → Tyr. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação compreende dois ou mais, como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, ou ainda mais, como 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, ou todos os resíduos de aminoácidos mutados nestas posições de sequência da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[183] Em outros exemplos de realização, as muteínas de hNGAL de ligação de CD137 fornecidas podem compreender em uma ou mais posições correspondentes às posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Gln 20 → Arg; Asn 25 → Tyr ou Asp; Gln 28 → His; Val 33 → Ile; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Val ou Asp; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser ou Gly; Lys 59 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln ou His; Tyr 78 → His; Trp 79 → Ile; Ile 80 → Asn; Arg 81 → Trp ou Gln; Thr 82 → Pro; Cys 87 → Ser; Phe 92 → Leu ou Ser; Asn 96 → Phe; Lys 98 → Arg; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → His ou Pro; Phe 122 → Tyr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly. Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação compreende dois ou mais, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34 aminoácidos mutados nestas posições da sequência da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2).

[184] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL de ligação ao CD137 podem compreender, em uma ou mais, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 posições correspondentes às posições 36, 40, 41, 49, 52, 68, 70, 72, 73, 77, 79, 81, 96, 100, 103, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser ou Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln ou His; Trp 79 →

Ile; Arg 81 → Trp ou Gln; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His ou Pro; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly. Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL de ligação ao CD137 fornecidas podem compreender ainda, em uma ou mais posições, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, posições correspondendo às posições 20, 25, 33, 44, 59, 71, 78, 80, 82, 87, 92, 98, 101, e 122 da sequência de polipeptídeos linear de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Gln 20 → Arg; Asn 25 → Tyr ou Asp; Val 33 → Ile; Glu 44 → Val ou Asp; Lys 59 → Asn; Phe 71 → Leu; Tyr 78 → His; Ile 80 → Asn; Thr 82 → Pro; Phe 92 → Leu ou Ser; Lys 98 → Arg; Pro 101 → Leu; e Phe 122 → Tyr.

[185] Em alguns exemplos de realização, as muteínas de hNGAL de ligação ao CD137 fornecidas podem compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência de polipeptídeos linear de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2):

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg

72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103

→ His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr; ou

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr.

[186] Em alguns exemplos de realização adicionais, na região residual, ou seja, a região que difere das posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), uma muteína de hNGAL da divulgação pode incluir a sequência de aminoácidos tipo selvagem (natural) da hNGAL madura fora das posições da sequência de aminoácidos mutada.

[187] Em outros exemplos de realização, as muteínas de hNGAL de ligação ao CD137 fornecidas podem compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência de polipeptídeos linear de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2):

(a) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(b) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Lys 98 → Arg; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(c) Asn 25 → Tyr; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Gln; Phe 92 → Ser; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(d) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Tyr 78 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(e) Asn 25 → Asp; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(f) Val 33 → Ile; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(g) Gln 20 → Arg; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Val; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Phe 122 → Tyr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(h) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp

77 → Gln; Trp 79 → Ile; Ile 80 → Asn; Arg 81 → Trp; Thr 82 → Pro; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → Pro; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(i) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Lys 59 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly; e

(j) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Asp; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly.

[188] Em alguns exemplos de realização, a muteína de hNGAL de ligação ao CD137 fornecida pode compreender o seguinte conjunto de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência de polipeptídeos linear de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr e/ou a muteína fornecida pode ter pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou mais de identidade de sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 40.

[189] Em alguns exemplos de realização adicionais, na região residual, ou seja, a região que difere das posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 e

134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), de uma muteína de hNGAL da divulgação pode incluir a sequência de aminoácidos tipo selvagem (natural) da hNGAL madura fora das posições da sequência de aminoácidos mutada.

[190] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação tem pelo menos 70% de identidade de sequência ou pelo menos 70% de homologia de sequência com a sequência de hNGAL madura (SEQ ID NO: 2). Como um exemplo ilustrativo, a muteína de SEQ ID NO: 40 tem uma identidade de sequência de aminoácidos ou uma homologia de sequência de aproximadamente 87% com a sequência de aminoácidos da hNGAL madura.

[191] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação compreende uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida em qualquer uma das SEQ ID NOs: 39-57 ou um fragmento ou variante destas sequências.

[192] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de hNGAL da divulgação tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou mais, de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 39-57.

[193] A presente divulgação também inclui homólogos estruturais de uma muteína de hNGAL possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOs: 39-57, cujos homólogos estruturais possuem uma homologia ou identidade de sequência de aminoácidos maior que 60%, de preferência maior que 65%, maior que 70%, maior que 75%, maior que 80%, maior que 85%, maior que 90%, maior que 92% e mais preferencialmente maior que 95% em relação à referida muteína

de hNGAL.

[194] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação fornece uma muteína de lipocalina que se liga ao CD137 com uma afinidade medida por uma K_D de cerca de 5 nM ou menos, em que a muteína de lipocalina tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, em pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

[195] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação fornece uma muteína de lipocalina que se liga ao CD137 com uma afinidade medida por uma K_D de cerca de 5 nM ou menos, em que a muteína de lipocalina tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, em pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[196] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da presente divulgação pode compreender uma sequência de aminoácidos heteróloga em sua extremidade N- ou C-terminal, de preferência na extremidade C-terminal, tal como um marcador *Strep II tag* (SEQ ID NO: 12) ou uma sequência de sítio de clivagem para determinadas enzimas de restrição, sem afetar a atividade biológica (ligação ao seu alvo, por exemplo, ao CD137) da muteína da lipocalina.

[197] Em alguns exemplos de realização, modificações adicionais de uma muteína de lipocalina podem ser introduzidas a fim de modular certas características da muteína, tais como melhorar a estabilidade de enovelamento/dobramento, estabilidade no soro, resistência de proteína ou solubilidade em água ou para reduzir a tendência de agregação, ou para introduzir novas características para a muteína. Em alguns exemplos de realização, a(s) modificação(ões) pode(m) resultar em duas ou mais (por

exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) características de um muteína fornecida sendo modulada.

[198] Por exemplo, é possível mutar uma ou mais posições de sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina para introduzir novos grupos reativos, por exemplo, para a conjugação com outros compostos, tais como polietileno glicol (PEG), hidroxietil amido (HES), biotina, peptídeos ou proteínas, ou para a formação de ligações de bissulfeto que não ocorrem naturalmente. O composto conjugado, por exemplo, PEG e HES, pode, em alguns casos, aumentar a meia-vida sérica da muteína de lipocalina correspondente.

[199] Em alguns exemplos de realização, um grupo reativo de uma muteína de lipocalina pode ocorrer naturalmente em sua sequência de aminoácidos, tal como resíduos de cisteína de ocorrência natural na referida sequência de aminoácidos. Em outros exemplos de realização, esse grupo reativo pode ser introduzido por meio de mutagênese. No caso de um grupo reativo é introduzido através de mutagênese, uma possibilidade é a mutação de um amino ácido na posição adequada por um resíduo de cisteína. As possibilidades exemplificativas de tal mutação para introduzir um resíduo de cisteína na sequência de aminoácidos de uma muteína de hTlc incluem as substituições Tre 40 → Cis, Glu 73 → Cis, Arg 90 → Cis, Asp 95 → Cis e Glu 131 → Cis da sequência da hTlc tipo selvagem (SEQ ID NO: 1). Possibilidades exemplares de tal mutação para introduzir um resíduo de cisteína na sequência de aminoácidos de uma muteína de hNGAL incluem a introdução de um resíduo de cisteína em uma ou mais das posições de sequência que correspondem às posições de sequência 14, 21, 60, 84, 88, 116, 141, 145, 143, 146 ou 158 da sequência da hNGAL tipo selvagem (SEQ ID NO: 2). A fração tiol gerada pode ser utilizada para PEGilato ou HESilato da muteína, por

exemplo, de modo a aumentar a meia-vida sérica de uma respectiva muteína de lipocalina.

[200] Em alguns exemplos de realização, com o intuito de proporcionar cadeias laterais de aminoácidos adequadas como novos grupos reativos para a conjugação de um dos compostos acima a uma muteína de lipocalina, aminoácidos artificiais podem ser introduzidos na sequência de aminoácidos de uma muteína de lipocalina. Em geral, tais aminoácidos artificiais são projetados para serem mais reativos e desse modo facilitar a conjugação ao composto desejado. Esses aminoácidos artificiais podem ser introduzidos por mutagênese, por exemplo, usando um tRNA artificial para-acetil-fenilalanina.

[201] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da divulgação é fundida em sua extremidade N-terminal ou C-terminal a uma proteína, um domínio proteico ou um peptídeo, por exemplo, um anticorpo, uma sequência sinal e/ou um marcador de afinidade (*tag*). Em outros exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da divulgação é conjugada em sua extremidade N-terminal ou C-terminal a um parceiro, que é uma proteína, um domínio proteico ou um peptídeo, por exemplo, um anticorpo, uma sequência sinal e/ou um marcador de afinidade (*tag*).

[202] Marcadores (*tags*) de afinidade tais como Strep-*tag* ou Strep-*tag* II (Schmidt *et al.*, *J Mol Biol*, 1996), o FLAG-*tag*, His-*tag* ou HA-*tag* ou proteínas como a glutationa-S-transferase que também permitem a fácil detecção e/ou purificação de proteínas recombinantes são outros exemplos de parceiros de fusão adequados. As proteínas com propriedades cromogênicas ou fluorescentes, como a proteína verde fluorescente (GFP) ou a proteína fluorescente amarela (YFP), também são parceiros de fusão adequados para muteínas de lipocalina da divulgação. Em geral, é possível marcar as muteínas

de lipocalina da divulgação com qualquer substância ou enzima química adequada, que gera, direta ou indiretamente, um composto ou sinal detectável em uma reação química, física, óptica ou enzimática. Por exemplo, um marcador fluorescente ou radioativo pode ser conjugado a uma muteína de lipocalina para gerar fluorescência ou raios-x como sinal detectável. A fosfatase alcalina, a peroxidase de rábano e a β -galactosidase são exemplos de rótulos enzimáticos (e ao mesmo tempo marcadores ópticos) que catalisam a formação de produtos da reação cromogênica. Em geral, todos os marcadores comumente usados para anticorpos (exceto os usados exclusivamente com a porção de açúcar na porção Fc de imunoglobulinas) também podem ser usados para a conjugação das muteínas de lipocalina da divulgação.

[203] Em alguns exemplos de realização, uma muteína de lipocalina da divulgação pode ser fundida ou conjugada a uma porção que prolonga a meia-vida sérica da muteína (a este respeito, vide também a publicação PCT WO 2006/56464, onde tais estratégias de conjugação são descritas com referências a muteínas de lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) com afinidade de ligação para CTLA-4). A porção que prolonga a meia-vida sérica pode ser uma molécula PEG, molécula HES, moléculas de ácidos graxos, tal como o ácido palmítico (Vajo e Duckworth, *Pharmacol Rev*, 2000), uma porção Fc de uma imunoglobulina, um domínio C_{H3} de uma imunoglobulina, um domínio C_{H4} de uma imunoglobulina, um peptídeo de ligação a albumina ou uma proteína de ligação a albumina, ou uma transferrina para citar apenas algumas.

[204] Em alguns exemplos de realização, se PEG for usado como um parceiro de conjugação, a molécula de PEG pode ser substituída, não substituída, linear ou ramificada. Também pode ser um derivado de polietileno ativado. Exemplos de compostos adequados são moléculas de

polietilenoglicol (PEG) tal como descrito na publicação internacional WO 1999/64016, Patente US 6.177.074 ou Patente US 6.403.564 em relação ao interferon, ou tal como descrito para outras proteínas como asparaginase modificada com PEG, PEG-adenosina desaminase (PEG-ADA) ou PEG-superóxido dismutase (Fuertges e Abuchowski, *Journal of Controlled Release*, 1990). O peso molecular de tal polímero, como polietileno glicol, pode variar entre cerca de 300 e cerca de 70.000 daltons, incluindo, por exemplo, polietileno glicol com um peso molecular de cerca de 10.000, de cerca de 20.000, de cerca de 30.000 ou de cerca de 40.000 daltons. Além disso, tal como descrito nas patentes US 6.500.930 ou US 6.620.413, oligômeros e polímeros de carboidratos, tal como HES, podem ser conjugados com uma muteína da presente divulgação com o propósito de aumentar a meia-vida no soro.

[205] Em alguns exemplos de realização, se uma porção Fc de uma imunoglobulina for utilizada com o propósito de prolongar a meia-vida sérica das muteínas de lipocalina da divulgação, pode ser utilizada a tecnologia SynFusion™, comercialmente disponível pela Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA, EUA). O uso desta tecnologia *Fc-fusion* permite a criação de biofarmacêuticos de ação prolongada e pode, por exemplo, consistir em duas cópias da muteína ligada à região Fc de um anticorpo para melhorar a farmacocinética, solubilidade e eficiência de produção.

[206] Exemplos de peptídeos de ligação à albumina que podem ser utilizados para estender a meia-vida de uma muteína de lipocalina são, por exemplo, aqueles possuindo uma sequência de consenso Cis-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cis, em que Xaa₁ é Asp, Asn, Ser, Thr, ou Trp; Xaa₂ é Asn, Gln, His, Ile, Leu, ou Lys; Xaa₃ é Ala, Asp, Phe, Trp, ou Tyr; e Xaa₄ é Asp, Gly, Leu, Phe, Ser, ou Thr; tal como descrito na publicação de patente US 20030069395 ou em

Dennis *et al.* (2002)..A proteína de ligação à albumina fundida ou conjugada a uma muteína de lipocalina para estender a meia-vida sérica pode ser uma proteína de ligação à albumina bacteriana, um anticorpo, um fragmento de anticorpo incluindo anticorpos de domínio (consulte a patente US 6.696.245, por exemplo), ou um muteína de lipocalina com atividade de ligação para albumina. Exemplos de proteínas de ligação à albumina bacteriana incluem proteína G estreptocócica (Konig e Skerra, *J Immunol Methods*, 1998).

[207] Em alguns exemplos de realização, se a proteína de ligação à albumina é um fragmento de anticorpo, ele pode ser um anticorpo de domínio. Os anticorpos de domínio (dAbs) são projetados para permitir um controle preciso das propriedades biofísicas e da meia-vida *in vivo* para criar o melhor perfil de segurança e eficácia do produto. Os anticorpos de domínio estão comercialmente disponíveis, por exemplo, pela Domantis Ltd. (Cambridge, Reino Unido e MA, EUA).

[208] Em alguns exemplos de realização, a própria albumina (Osborn *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther*, 2002) ou um fragmento biologicamente ativo da albumina pode ser usado como parceiro de uma muteína de lipocalina da presente divulgação para estender a meia-vida sérica. O termo “albumina” inclui todas as albuminas, tal como albumina de soro humano ou albumina de soro bovino ou albumina de soro de rato. A albumina ou seu fragmento pode ser produzido de forma recombinante conforme descrito na Patente US 5.728.553 ou nos pedidos de patente publicados EP 0330451 e EP 0361991. Consequentemente, a albumina humana recombinante (por exemplo, Recombumin[®] da Novozymes Delta Ltd., Nottingham, Reino Unido) pode ser conjugada ou fundida a uma muteína de lipocalina da presente divulgação.

[209] Em alguns exemplos de realização, se uma transferrina é utilizada como uma porção para prolongar a meia-vida sérica das muteínas de

lipocalina da presente divulgação, as muteínas podem ser geneticamente fundidas à porção N-terminal ou C-terminal, ou ambas, da transferrina não glicosilada. A transferrina não glicosilada tem uma meia-vida de 14 a 17 dias, e uma proteína de fusão com transferrina terá igualmente uma meia-vida prolongada. O transportador transferrina também fornece alta biodisponibilidade, biodistribuição e estabilidade na circulação. Esta tecnologia está comercialmente disponível pela BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation, PA, EUA). A transferrina humana recombinante (DeltaFerrin™) para uso como proteína estabilizadora/parceiro de extensão de meia-vida também está comercialmente disponível pela Novozymes Delta Ltd. (Nottingham, Reino Unido).

[210] Alternativamente, para prolongar a meia-vida das muteínas da lipocalina da divulgação é possível fundir à porção N-terminal ou C-terminal de uma muteína longa, sequências ricas em glicina, não estruturadas e flexíveis (por exemplo, poliglicina com cerca de 20 a 80 resíduos de glicina consecutivos). Esta abordagem descrita na Publicação PCT WO2007/038619, por exemplo, também foi denominada de “rPEG” (PEG recombinante).

E. USOS EXEMPLARES E APLICAÇÕES DE PROTEÍNAS DE FUSÃO ESPECÍFICAS PARA CD137 E GPC3

[211] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem produzir efeito sinérgico através do duplo direcionamento para CD137 e GPC3. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem produzir efeito antitumoral localizado por meio de duplo direcionamento de CD137 e GPC3. Portanto, há no campo médico diversas aplicações possíveis para as proteínas de fusão da presente divulgação.

[212] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação

abrange o uso de uma ou mais proteínas de fusão divulgada na presente invenção ou de uma ou mais composições compreendendo tais proteínas de fusão para ligação simultânea de CD137 e GPC3.

[213] A presente divulgação também envolve o uso de um ou mais proteínas de fusão descritas no presente para a formação de complexo com CD137 e GPC3.

[214] Portanto, em um aspecto da divulgação, as proteínas de fusão fornecidas podem ser usadas para a detecção de CD137 e GPC3. Tal utilização pode incluir as etapas de entrar em contato com uma ou mais das proteínas de fusão, em condições adequadas, com uma amostra suspeita de conter CD137 e/ou GPC3, permitindo assim a formação de um complexo entre as proteínas de fusão e CD137 e/ou GPC3, e detectando o complexo por meio de um sinal adequado. O sinal detectável pode ser causado por um marcador, tal como explicado acima, ou por uma alteração das propriedades físicas devido à ligação, ou seja, a própria formação do complexo. Um exemplo é a ressonância plasmônica de superfície, cujo valor é alterado durante a ligação com parceiros de ligação a partir do qual um é imobilizado em uma superfície, tal como uma folha de ouro.

[215] As proteínas de fusão da divulgação também podem ser utilizadas para a separação de CD137 e/ou GPC3. Tal utilização pode incluir as etapas de entrar em contato com uma ou mais das proteínas de fusão, em condições adequadas, com uma amostra com suspeita de conter CD137 e GPC3, permitindo assim a formação de um complexo entre as proteínas de fusão e CD137 e/ou GPC3, e separando o complexo a partir da amostra.

[216] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação fornece kits diagnósticos e/ou analíticos que compreendem uma ou mais proteínas de fusão de acordo com a divulgação.

[217] Além do uso diagnóstico, em outro aspecto, a divulgação contempla composições farmacêuticas compreendendo uma ou mais proteínas de fusão da divulgação e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[218] Além disso, em alguns exemplos de realização, a presente divulgação provê proteínas de fusão que se ligam simultaneamente ao CD137 e/ou GPC3 para uso como um agente antitumoral e/ou anti-infecção, e como moduladores imunes. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da presente divulgação são consideradas para serem usadas em um método de prevenção, melhora ou tratamento de doenças humanas, como uma variedade de cânceres, incluindo cânceres GPC3- positivos, como carcinoma hepatocelular (HCC), melanoma, carcinoma de células de Merkel, tumor de Wilm e hepatoblastoma. Consequentemente, também são fornecidos métodos de prevenção, melhora ou tratamento de doenças humanas, como uma variedade de cânceres, incluindo câncer GPC3-positivo, como carcinoma hepatocelular (HCC), melanoma, carcinoma de células de Merkel, em um sujeito com tal necessidade, compreendendo administrar ao referido sujeito uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma ou mais proteínas de fusão da divulgação.

[219] Outros exemplos de cânceres que podem ser tratados usando as proteínas de fusão da divulgação incluem câncer de fígado, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer de pulmão, melanoma maligno cutâneo ou intraocular, câncer renal, câncer uterino, câncer de ovário, câncer colorretal, câncer de cólon, câncer retal, câncer da região anal, câncer de estômago, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma das trompas de falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma vaginal, carcinoma da vulva, linfoma não-Hodgkin, câncer de esôfago, câncer de intestino delgado,

câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireoide, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma do músculo tecido, câncer de uretra, câncer de pênis, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, câncer de bexiga, câncer de rim ou ureter, carcinoma de pelve renal, neoplasias no sistema nervoso central (SNC), linfoma primário do SNC, angiogênese tumoral, tumor do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, adenoma hipofisário, sarcoma de Kaposi, câncer epidermoide, câncer de células escamosas, cânceres induzidos pelo ambiente, incluindo aqueles induzidos por amianto, malignidades hematológicas incluindo, por exemplo, mieloma múltiplo, linfoma de células B, linfoma de Hodgkin/linfoma de células B mediastinal primário, linfomas não-Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mieloide crônica, leucemia linfóide crônica, linfoma folicular, linfoma de células B difusas grandes, linfoma de Burkitt de grandes células, linfoma imunoblástico, linfoma linfoblástico de células B precursoras, linfoma de células do manto, leucemia linfoblástica aguda, micose fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células T e linfoma linfoblástico de células T precursoras e quaisquer combinações dos referidos cânceres. Em alguns exemplos de realização, a presente invenção também é aplicável ao tratamento de cânceres metastáticos.

[220] Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem visar simultaneamente células tumorais onde a GPC3 é expressa, tal como HCC, melanoma, carcinoma de células de Merkel, tumor de Wilm e hepatoblastoma, e ativar linfócitos do sistema imune do hospedeiro adjacente a tais células tumorais. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem aumentar a atividade de células T antitumorais direcionadas, aumentar a imunidade antitumoral, induzir a citólise mediada por células T e/ou ter um

efeito inibidor direto sobre o crescimento tumoral, produzindo assim resultados antitumorais. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem ativar respostas imunes em um microambiente tumoral. Em alguns exemplos de realização, as proteínas de fusão da divulgação podem reduzir os efeitos colaterais de linfócitos efetores em relação às células saudáveis, ou seja, toxicidade fora do alvo, por exemplo, pela inibição local da atividade de oncogenes e indução da citotoxicidade mediada por células NK e/ou células T.

[221] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação abrange o uso de uma proteína de fusão da divulgação, ou uma composição compreendendo uma proteína de fusão fornecida, para induzir uma resposta de linfócitos localizada na vizinhança de células tumorais positivas para GPC3, tais como HCC, melanoma, Carcinoma de células de Merkel, tumor de Wilm e hepatoblastoma. Consequentemente, em alguns exemplos de realização, a presente divulgação provê um método de induzir uma resposta de linfócitos localizada na vizinhança de células tumorais GPC3-positivas, tal como no carcinoma hepatocelular, melanoma, carcinoma de células de Merkel, tumor de Wilm, e hepatoblastoma, compreendendo a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão da presente divulgação ou de uma ou mais composições compreendendo tais proteínas de fusão. “Localizada” significa que após a ligação simultânea de células T via CD137 e envolvendo células tumorais GPC3-positivas, as células T produzem citocinas, particularmente IL-2 e/ou IFN-gama na vizinhança de células GPC3-positivas. Tais citocinas refletem a ativação de células T que podem então ser capazes de matar células tumorais GPC3-positivas, direta ou indiretamente pela ativação de outras células assassinas, tais como células T ou células NK.

[222] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação abrange o uso de uma proteína de fusão da divulgação, ou uma composição compreendendo tal proteína de fusão, para coestimular células T e/ou ativar vias de sinalização a jusante de CD137. Preferencialmente, uma proteína de fusão fornecida coestimula as células T e/ou ativa as vias de sinalização a jusante de CD137 quando envolve células tumorais onde GPC3 é expressa. Consequentemente, a presente divulgação provê métodos de indução da proliferação de linfócitos T e/ou ativação de vias de sinalização a jusante de CD137, de preferência quando envolvendo células tumorais onde GPC3 é expressa, como no HCC, melanoma, carcinoma de células Merkel, tumor de Wilm e hepatoblastoma, compreendendo a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão da presente divulgação e/ou uma ou mais composições compreendendo tais proteínas de fusão.

[223] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação abrange o uso de uma proteína de fusão da presente divulgação, ou uma composição compreendendo essa proteína de fusão, para induzir o agrupamento e ativação de CD137 em células T e direcionar tais células T para células tumorais onde a GPC3 é expressa, tal como no HCC, melanoma, carcinoma de células de Merkel, tumor de Wilm e hepatoblastoma.

[224] Objetos, vantagens e características adicionais desta divulgação tornar-se-ão evidentes para os especialistas na técnica após o exame dos seguintes Exemplos e Figuras anexas, que não se destinam a limitar a presente divulgação. Assim, deve ser compreendido que, embora a presente divulgação seja especificamente descrita utilizando exemplos de realização preferidos e características opcionais, a modificação e a variação das divulgações aqui incorporadas podem ser reordenadas pelos

especialistas na técnica e tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo da presente divulgação.

F. PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO EXEMPLARES ESPECÍFICAS PARA CD137 E GPC3 FORNECIDAS

[225] Em alguns exemplos de realização, a presente divulgação provê moléculas de ácido nucleico (DNA e RNA) que incluem sequências nucleotídicas que codificam as proteínas de fusão fornecidas. Em alguns exemplos de realização, a presente invenção engloba uma célula hospedeira contendo a molécula de ácido nucleico fornecida. Uma vez que a degenerescência do código genético permite substituições de certos códons por outros códons que especificam o mesmo aminoácido, a divulgação não está limitada a uma molécula de ácido nucleico específica que codifica uma proteína de fusão descrita na presente invenção, mas abrange todas as moléculas de ácido nucleico que incluem sequências de nucleotídeos que codificam uma proteína de fusão funcional. A este respeito, a presente divulgação também se refere às sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas de fusão fornecidas na presente divulgação.

[226] Uma molécula de ácido nucleico, tal como DNA, é referida como “capaz de expressar uma molécula de ácido nucleico” ou capaz de “permitir a expressão de uma sequência de nucleotídeos” se incluir elementos de sequência que contenham informações relativas à regulação transcricional e/ou traducional, e tais sequências estão “operacionalmente ligadas” à sequência de nucleotídeos que codifica a proteína. Uma ligação operável é uma ligação em que os elementos da sequência reguladora e a sequência a ser expressa estão conectados de forma a permitir a expressão gênica. A natureza precisa das regiões reguladoras necessárias para a expressão gênica pode variar entre as espécies, mas, em geral, essas regiões incluem um

promotor que, nos procariontes, contém tanto o promotor *per se*, ou seja, elementos de DNA que direcionam o início da transcrição, bem como elementos de DNA que, quando transcritos em RNA, sinalizarão o início da tradução. Tais regiões promotoras normalmente incluem sequências 5' não codificantes envolvidas no início da transcrição e tradução, tais como as caixas -35/-10 e o elemento Shine-Dalgarno em procariontes ou caixa TATA (TATA *box*), sequências CAAT e elementos *capping-5'* em eucariotas. Estas regiões também podem incluir elementos acentuadores (*enhancers*) ou repressores, bem como sequências de sinal e líderes traduzidos para direcionar a proteína nativa para um compartimento específico de uma célula hospedeira.

[227] Além disso, as sequências 3' não codificantes podem conter elementos reguladores envolvidos na terminação transcricional, poliadenilação ou similares. Entretanto, se essas sequências de terminação não são satisfatoriamente funcionais em uma determinada célula hospedeira, então elas podem ser substituídas por sinais funcionais nessa célula.

[228] Portanto, uma molécula de ácido nucleico da divulgação pode ser “operacionalmente ligada” a uma ou mais sequências regulatórias, como uma sequência promotora, para permitir a expressão desta molécula de ácido nucleico. Em alguns exemplos de realização, uma molécula de ácido nucleico da divulgação inclui uma sequência promotora e uma sequência terminadora da transcrição. Os promotores procarióticos adequados são, por exemplo, o promotor *tet*, o promotor *lacUV5* ou o promotor T7. Exemplos de promotores úteis para expressão em células eucarióticas são o promotor SV40 ou promotor CMV.

[229] Em alguns exemplos de realização, uma molécula de ácido nucleico codificante de uma muteína de lipocalina pode estar “operacionalmente ligada” a outra molécula de ácido nucleico que codifica uma

imunoglobulina da divulgação para permitir a expressão de uma proteína de fusão divulgada no presente.

[230] Em alguns exemplos de realização, os métodos fornecidos podem incluir a submissão de pelo menos uma molécula de ácido nucleico codificante de hTlc madura à mutagênese em tripletos de nucleotídeos que codificam uma ou mais posições que correspondem às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc (SEQ ID NO: 1), para obter muteínas de lipocalina como incluídas nas proteínas de fusão fornecidas. Em alguns exemplos de realização, os métodos fornecidos podem incluir a submissão de pelo menos uma molécula de ácido nucleico codificante de hNGAL madura à mutagênese em tripletos de nucleotídeos que codificam uma ou mais posições que correspondem às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL (SEQ ID NO: 2), para obter muteínas de lipocalina como incluídas nas proteínas de fusão fornecidas. Em alguns exemplos de realização, um método fornecido pode incluir a submissão de pelo menos uma molécula de ácido nucleico codificante de hNGAL madura à mutagênese em tripletos de nucleotídeos que codificam uma ou mais posições que correspondem às posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL (SEQ ID NO: 2), para obter muteínas de lipocalina como incluídas nas proteínas de fusão fornecidas.

[231] Além disso, no que diz respeito às muteínas de hTlc ou muteínas de hNGAL da divulgação, como incluídas nas proteínas de fusão, em alguns exemplos de realização, a ligação de dissulfeto de ocorrência natural entre Cys 61 e Cys 153 ou Cys 76 e Cys 175, respectivamente, pode ser

removida. Conseqüentemente, tais muteínas podem ser produzidas em um compartimento celular com um meio *redox* redutor, por exemplo, no citoplasma de bactérias Gram-negativas.

[232] No que diz respeito ainda às muteínas de hTlc fornecidas ou muteínas de hNGAL da divulgação, quando incluídas nas proteínas de fusão, a divulgação também inclui moléculas de ácido nucleico que codificam tais muteínas que, em alguns exemplos de realização, podem incluir uma ou mais mutações adicionais fora das posições de sequência indicadas de mutagênese experimental. Tais mutações são frequentemente toleradas ou podem até revelarem-se vantajosas, por exemplo, se elas contribuem para uma eficiência de enovelamento melhorada, estabilidade no soro, estabilidade térmica ou afinidade de ligação ao ligante das muteínas de lipocalina e/ou proteínas de fusão.

[233] Em alguns exemplos de realização, as moléculas de ácido nucleico fornecidas também podem ser parte de um vetor ou qualquer outro tipo de veículo de clonagem, tal como um plasmídeo, um fagomídeo, um fago, um baculovírus, um cosmídeo ou cromossomo artificial.

[234] Em alguns exemplos de realização, uma molécula de ácido nucleico fornecida pode estar incluída em um fagomídeo. Como usado neste contexto, um vetor fagomídeo designa um vetor que codifica a região intergênica de um fago temperante, tal como M13 ou f1, ou uma parte funcional dele fundida com o cDNA de interesse. Por exemplo, em alguns exemplos de realização, são produzidas partículas de fago intactas após a superinfecção de células hospedeiras bacterianas com tal vetor fagomídeo fornecido e um fago auxiliar apropriado (por exemplo, M13K07, VCS-M13 ou R408), permitindo assim o acoplamento físico do cDNA heterólogo codificado ao seu polipeptídeo correspondente apresentado na superfície do fago (Lowman, *Annu Rev*

Biophys Biomol Struct, 1997, Rodi e Makowski, *Curr Opin Biotechnol*, 1999).

[235] De acordo com diversos exemplos de realização, os veículos de clonagem podem incluir, além das sequências reguladoras descritas acima e uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão descrita na presente invenção, as sequências de replicação e de controle derivadas de uma espécie compatível com a célula hospedeira que é utilizada para a expressão bem como os marcadores de seleção conferindo um fenótipo selecionável nas células transformadas ou transfectadas. Um grande número de vetores de clonagem adequados é conhecido no estado da técnica e está comercialmente disponível.

[236] A presente divulgação refere-se também, em alguns exemplos de realização, a métodos para produzir proteínas de fusão da presente divulgação a partir de um ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão ou quaisquer subunidades da mesma utilizando métodos de engenharia genética. Em alguns exemplos de realização, um método fornecido pode ser realizado *in vivo*, em que uma proteína de fusão fornecida pode, por exemplo, ser produzida em um organismo hospedeiro bacteriano ou eucariótico e, em seguida, isolada a partir deste organismo hospedeiro ou de sua cultura. Também é possível produzir uma proteína de fusão da divulgação de maneira *in vitro*, por exemplo, utilizando um sistema de tradução *in vitro*.

[237] Ao produzir uma proteína de fusão *in vivo*, um ácido nucleico que codifica tal proteína de fusão pode ser introduzido em um organismo hospedeiro bacteriano ou eucariótico adequado usando tecnologia de DNA recombinante bem conhecida no estado da técnica. Em alguns exemplos de realização, uma molécula de DNA que codifica uma proteína de fusão descrita na presente invenção, em particular, um vetor de clonagem contendo a sequência codificante de tal proteína de fusão, pode ser

transformada em uma célula hospedeira capaz de expressar o gene. A transformação pode ser realizada usando técnicas padrão. Assim, a presente divulgação também diz respeito às células hospedeiras contendo uma molécula de ácido nucleico aqui divulgada.

[238] Em alguns exemplos de realização, as células hospedeiras transformadas podem ser cultivadas em condições adequadas para a expressão da sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína de fusão da divulgação. Em alguns exemplos de realização, as células hospedeiras adequadas podem ser células procarióticas, tais como *Escherichia coli* (*E. coli*) ou *Bacillus subtilis*, ou eucariotas, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, ou células de inseto SF9 ou High5, linhagens de células de mamífero imortalizadas (por exemplo, células HeLa ou células CHO) ou células primárias de mamíferos.

[239] Em alguns exemplos de realização, quando uma muteína de lipocalina da divulgação, tal como uma incluída em uma proteína de fusão da divulgação, incluir ligações de dissulfeto intramoleculares, pode ser preferido direcionar a proteína nascente para um compartimento celular que possui um meio *redox* oxidante pelo uso de uma sequência sinal apropriada. Tal ambiente oxidante pode ser proporcionado pelo periplasma de bactérias Gram-negativas, como da *E. coli*, no meio extracelular de bactérias Gram-positivas ou no lúmen do retículo endoplasmático de células eucarióticas e geralmente favorece a formação de ligações de bissulfeto estruturais.

[240] Em alguns exemplos de realização, também é possível produzir uma proteína de fusão da divulgação no citosol de uma célula hospedeira, de preferência *E. coli*. Neste caso, a proteína de fusão fornecida pode ser obtida diretamente em um estado solúvel e enovelado ou pode ser recuperada na forma de corpos de inclusão, seguido pela renaturação *in vitro*.

Outra opção é o uso de cepas hospedeiras específicas com um meio intracelular oxidante, que pode permitir assim a formação de ligações de dissulfeto no citosol (Venturi *et al.*, *J Mol Biol*, 2002).

[241] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da presente divulgação tal como descrito na presente invenção pode não ser necessariamente gerada ou produzida, totalmente ou em parte, pelo uso da engenharia genética. Em vez disso, essa proteína também pode ser obtida por qualquer uma dentre as diversas técnicas convencionais e bem conhecidas no estado da técnica, como estratégias de síntese orgânica simples, técnicas de síntese assistida por fase sólida, sintetizadores automatizados comercialmente disponíveis ou por transcrição e tradução *in vitro*. É, por exemplo, possível que proteínas de fusão promissoras ou muteínas de lipocalina incluídas em tais proteínas de fusão sejam identificadas usando modelagem molecular, sintetizadas *in vitro* e investigadas quanto à atividade de ligação para o(s) alvo(s) de interesse. Os métodos para a síntese em fase sólida e/ou em fase de solução de proteínas são bem conhecidos no estado da técnica (consulte, por exemplo, Bruckdorfer *et al.*, *Curr Pharm Biotechnol*, 2004).

[242] Em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão da divulgação pode ser produzida pela transcrição/tradução *in vitro* empregando métodos bem estabelecidos e conhecidos pelos especialistas na técnica.

[243] Em alguns exemplos de realização adicionais, as proteínas de fusão, como descritas na presente invenção, também podem ser preparadas por técnicas recombinantes convencionais sozinhas ou em combinação com técnicas sintéticas convencionais.

[244] Além disso, em alguns exemplos de realização, uma proteína de fusão de acordo com a presente divulgação pode ser obtida pela

conjugação de subunidades individuais, por exemplo, imunoglobulinas e muteínas, tais como àquelas incluídas na proteína de fusão. Tal conjugação pode ser, por exemplo, alcançada através de todas as formas de ligação, covalentes ou não covalentes, usando métodos convencionais.

[245] O técnico hábil reconhecerá os métodos úteis para preparar proteínas de fusão contempladas pela presente divulgação, mas cujas sequências de proteína ou ácido nucleico não são explicitamente divulgadas no presente. Como síntese, tais modificações da sequência de aminoácidos incluem, por exemplo, a mutagênese direcionada de posições de aminoácidos únicas para simplificar a subclonagem do gene da proteína ou de suas partes incorporando sítios de clivagem para determinadas enzimas de restrição. Além disso, essas mutações podem ser incorporadas para melhorar ainda mais a afinidade de uma proteína de fusão aos seus alvos (por exemplo, CD137 e GPC3). Além disso, podem ser introduzidas mutações para modular uma ou mais características da proteína de modo a melhorar a estabilidade de enovelamento, a estabilidade sérica, a resistência das proteínas ou solubilidade na água ou, se necessário, reduzir a tendência de agregação.

[246] A invenção pode ser adicionalmente caracterizada pelos seguintes itens.

[247] Item 1. Uma proteína de fusão capaz de se ligar ao CD137 e GPC3, caracterizada por compreender pelo menos duas subunidades em qualquer ordem, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno desta e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137.

[248] Item 2. Uma proteína de fusão, caracterizada pela proteína de fusão compreender pelo menos duas subunidades, em que uma primeira

subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada pelo N-terminal ao C-terminal de cada cadeia pesada da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[249] Item 3. Uma proteína de fusão, caracterizada pela proteína de fusão compreender pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada pelo C-terminal ao N-terminal de cada cadeia pesada da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[250] Item 4. Uma proteína de fusão, caracterizada pela proteína de fusão compreender pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada pelo N-terminal ao C-terminal de cada cadeia leve da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[251] Item 5. Uma proteína de fusão, caracterizada pela proteína de fusão compreender pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é

específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada pelo C-terminal ao N-terminal de cada cadeia leve da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

[252] Item 6. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 5, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor K_D de no máximo cerca de 1 nM ou comparável ou menor do que o valor K_D da imunoglobulina (ou o domínio de ligação ao antígeno da mesma) que está incluída na primeira subunidade sozinha.

[253] Item 7. A proteína de fusão do item 6, caracterizada pelo valor K_D ser determinado em um ensaio de ressonância plasmônica de superfície (SPR).

[254] Item 8. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 7, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor de EC_{50} de, no máximo, cerca de 1 nM ou comparável ou menor do que o valor de EC_{50} da imunoglobulina, ou o domínio de ligação ao antígeno da mesma, que está incluída na primeira subunidade sozinha.

[255] Item 9. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens de 1 a 8, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar ao CD137 com um valor de EC_{50} de, no máximo, cerca de 3 nM ou comparável ou menor do que o valor de EC_{50} da proteína de lipocalina específica para CD137 que está incluída na primeira subunidade sozinha.

[256] Item 10. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 8 a 9, caracterizada pelo valor de EC_{50} ser determinado por um ensaio imunoadsorvente enzima-associado (ELISA).

[257] Item 11. A proteína de fusão de acordo com qualquer um dos itens 1 a 10, caracterizada pela proteína de fusão apresentar reação cruzada com a GPC3 de macacos cinomolgos.

[258] Item 12. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 11, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar simultaneamente ao CD137 e GPC3 com valores de EC_{50} de, no máximo, cerca de 10 nM, quando a referida proteína de fusão é medida em um ensaio ELISA.

[259] Item 13. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 12, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar ao CD137 expresso sobre uma célula com valores de EC_{50} de, no máximo, cerca de 30 nM, quando a referida proteína de fusão é medida em uma análise de citometria de fluxo.

[260] Item 14. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 13, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar à GPC3 expressa sobre uma célula com valores de EC_{50} de, no máximo, cerca de 30 nM, quando a referida proteína de fusão é medida em uma análise de citometria de fluxo.

[261] Item 15. A proteína de fusão de acordo com qualquer um dos itens 1 a 14, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de se ligar às células tumorais que expressam GPC3.

[262] Item 16. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 15, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de estimular respostas de células T.

[263] Item 17. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 16, caracterizada pela proteína de fusão por ser capaz de induzir um aumento na secreção de IL-2.

[264] Item 18. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 17, caracterizada pela proteína de fusão se capaz de induzir o aumento da secreção de IL-2 em um nível mais alto do que a proteína de SEQ

ID NO: 83 e/ou com uma melhor eficiência em comparação com a proteína de SEQ ID NO: 83.

[265] Item 19. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 18, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de induzir citotoxicidade mediada por linfócitos.

[266] Item 20. A proteína de fusão de acordo com qualquer um dos itens 1 a 19, caracterizada pela proteína de fusão ser capaz de induzir morte aumentada de células tumorais que expressam GPC3 mediada por células T em comparação com a de SEQ ID NO: 83 e/ou induzir ativação de células T citotóxicas com uma melhor eficácia em comparação com a de SEQ ID NO: 83.

[267] Item 21. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 20, caracterizada por ser capaz de coestimular respostas de células T de maneira dependente de GPC3.

[268] Item 22. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 21, caracterizada por ser capaz de coestimular respostas de células T em um microambiente tumoral.

[269] Item 23. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22, caracterizada pela proteína de fusão não coestimular respostas de células T na ausência de GPC3.

[270] Item 24. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 23, caracterizada pela proteína de fusão ter um perfil farmacocinético semelhante ao de anticorpo.

[271] Item 25. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 24, caracterizada pela proteína de fusão ter uma meia-vida em camundongos de pelo menos 50 horas, pelo menos 75 horas, pelo menos 100 horas, pelo menos 125 horas, pelo menos 150 horas, pelo menos 175 horas,

pelo menos 200 horas, pelo menos 250 horas, ou ainda mais, e/ou caracterizada pela proteína de fusão ter uma meia-vida em camundongos que é mais longa do que a proteína de SEQ ID NO: 83.

[272] Item 26. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 25, caracterizada pela proteína de fusão ter um ponto isoelétrico de pelo menos 6,5, pelo menos 6,8, pelo menos 7,1, pelo menos 7,4, pelo menos 7,5, pelo menos 7,7 ou ainda maior, e/ou caracterizada pela proteína de fusão tem um ponto isoelétrico maior do que o da proteína de SEQ ID NO: 83.

[273] Item 27. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26, caracterizada pela muteína de lipocalina compreender um ou mais resíduos de aminoácidos mutados em posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

[274] Item 28. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 27, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender, em uma ou mais posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da hTlc madura (SEQ ID NO: 1), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Ala 5 → Val ou Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg ou Asn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → Arg ou Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile e Cys 153 → Ser.

[275] Item 29. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 28, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência polipeptídica linear da lipocalina de lágrima humana madura (SEQ ID NO: 1):

(a) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(c) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser; e

(g) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser.

[276] Item 30. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 29, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32-38 ou um fragmento ou forma variante dessas sequências.

[277] Item 31. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 30, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina possuir pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32-38.

[278] Item 32. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um

dos itens 1 a 26, caracterizada pela muteína de lipocalina compreender um ou mais resíduos de aminoácido mutados nas posições correspondentes às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) madura (SEQ ID NO: 2).

[279] Item 33. A proteína de fusão de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26 e 32, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender, nas posições correspondentes às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72-73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) madura (SEQ ID NO: 2), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg ou Lys; Gln 49 → Val, Ile, His, Ser ou Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, Ala ou Gly; Leu 70 → Ala, Lys, Ser ou Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, Thr ou Asn; Trp 79 → Ala ou Asp; Arg 81 → Met, Trp ou Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu e Lys 134 → Tyr.

[280] Item 34. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26 e 33, caracterizada pela muteína de lipocalina compreender um ou mais resíduos de aminoácido mutados nas posições correspondentes às posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) madura (SEQ ID NO: 2).

[281] Item 35. A proteína de fusão de acordo com qualquer um

dos itens 1-26 e 34, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender, nas posições correspondentes às posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132, e 134 da sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2), um ou mais dos seguintes resíduos de aminoácidos mutados: Gln 20 → Arg; Asn 25 Asn; Arg 81 → Trp ou Gln; Thr 82 → Pro; Cys 87 → Ser; Phe 92 → Leu ou Ser; Asn 96 → Phe; Lys 98 → Arg; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → His ou Pro; Phe 122 → Tyr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly.

[282] Item 36. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26 e 32 a 35, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2):

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 →

Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134

→ Tyr;

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(j) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(k) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Lys 98 → Arg; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(l) Asn 25 → Tyr; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Gln; Phe 92 → Ser; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(m) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Tyr 78 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(n) Asn 25 → Asp; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73

→ Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(o) Val 33 → Ile; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(p) Gln 20 → Arg; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Val; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Phe 122 → Tyr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(q) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Ile 80 → Asn; Arg 81 → Trp; Thr 82 → Pro; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → Pro; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(r) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Lys 59 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly; e

(s) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Asp; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 →

Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly.

[283] Item 37. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26 e 32 a 36, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 39-57 ou um fragmento ou forma variante dessas sequências.

[284] Item 38. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26 e 32 a 36, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina possuir pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 39-57.

[285] Item 39. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 26 e 32 a 38, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender o seguinte conjunto de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2): Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr e/ou em que a muteína de lipocalina tem pelo menos 85% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

[286] Item 40. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 39, caracterizado pela subunidade estar ligada a outra subunidade através de um ligante.

[287] Item 41. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 40, caracterizada pela segunda subunidade estar ligada no N-

terminal através de um ligante ao N-terminal ou C-terminal de cada região constante de cadeia pesada (C_H) da primeira subunidade ou ao N-terminal ou C-terminal de cada região constante da cadeia leve (C_L) da primeira subunidade.

[288] Item 42. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 41, caracterizada pela terceira subunidade estar ligada no N-terminal através de um ligante ao N-terminal ou C-terminal de cada região constante de cadeia pesada (C_H) da primeira subunidade ou ao N-terminal ou C-terminal de cada região constante da cadeia leve (C_L) da primeira subunidade, ou o C-terminal de cada segunda subunidade.

[289] Item 43. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 40 a 42, caracterizada pelo ligante ser um ligante não estruturado (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID NO: 13).

[290] Item 44. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 40 a 43, caracterizada pelo ligante ser um ligante não estruturado glicina-serina, um ligante de poliprolina, um polímero prolina-alanina-serina, ou um ligante selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 13-23.

[291] Item 45. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 44, caracterizada pela primeira subunidade ser um anticorpo.

[292] Item 46. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 45, caracterizada pela região variável de cadeia pesada do anticorpo ser selecionada a partir de um grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 78, 114, 119, 126 e 129 ou uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 78, 114, 119, 126 e 129, e em que a região variável de cadeia leve do

anticorpo é selecionada a partir de um grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 79, 115 e 127 ou uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 79, 115 e 127.

[293] Item 47. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 46, caracterizada pelo anticorpo compreender uma cadeia pesada que é de qualquer uma das SEQ ID NOs: 80 ou 81 ou uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 80 ou 81, e uma cadeia leve de SEQ ID NO: 82 ou uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 82.

[294] Item 48. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 47, caracterizada pelo anticorpo compreender uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, respectivamente, como segue: SEQ ID NOs: 78 e 79, SEQ ID NOs: 129 e 79, SEQ ID NOs: 114 e 115, ou SEQ ID NOs: 126 e 127, ou região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve que têm uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 78 e 79, SEQ ID NOs: 129 e 79, SEQ ID NOs: 114 e 115, ou SEQ ID

NOs: 126 e 127.

[295] Item 49. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 48, caracterizada pelo anticorpo compreender uma cadeia pesada e uma cadeia leve, respectivamente, como segue: SEQ ID NOs: 80 e 82, ou SEQ ID NOs: 81 e 82, ou uma cadeia pesada e uma cadeia leve que tem uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 80 e 82, ou SEQ ID NOs: 81 e 82.

[296] Item 50. A proteína de fusão, de acordo com o item 36, caracterizada pela cadeia pesada do anticorpo compreender um dos seguintes conjuntos de sequências CDR:

(a) GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), TRFYSYTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74);

(b) GFTFNKNA (HCDR1, SEQ ID NO: 108), IRNKTNNYAT (HCDR2, SEQ ID NO: 109), VAGNSFAY (HCDR3, SEQ ID NO: 110);

(c) YDFDYSYE (HCDR1, SEQ ID NO: 116), IYHSGST (HCDR2, SEQ ID NO: 117), ARVNMDRFDY (HCDR3, SEQ ID NO: 108); ou

(d) GFTFSSYA (HCDR1, SEQ ID NO: 120), IQKQGLPT (HCDR2, SEQ ID NO: 121), AKNRAKFDY (HCDR3, SEQ ID NO: 122).

[297] Item 51. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 50, caracterizada pela cadeia leve do anticorpo compreender um dos seguintes conjuntos de sequências de CDR:

(a) QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2), SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77);

(b) QSLLYSSNQKNY (LCDR1, SEQ ID NO: 111), WAS (LCDR2),

QQYYNYPLT (LCDR3, SEQ ID NO: 113); ou

(c) QSISSY (LCDR1, SEQ ID NO: 123), NAS (LCDR2), QQNRGFPLT (LCDR3, SEQ ID NO: 125).

[298] Item 52. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 51, caracterizada pela cadeia pesada do anticorpo compreender o seguinte conjunto de sequências de CDR: GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), TRFYSTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74), e pela cadeia leve do anticorpo compreender o seguinte conjunto de sequências de CDR: QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2), SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77).

[299] Item 53. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 51, caracterizada pelo anticorpo compreender o seguinte conjunto de sequências de CDR:

(a) GFTFNKNA (HCDR1, SEQ ID NOs: 108), IRNKTNNYAT (HCDR2, SEQ ID NOs: 109), VAGNSFAY (HCDR3, SEQ ID NOs: 110), QSLLYSSNQKNY (LCDR1, SEQ ID NO: 111), WAS (LCDR2), QQYYNYPLT (LCDR3, SEQ ID NOs: 113); ou

(b) GFTFSSYA (HCDR1, SEQ ID NOs: 120), IQKQGLPT (HCDR2, SEQ ID NOs: 121), AKNRAKFDY (HCDR3, SEQ ID NOs: 122), QSISSY (LCDR1, SEQ ID NO: 123), NAS (LCDR2), QQNRGFPLT (LCDR3, SEQ ID NO: 125).

[300] Item 54. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 53, caracterizada pelo anticorpo ter uma estrutura de IgG₄.

[301] Item 55. A proteína de fusão, de acordo com a item 54, caracterizada pela estrutura de IgG₄ ter uma ou mais das seguintes mutações: S228P, N297A, F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T e T256E.

[302] Item 56. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um

dos itens 1 a 55, caracterizada pela proteína de fusão compreender uma sequência de aminoácidos mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 87-96, ou a proteína de fusão compreender uma sequência de aminoácidos com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas em qualquer uma das SEQ ID NOs: 87-96.

[303] Item 57. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 56, caracterizada pela proteína de fusão compreender os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 87 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 88 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 89, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 90, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 91 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 92 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 93, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 94, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 95 e 82 ou os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 96 e 82.

[304] Item 58. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 57, caracterizada pela proteína de fusão compreender sequências de aminoácidos com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, em pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou uma identidade até mesmo maior, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID NOs: 88 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 89, SEQ ID NOs: 81 e 90, SEQ ID NOs: 91 e 82, SEQ ID NOs: 92 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 93, SEQ ID NOs: 81 e 94, SEQ ID NOs: 95 e 82, ou SEQ ID NOs: 96 e 82.

[305] Item 59. Uma molécula de ácido nucleico, caracterizada por

compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão de qualquer um dos itens 1 a 58.

[306] Item 60. A molécula de ácido nucleico, de acordo com o item 59, caracterizada por estar operacionalmente ligada a uma sequência reguladora para permitir a expressão da referida molécula de ácido nucleico.

[307] Item 61. A molécula de ácido nucleico, de acordo com o item 59 ou 60, caracterizada por estar compreendida em um vetor ou em um vetor fagomídeo.

[308] Item 62. Uma célula hospedeira, caracterizada por compreender uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer um dos itens 59 a 61.

[309] Item 63. Um método de produção da proteína de fusão conforme definida em qualquer um dos itens 1 a 58, caracterizado pela proteína de fusão ser produzida a partir do ácido nucleico codificante da proteína de fusão.

[310] Item 64. O método, de acordo com o item 63, caracterizado pela proteína de fusão ser produzida em um organismo hospedeiro bacteriano ou eucariótico e ser isolada deste organismo hospedeiro ou de seu meio de cultura.

[311] Item 65. Um uso da proteína de fusão conforme definida em qualquer um dos itens 1 a 58 ou de uma composição compreendendo tal proteína de fusão para ativar as vias de sinalização a jusante de CD137 e envolver células tumorais GPC3-positivas.

[312] Item 66. Um método de ativar as vias de sinalização a jusante de CD137 e ligar células tumorais GPC3-positivas de forma simultânea, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58 ou de uma ou mais

composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

[313] Item 67. Um método de coestimular células T e ligar células tumorais GPC3-positivas simultaneamente, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58 ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido compreendendo um tumor.

[314] Item 68. Um método de induzir a atividade de linfócitos e envolver células tumorais GPC3-positivas simultaneamente, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58; ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido compreendendo um tumor.

[315] Item 69. Um método de induzir agrupamento de CD137 e ativar células T e direcionar as referidas células T para células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58; ou uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido compreendendo um tumor.

[316] Item 70. Um método de induzir uma resposta de linfócitos localizada na proximidade de células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58; ou uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido compreendendo um tumor.

[317] Item 71. Um método para induzir o aumento da secreção de IL-2 por células T na vizinhança de células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58; ou uma ou mais

composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

[318] Item 72. Um método para induzir aumento da citólise mediada por linfócitos de células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58; ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

[319] Item 73. Uma composição farmacêutica, caracterizada por compreender uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer um dos itens 1 a 58.

[320] Item 74. Um método para prevenir, melhorar ou tratar cânceres GPC3-positivos, caracterizado por compreender a aplicação da proteína de fusão conforme definida em qualquer um dos itens 1 a 58; ou uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

[321] Item 75. Um método para prevenir, melhorar ou tratar carcinoma hepatocelular, caracterizado por compreender a aplicação da proteína de fusão conforme definida em qualquer um dos itens 1 a 58; ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

[322] Item 76. A proteína de fusão, de acordo com qualquer um dos itens 1 a 58, caracterizada por ser para uso em uma terapia.

[323] Item 77. A proteína de fusão para uso, de acordo com o item 76, caracterizada pelo uso ser para tratar o câncer.

[324] Item 78. O uso, de uma proteína de fusão conforme definida em qualquer um dos itens 1 a 58, caracterizado por ser para a fabricação de um medicamento.

[325] Item 79. O uso, de acordo com o item 78, caracterizado pelo medicamento ser para o tratamento do câncer.

V. EXEMPLOS

EXEMPLO 1

EXPRESSÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE FUSÃO REPRESENTATIVAS

[326] Neste Exemplo, as proteínas de fusão 'muteína de lipocalina–anticorpo' representativas foram geradas pela fusão de um anticorpo específico para GPC3 possuindo a cadeia pesada fornecida pela SEQ ID NO: 81, ou compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78, ou compreendendo as CDRs de GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), e TRFYSTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74), e cadeias leves fornecida pela SEQ ID NO: 82, ou compreendendo um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 79, ou compreendendo as CDRs de QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2, SEQ ID NO: 76) e SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77), e a muteína de lipocalina específica para CD137 de SEQ ID NO: 40 ou a lipocalina específica para CD137 possuindo 97% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 49 e designada CD137Ac1, através de um ligante, tal como um ligante não estruturado (G₄S)₃ de SEQ ID NO: 13, para ligar ao CD137 e GPC3 ao mesmo tempo. Os diferentes formatos que foram gerados estão ilustrados na Figura 1. Por exemplo, tais proteínas de fusão, por exemplo, de SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID NOs: 88 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 89, SEQ ID NOs: 81 e 90, e CD137Ac1-Fusão 1, CD137Ac1- Fusão 2, CD137Ac1-Fusão 3, CD137Ac1-Fusão 4, CD137Ac1-Fusão 5, CD137Ac1-Fusão 6 e CD137Ac1-Fusão 7 (proteínas de fusão com 97% de identidade de sequência com as SEQ ID NOs: 91 e 82, SEQ ID NOs: 92 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 93, SEQ ID NOs: 81 e 94, SEQ ID NOs: 95 e 82 ou SEQ ID NOs: 96 e 82), foram geradas pela fusão de

uma ou mais muteína de lipocalina de SEQ ID NO: 40 ou de uma muteína com 97% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 49 com qualquer um ou mais das quatro porções terminais de um anticorpo que compreende a cadeia pesada fornecida pela SEQ ID NO: 81, ou compreende um domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78, ou que compreende as CDRs de GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKGTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), e TRFYSTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74), e cadeias leves fornecidas pela SEQ ID NO: 82, ou compreendem um domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 79, ou compreendendo as CDRs de QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2, SEQ ID NO: 76) e SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77). As proteínas de fusão geradas podem ser bivalentes para CD137 (por exemplo, como representado na Figura 1A-1D), ou tetravalente para CD137 (por exemplo, como representado na Figura 1E-1H), ou ter valência ainda maior para CD137 (por exemplo, como representado em Figura 1I).

[327] Os anticorpos específicos para GPC3, bem como todas as proteínas de fusão de muteína de lipocalina e anticorpo descritas neste Exemplo, tinham uma estrutura de IgG₄ manipulada, que continha uma mutação S228P para minimizar a troca de meio anticorpo de IgG₄ *in vitro* e *in vivo* (Silva *et al.*, *J Biol Chem*, 2015). Mutações adicionais nas estruturas da IgG₄ também podem existir em todos os anticorpos e proteínas de fusão aqui descritas, incluindo qualquer uma ou mais das mutações F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T e T256E. As mutações F234A e L235A podem ser introduzidas para diminuir a ADCC e ADCP (Glaesner *et al.*, *Diabetes Metab Res Rev*, 2010). As mutações M428L e N434S ou M252Y, S254T e T256E podem ser introduzidas para prolongar a meia-vida sérica (Dall'Acqua *et al.*, *J Biol Chem*, 2006, Zalevsky *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2010). Todos os anticorpos foram expressos sem a lisina carboxi-terminal para evitar

heterogeneidade.

[328] Além disso, as fusões Fc de muteína de lipocalina monoespecíficas foram geradas pela fusão de uma ou mais da muteína de lipocalina específica para CD137 de SEQ ID NO: 40 ou a lipocalina específica para GPC3 de SEQ ID NO: 64, através de um ligante, por exemplo, um ligante não estruturado (G₄S)₃ de SEQ ID NO: 13, ao C-terminal da região Fc de um anticorpo fornecido de SEQ ID NO: 28, conforme representado na Figura 1J-1K. As construções resultantes são fornecidas na SEQ ID NO: 98.

[329] A presente invenção também incorpora formatos assimétricos de fusão de anticorpo–muteína de lipocalina onde, por exemplo, uma cadeia leve do anticorpo pode ser fundida com uma muteína de lipocalina enquanto a outra não.

[330] As construções das proteínas de fusão foram geradas por síntese de genes e clonadas em um vetor de expressão de mamífero. Elas foram então expressas transitoriamente em células Expi293FTM (Life Technologies). A concentração de proteínas de fusão no meio de cultura de células foi medida por HPLC (Agilent Technologies) empregando uma coluna de afinidade de proteína A POROS[®] (Applied Biosystems). Os títulos das proteínas de fusão foram resumidos na Tabela 1.

[331] As proteínas de fusão foram purificadas utilizando cromatografia de Proteína A seguida por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após a purificação por SEC, as frações contendo proteína monomérica são reunidas e analisadas novamente usando SEC analítica e as porcentagens de conteúdo monomérico.

[332] Os conteúdos de proteína monomérica de proteínas de fusão exemplares após purificação de SEC estão resumidos na Tabela 1, bem

como os pontos isoelétricos (pIs). Os pI de proteínas de fusão fornecidas (SEQ ID NOs: 87 e 82) estavam aumentadas quando comparadas com uma determinada proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida de SEQ ID NO: 83.

TABELA 1

TÍTULOS DE EXPRESSÃO TRANSITÓRIA

	Teor de proteína monomérica [%]	pI determinado
SEQ ID NOs: 87 e 82	99,9	7,5
CD137Ac1-Fusão 2	98,3	--
SEQ ID NOs: 81 e 82	99,0	--
SEQ ID NO: 83	100,0	6,2

EXEMPLO 2

LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO À GPC3 DETERMINADA POR RESSONÂNCIA

PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR)

[333] A cinética de ligação e a afinidade de proteínas de fusão exemplares para GPC3 humana recombinante (huGPC3) e GPC3 de cinimolgo (cyGPC3) (R&D Systems) foram determinadas por ressonância plasmônica de superfície (SPR) usando um instrumento Biacore T200 (GE Healthcare).

[334] O anticorpo anti-Fc de IgG humana (GE Healthcare) foi imobilizado em um *chip* sensor CM5 usando química de amina padrão: os grupos carboxila no *chip* foram ativados usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodi-imida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). Posteriormente, a solução de anticorpo anti-Fc de IgG humana (GE Healthcare) a uma concentração de 25 µg/mL em acetato de sódio 10 mM (pH 5.0) foi aplicada a uma velocidade de fluxo de 5 µL/min até que um nível de imobilização de 6000- 10000

unidades de ressonância (RU) fosse alcançado. Os ésteres de NHS não reagidos foram bloqueados passando uma solução de etanolamina 1M através da superfície. O canal de referência foi tratado de maneira análoga. Subsequentemente, o teste de proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 87 e 82 e CD137Ac1-Fusão 1) ou o anticorpo GPC3 igual ao incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82) a 0,2 µg/mL em tampão HBS-EP+ foi capturado pelo anticorpo anti-Fc de IgG humana na superfície do *chip* durante 180 seg. a uma velocidade de fluxo de 10 µL/min. Após cada etapa de captura, a agulha era lavada.

[335] Para a determinação da afinidade, diluições (100 nM, 25 nM, 6,25 nM e 1,56 nM) de huGPC3 ou cyGPC3 foram preparadas em tampão HBS-EP+ (GE Healthcare) e aplicadas à superfície do *chip* preparado. O ensaio de ligação foi realizado com um tempo de contato de 180 seg., um tempo de dissociação de 900 seg., e uma velocidade de fluxo de 30 mL/min. Após cada injeção, a agulha foi limpa com NaOH a 40 mM + isopropanol a 20%. Todas as medições foram realizadas a 25 °C. A regeneração da superfície do *chip* foi alcançada com injeções de MgCl₂ a 3M por 120 seg. Antes das medições de proteína, três ciclos de inicialização foram realizados para fins de condicionamento. Os dados foram avaliados com o *software* de avaliação Biacore T200 (v2.0). Foi utilizada referência dupla e o modelo de Ligação 1: 1 foi usado para ajustar os dados brutos.

[336] Os valores determinados para k_{on} , k_{off} e constante de equilíbrio de dissociação resultante (K_D) para proteínas de fusão exemplares estão resumidos na Tabela 2. As proteínas de fusão testadas (SEQ ID NOs: 87 e 82 e CD137Ac1-Fusão 1) ligam-se à huGPC3, bem como à cyGPC3 com afinidades subnanomolares, comparáveis ao anticorpo GPC3 incluído nas proteínas de fusão e uma determinada proteína de fusão biespecífica

CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NO: 83).

TABELA 2

AS CONSTANTES CINÉTICAS E AFINIDADES DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

DETERMINADAS POR SPR

	huGPC3			cyGPC3		
	k_{on} [M ⁻¹ x s ⁻¹]	k_{off} [s ⁻¹]	K_D [nM]	k_{on} [M ⁻¹ x s ⁻¹]	k_{off} [s ⁻¹]	K_D [nM]
SEQ ID NOs: 87 e 82	4,09E+05	2,69E-04	6,57E-10	2,93E+05	2,75E-04	9,36E-10
CD137Ac1-Fusão 1	3,81E+05	2,54E-04	6,66E-10	2,61E+05	2,67E-04	1,02E-09
SEQ ID NOs: 81 e 82	3,61E+05	2,48E-04	6,86E-10	2,05E+05	1,51E-04	7,37E-10
SEQ ID NO: 83	2,05E+05	1,51E-04	7,37E-10	2,11E+05	1,41E-04	6,69E-10

EXEMPLO 3

LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO À GPC3 OU CD137 EM ENSAIO

IMUNOADSORVENTE ENZIMA-ASSOCIADO (ELISA)

[337] Um ensaio imunoabsorvente enzima-associado (ELISA) foi usado para determinar a potência de ligação de proteínas de fusão exemplares à GPC3 e ao CD137.

[338] A huGPC3 (R&D Systems) recombinante na concentração de 1 µg/mL em PBS foi revestida durante a noite em placas de microtitulação a 4°C. Após cinco lavagens com 100 µL de PBS-0,05%–T (PBS suplementado com 0,05% (v/v) de Tween 20), as placas foram bloqueadas com BSA a 2% (p/v) em PBS-0,1%T (PBS-0,1%T–BSA-2%) por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem com 100 µL de PBS-0,05%T (PBS suplementado com 0,05% (v/v) de Tween 20) por cinco vezes, as proteínas de fusão exemplares (SEQ ID NOs: 87 e 92 e CD137Ac1-Fusão 1 a 7) ou o anticorpo GPC3 como incluído nas proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82) em diferentes concentrações foram adicionados aos poços que foram incubados por 1 h em temperatura ambiente, seguido por outra etapa de lavagem. As moléculas ligadas em

estudo foram detectadas após incubação com anti-Fc de IgG humana–HRP diluído 1:5000 Jackson Laboratory) em PBS-0,1%T-2%BSA. Após uma etapa de lavagem adicional, foi adicionado substrato HRP fluorogênico (QuantaBlu, Thermo) a cada poço e a intensidade de fluorescência foi detectada usando um leitor de fluorescência em microplacas.

[339] A mesma configuração de ELISA também foi usada para determinar a potência de ligação de proteínas de fusão à GPC3 de cinomolgo e huCD137, onde cyGPC3 recombinante (R&D Systems) ou huCD137-His (CD137 humano recombinante com marcador (*tag*) de poli-histidina C-terminal, R&D Systems) foi revestido em uma placa de microtitulação. Os agentes de teste foram titulados de forma semelhante e os agentes ligados foram detectados via anti-NGAL-HRP.

[340] Os resultados de experimentos exemplares estão representados nas Figuras 2A-2D, juntamente com as curvas de ajuste resultantes de um ajuste sigmoidal de ligação 1:1, onde o valor de EC_{50} e o sinal máximo eram parâmetros livres e a inclinação foi fixada para unidade. Os valores de EC_{50} resultantes são fornecidos na Tabela 3.

[341] Os valores de EC_{50} observados em relação à GPC3 humana de proteínas de fusão fornecidas (SEQ ID NOs: 87 e 82 e CD137Ac1-Fusão 1 a 7) foram muito semelhantes ou comparáveis a uma proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NOs: 83) e/ou ao anticorpo GPC3 incluído nas proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82). Algumas proteínas de fusão testadas (SEQ ID NOs: 87 e 82, CD137Ac1-Fusão 3 e CD137Ac1-Fusão 4) retêm fortes afinidades de ligação ao CD137 humano. Além disso, certas proteínas de fusão testadas (SEQ ID NOs: 87 e 82) também mostram reatividade cruzada com GPC3 de cinomolgos em um nível comparável de ligação à GPC3 humana, ou seja, ligam-se à GPC3 de

cinomolgos com valores de EC₅₀ no mesmo intervalo que os EC₅₀s correspondentes para GPC3 humana.

TABELA 3

DADOS DE ELISA PARA LIGAÇÃO DE GPC3 OU CD137

	EC₅₀ [nM] Ligação à huGPC3	EC₅₀ [nM] Ligação à cyGPC3	EC₅₀ [nM] Ligação ao huCD137
SEQ ID NOs: 87 e 82	0,19	0,34	0,52
CD137Ac1-Fusão 1	0,16	--	--
CD137Ac1-Fusão 2	0,4	--	--
CD137Ac1-Fusão 3	0,43	--	2,4
CD137Ac1-Fusão 4	0,46	--	0,81
CD137Ac1-Fusão 5	0,46	--	--
CD137Ac1-Fusão 6	0,47	--	--
CD137Ac1-Fusão 7	0,43	--	--
SEQ ID NOs: 81 e 82	0,13	0,23	--
SEQ ID NO: 83	0,24	0,41	0,15

EXEMPLO 4

LIGAÇÃO SIMULTÂNEA DE PROTEÍNAS DE FUSÃO À GPC3 E CD137 EM ELISA

[342] A fim de demonstrar a ligação simultânea das proteínas de fusão à GPC3 e CD137, foi utilizado um formato ELISA de ligação dupla.

[343] A proteína de fusão recombinante huCD137-His (R&D System) em PBS (1 µg/mL) foi revestida durante a noite em placas de

microtitulação a 4 °C. As placas foram lavadas por cinco vezes após cada etapa de incubação com 100 µL de PBS-0,05%T. As placas foram bloqueadas com PBS-0,1% de T-BSA a 2% durante 1 h em temperatura ambiente e subsequentemente novamente lavadas. Diferentes concentrações das proteínas de fusão testadas foram adicionadas aos poços e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente, seguidos de uma etapa de lavagem. Subsequentemente, huGPC3 biotinilado foi adicionado a uma concentração constante de 1 µg/mL em PBS-0,1%T-2% BSA durante 1 h. Após a lavagem, uma diluição 1:5000 de *ExtrAvidin*-HRP (Sigma-Aldrich) em PBS-0,1%T-2% BSA foi adicionada aos poços e incubada durante 1 h. Após uma etapa de lavagem adicional, foi adicionado substrato HRP fluorogênico (QuantaBlu, Thermo) a cada poço e a intensidade de fluorescência foi detectada usando um leitor de fluorescência em microplacas.

[344] A ligação dupla de proteínas de fusão também foi testada com uma configuração reversa, onde huGPC3 (R&D Systems) recombinante foi revestido em placas de microtitulação a 1 µg/mL e as proteínas de fusão ligadas foram detectadas através da adição de huCD137-His biotinilado 5 µg/mL.

[345] Os dados de dupla ligação exemplares são mostrados na Figura 3, juntamente com as curvas de ajuste resultantes de um ajuste de ligação sigmoidal 1:1, onde o valor de EC_{50} e o sinal máximo eram parâmetros livres e a inclinação foi fixada para unidade. Os valores de EC_{50} estão resumidos na Tabela 4. As proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 87 e 82 e CD137Ac1-Fusão 1 a 7) mostram claros sinais de ligação, demonstrando que elas pode envolver GPC3 e CD137 simultaneamente. A maioria destas proteínas de fusão são capazes de envolver simultaneamente GPC3 e CD137 em um nível comparável a uma proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3

previamente conhecida de SEQ ID NOs: 83.

TABELA 4

DADOS DE ELISA PARA LIGAÇÃO SIMULTÂNEA AOS ALVOS GPC3 E CD37

	EC₅₀ [nM] detecção GPC3 captura_CD137	EC₅₀ [nM] detecção CD137 captura_GPC3
SEQ ID NOs: 87 e 82	0,98	4,2
CD137Ac1-Fusão 2	5,3	--
CD137Ac1-Fusão 3	3,3	--
CD137Ac1-Fusão 4	3,2	--
CD137Ac1-Fusão 5	1,7	--
CD137Ac1-Fusão 6	3,1	--
CD137Ac1-Fusão 7	1,9	--
SEQ ID NOs: 81 e 82	--	--
SEQ ID NO: 83	1,0	4,2

EXEMPLO 5

LIGAÇÃO FORA DO ALVO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO ANALISADAS POR ELISA

[346] Um ensaio baseado em ELISA foi usado para avaliar a ligação fora do alvo de proteínas de fusão em relação a 32 alvos diferentes, incluindo GPC3, GPC5 e outras proteínas receptoras de TNF (Frese *et al.*, *MAbs*, 2013). Os alvos na concentração de 5 µg/mL em PBS foram revestidos durante a noite em placas de microtitulação a 4°C. Após lavagem com PBS-0,05%T, as placas foram bloqueadas com PBS-0,1%T-2% de BSA durante 1 h à temperatura ambiente. Após lavagem com 100 µL de PBS-0,05%T por cinco

vezes, as proteínas de fusão de teste a 100 nM ou 10 nM foram adicionadas aos poços e incubadas por 1 h em temperatura ambiente, seguido por outra etapa de lavagem. Os anticorpos ligados em estudo foram detectados após incubação com anticorpo de cabra anti-Fc de IgG humana–HRP diluído 1:5000 (Jackson Laboratory) em PBS-0,1%T-2%BSA. Após uma etapa de lavagem adicional, foi adicionado substrato HRP fluorogênico (QuantaBlu, Thermo) a cada poço e incubado por 1 hora. A intensidade de fluorescência foi detectada usando um leitor de microplaca de fluorescência e normalizada para o sinal de um anticorpo de controle (SEQ ID NOs: 106 e 107). Os sinais normalizados de cada molécula de teste que se liga aos 32 alvos foram somados para produzir a razão de ligação acumulada para o anticorpo em uma determinada concentração, ou seja, 100 nM ou 10 nM. As razões de ligação acumuladas a 100 nM e 10 nM para cada molécula de teste foram ainda somadas para produzir a soma das razões de ligação acumuladas. Por exemplo, o anticorpo de controle (SEQ ID NOs: 106 e 107), para o qual a intensidade de fluorescência resultante da ligação a cada um dos 32 alvos foi normalizada, tem uma razão de ligação acumulada de 32 quando testado em 100 nM ou 10 nM e uma soma das razões de ligação acumuladas de 64. Os resultados são demonstrados na Tabela 5. A razão de ligação acumulada mais elevada correlaciona-se com uma ligação fora do alvo mais forte.

[347] A proteína de fusão fornecida de SEQ ID NOs: 87 e 82 não exhibe ligação fora do alvo ou desprezível (soma de razões de ligação acumulada < 150), bem como o anticorpo GPC3 e a muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão Fc), conforme incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82 e SEQ ID NO: 98, respectivamente), enquanto a proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NO: 83) mostra ligação fora do alvo indesejada (soma de razões de ligação

acumulada > 250).

TABELA 5

LIGAÇÃO FORA DO ALVO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO.

	Moléculas		Razão de ligação cumulativa	Soma das razões de ligação cumulativas
Intensidade de fluorescência normalizada	SEQ ID NOs: 87 e 82	100 nM	64	109
		10 nM	45	
	SEQ ID NOs: 81 e 82	100 nM	81	129
		10 nM	48	
	SEQ ID NO: 98	100 nM	38	70
		10 nM	32	
	SEQ ID NO: 83	100 nM	207	352
		10 nM	144	

EXEMPLO 6

ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO DE PROTEÍNAS DE FUSÃO QUE LIGAM-SE ÀS CÉLULAS QUE EXPRESSAM CD137 OU GPC3

[348] A ligação alvo-específica de proteínas de fusão exemplares em células que expressam CD137 humano e células que expressam GPC3 humana foi avaliada por citometria de fluxo.

[349] As células CHO foram transfectadas de forma estável com CD137 humano ou um controle simulado (*mock*) usando o sistema *Flp-In* (Life technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As células SK-Hep1 foram transfectadas de forma estável com GPC3 humana ou um controle simulado (*mock*) usando Lipofectamine2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As células CHO transfectadas foram mantidas em meio Ham's F12 (Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Sigma-Aldrich) e 500 µg/mL de Higromicina B (Roth). As células SK-Hep1 transfectadas foram cultivadas em meio RPMI 1640 + GlutaMAX (Gibco) suplementado com 20% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) e 500 µg/mL de G418 (Gibco). As células foram cultivadas em frascos de cultura de acordo com as instruções do fabricante (37 °C, atmosfera de

5% de CO₂).

[350] Para a análise de citometria de fluxo, as respectivas linhagens de células foram incubadas com uma proteína de fusão exemplar (SEQ ID NOs: 87 e 82), o anticorpo GPC3 ou a muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão Fc) como incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82 e SEQ ID NO: 98, respectivamente), um anticorpo CD137 de referência SEQ ID NOs: 26 e 27, ou um controle isotópico (SEQ ID NOs: 24 e 25) e detectado usando um anticorpo anti-IgG humana marcado com fluorescência na análise FACS conforme descrito a seguir:

5×10^4 células por poço foram incubadas durante 1 h em PBS arrefecido com gelo contendo 5% de soro bovino fetal (PBS-SBF). Uma série de diluições da molécula teste foi adicionada às células que foram incubadas por 1 h em gelo. As células foram lavadas duas vezes com PBS e depois incubadas com um anticorpo de cabra anti-hlgG marcado com Alexa647 ou anticorpo de cabra anti-hlgG marcado com Alexa488 por 30 min em gelo. As células foram subsequentemente lavadas e analisadas usando citômetro de fluxo iQue (Intellicyte Screener). As médias geométricas dos sinais fluorescentes foram representadas graficamente e os valores foram ajustados com o *software* Graphpad. As médias geométricas da intensidade de fluorescência foram usadas para calcular os valores de EC₅₀ usando uma regressão logística de quatro parâmetros com o fundo fixo ao fundo.

[351] A capacidade das moléculas testadas para se ligar ao CD137 e GPC3 humana é representada na Figura 4. As afinidades de ligação (EC₅₀s) da proteína de fusão SEQ ID NOs: 87 e 82 para as células expressando GPC3 humana e CD137 humana está no intervalo nanomolar baixo, comparável ao do anticorpo GPC3 (SEQ ID NOs: 81 e 82) e a muteína de lipocalina específica de CD137 (SEQ ID NO: 98) ou anticorpo (SEQ ID NOs: 26 e 27), respectivamente (resumido na Tabela 6). Certa proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3

previamente conhecida (SEQ ID NO: 83), no entanto, mostra ligação dependente da dose limitada a células que expressam GPC3, uma vez que a curva de ligação não atingiu um patamar em concentrações de até 100 nM (Figura 4B). Nenhuma das moléculas testadas se liga às células falsamente transfectadas (*mock*) (dados não mostrados).

TABELA 6

AFINIDADES DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO ÀS CÉLULAS QUE EXPRESSAM

GPC3 ou CD137

	EC₅₀ [nM] Flp-In-CHO::huCD137	EC₅₀ [nM] SK-Hep1::huGPC3
SEQ ID NOs: 87 e 82	13,09	23,22
SEQ ID NOs: 81 e 82	--	19,92
SEQ ID NO: 98	18,03	--
SEQ ID NOs: 26 e 27	9,61	--
SEQ ID NO: 83	4,68	--

EXEMPLO 7

AFINIDADES DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO ÀS CÉLULAS TUMORAIS

POSITIVAS PARA GPC3

[352] A ligação de proteínas de fusão às células tumorais que expressam diferentes níveis de GPC3 (HepG2, Hep3B, MKN-45 e NCI-N87) foi avaliada por citometria de fluxo.

[353] A linhagem de células HepG2 foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMSO, Pan Biotech) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich). A linhagem de células Hep3B foi cultivada em Meio Essencial Mínimo (com sais de Earl) (Gibco) suplementado com Soro Bovino Fetal a 10% (Sigma-Aldrich) e 2 mM de L-glutamina (Gibco). As linhagens de células MKN-45 e NCI-N87 foram cultivadas em Meio RPMI-1640 + GlutaMAX (Gibco) suplementado com 20% ou 10% de Soro Bovino Fetal (Sigma-Aldrich), respectivamente. Todas as linhagens de células tumorais foram cultivadas em frascos de

cultura celular de acordo com as instruções do fabricante (37°C, atmosfera de 5% de CO₂).

[354] Para a análise de citometria de fluxo, as linhagens de células tumorais com diferentes níveis de expressão de GPC3 (expressão alta a moderada: HepG2 > Hep3B > MKN-45) e a linhagem de células negativa para GPC3, NCI-N87, foram incubadas com uma proteína de fusão exemplar SEQ ID NOs: 87 e 82, o anticorpo GPC3 ou a muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão Fc) como incluída na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82 e SEQ ID NO: 98, respectivamente), um anticorpo CD137 de referência SEQ ID NOs: 26 e 27, ou um controle isotópico (SEQ ID NO: 24 e 25), e detectado usando um anticorpo anti-IgG humana marcado com fluorescência, conforme descrito no Exemplo 6.

[355] A capacidade da proteína de fusão SEQ ID NOs: 87 e 82 se ligar às células tumorais positivas para GPC3 está ilustrada na Figura 5 e as afinidades de ligação correspondentes (EC₅₀s) estão resumidas na Tabela 7. As afinidades de ligação da proteína de fusão para células tumorais expressando GPC3 estavam no intervalo nanomolar baixo, comparável ao anticorpo GPC3 incluído nas proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82). Os resultados sugerem adicionalmente que a proteína de fusão não se liga às células tumorais negativas para GPC3.

TABELA 7

AFINIDADES DE LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO ÀS CÉLULAS TUMORAIS POSITIVAS

PARA GPC3

	EC₅₀ [nM] HepG2	EC₅₀ [nM] Hep3B	EC₅₀ [nM] MKN-45	EC₅₀ [nM] NCI-N87
SEQ ID NOs: 87 e 82	20,56	7,92	2,59	--
SEQ ID NOs: 81 e 82	16,68	6,35	1,46	--
SEQ ID NO: 98	--	--		--
SEQ ID NOs: 26 e 27	--	--		--

EXEMPLO 8**COESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS T DEPENDENTE DE GPC3 USANDO UM BIOENSAIO DE CD137**

[356] O potencial das proteínas de fusão selecionadas para induzir a ativação da via de sinalização de CD137 na presença de GPC3 foi avaliado usando uma linhagem de células Jurkat duplamente transfectada comercialmente disponível que expressa CD137 e o gene *luc2* (versão humanizada da luciferase do vaga-lume) enquanto a expressão de *luc2* é dirigida por um elemento responsivo ao NFκB. Neste bioensaio, a ligação ao CD137 resulta na sinalização intracelular de CD137, levando a luminescência mediada por NF-κB.

[357] As linhagens de células de câncer hepatocelular, HepG2 e Hep3B, que expressam alto nível de GPC3, e as linhagens de células de câncer gástrico MKN-45, que expressam nível moderado de GPC3, e NCI-N87, que é GPC3 negativo, foram cultivadas como descrito no Exemplo 7. Um dia antes do ensaio, as respectivas células de tumor foram plaqueadas a $6,25 \times 10^3$ células por poço e deixadas aderir durante a noite a 37°C em uma incubadora com atmosfera de CO₂ a 5%, umidificada.

[358] No dia seguinte, $3,75 \times 10^4$ células NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat foram adicionadas a cada poço, seguido pela adição de várias concentrações, tipicamente variando de 0,00488 nM a 10 nM, de uma proteína de fusão exemplar (SEQ ID NOs: 87 e 82), o anticorpo GPC3 ou a muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão Fc) como incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82 e SEQ ID NO: 98, respectivamente), um anticorpo CD137 de referência SEQ ID NOs: 26 e 27, ou um controle isotópico (SEQ ID NO: 24 e 25). As placas foram cobertas com uma vedação permeável aos gases e incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ umidificada. Após 4h, 30 µL de Reagente Bio-Glo® foram adicionados a cada poço e o sinal

bioluminescente foi quantificado usando um luminômetro (PHERAstar). A análise da curva logística de quatro parâmetros foi realizada com GraphPad Prism® para calcular os valores de EC₅₀ (parte inferior compartilhada) que estão resumidos na Tabela 8. Para demonstrar o a dependência de GPC3 no acoplamento de CD137 por proteínas de fusão, o mesmo experimento foi realizado em paralelo na ausência de células tumorais utilizando a concentração mais elevada das moléculas teste. O ensaio foi realizado em triplicatas.

[359] Os resultados de um experimento representativo estão ilustrados na Figura 6. Os dados mostrados nas Figuras 6A e 6B demonstram que a proteína de fusão exemplar de SEQ ID NOs: 87 e 82 induziu uma forte coestimulação de células T mediada por CD137 na presença de linhagem de células tumorais com alto nível de expressão de GPC3. As Figuras 6C-6E mostram que a ativação de CD137 pela proteína de fusão é dependente de GPC3, pois nenhuma ativação das células Jurkat NF-kB-Luc2/CD137 foi detectada na presença de células tumorais com expressão de GPC3 moderada ou baixa ou na ausência de células tumorais expressando GPC3. Em contraste, o mAb anti-CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) mostrou coestimulação de células T mediada por CD137, independentemente do nível de expressão de GPC3 e na ausência de células alvo.

TABELA 8

AValiação DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T USANDO UM BIOENSAIO DE CD137

	EC ₅₀ [nM] HepG2	EC ₅₀ [nM] Hep3B	EC ₅₀ [nM] MKN-45	EC ₅₀ [nM] NCI-N87
SEQ ID NOs: 87 e 82	0,38	0,78	--	--
SEQ ID NOs: 81 e 82	--	--	--	--
SEQ ID NO: 98	--	--	--	--
SEQ ID NOs: 26 e 27	0,94	1,39	1,47	1,67

EXEMPLO 9**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T DEPENDENTE DE GPC3 INDUZIDA PELAS
PROTEÍNAS DE FUSÃO**

[360] A coestimulação de células T dependente do alvo GPC3 pelas proteínas de fusão foi analisada usando um ensaio de ativação de células T. As proteínas de fusão foram aplicadas em diferentes concentrações nas células T estimuladas com anti-CD3, cocultivadas com células SK-Hep1 transfectadas com GPC3 ou células SK-Hep1 falsamente transfectadas (*mock*) ou linhagem de células tumorais positivas para GPC3 HepG2. Os níveis de secreção de IL-2 foram medidos nos sobrenadantes.

[361] As PBMCs de doadores voluntários saudáveis foram isoladas da camada leuco-plaquetária por centrifugação através de um gradiente de densidade *Polysucrose* (Biocoll 1,077 g/mL, Biochrom), seguindo os protocolos da Biochrom. Os linfócitos T foram posteriormente purificados a partir das PBMCs por classificação magnética de células usando um kit de purificação de células Pan T (Miltenyi Biotec GmbH) seguindo as instruções do fabricante. As células Pan T purificadas foram ressuspensas em um tampão consistindo em 90% de SBF e 10% de DMSO, e foram imediatamente congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso posterior. Para o ensaio, as células T foram descongeladas e colocadas em repouso em meio de cultura (meio RPMI-1640 + GlutaMAX, Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) durante a noite a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As células SK-Hep1 e HepG2 foram cultivadas como descrito no Exemplo 6 e Exemplo 7, respectivamente.

[362] O procedimento a seguir foi realizado usando triplicatas para cada condição experimental: placas de cultura de tecido com fundos

planos foram pré-revestidas com 0,25 µg/mL de anticorpo anti-CD3 por 2 h a 37°C e depois lavadas duas vezes com PBS. Células SK-Hep1, transfectadas com GPC3 humana ou simulado (*mock*), e células tumorais positivas para GPC3 HepG2 foram tratadas durante 30 min com 30 µg/mL de mitomicina C (Sigma Aldrich) para bloquear a proliferação. As células tratadas com mitomicina foram então lavadas duas vezes com PBS e semeadas a $1,0 \times 10^4$ células por poço em meio de cultura para permitir a aderência durante a noite a 37°C em uma incubadora sob atmosfera de CO₂ a 5% umidificada. As células expressando o alvo haviam sido anteriormente cultivadas sob condições padrão, separadas usando Accutase (PAA Laboratories) e ressuspensas em meio de cultura.

[363] Nos dias seguintes, após a lavagem das placas por duas vezes com PBS, $2,5 \times 10^4$ células T foram adicionadas por poço. Uma série de diluições das proteínas de fusão (SEQ ID NOs: 87 e 82), de anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82), de uma proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NO: 83), de uma muteína de lipocalina específica para GPC3 (fusão Fc) (SEQ ID NOs: 97), de um anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) ou de um controle isotópico (SEQ ID NOs: 24 e 25), tipicamente variando de 0,003 nM a 10 nM, foi adicionada aos poços correspondentes. As placas foram cobertas com uma vedação permeável aos gases e incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ umidificada durante 3 dias. Os níveis de IL-2 no sobrenadante foram avaliados usando o kit IL-2 DuoSet humano (R&D Systems) conforme descrito nos procedimentos a seguir.

[364] As placas de 384 poços foram revestidas por 2 h em temperatura ambiente com 1 µg/mL de anticorpo de captura de IL-2 humana "*Human IL-2 Capture Antibody*" em PBS. Subsequentemente, os poços foram

lavados 5 vezes com 80 µL de PBS-0,05%T. Após 1 h de bloqueio em PBS-0,05%T contendo 1% de caseína (p/p), os sobrenadantes do ensaio e uma concentração seriada de padrão IL-2 diluído em meio de cultura foram transferidos para os respectivos poços e incubados durante a noite a 4°C. No dia seguinte, uma mistura de 100 ng/mL de anticorpo de detecção de cabra anti-hIL-2-Bio (R&D Systems) e 1 µg/mL de estreptavidina marcada com *sulfotag* (Mesoscale Discovery) em PBS-T0,5%T contendo 0,5% de caseína foi adicionada e incubada à temperatura ambiente por 1 h. Após a lavagem, 25µL de tampão de leitura (Mesoscale Discovery) foram adicionados a cada poço e o sinal de eletroquimioluminescência (ECL) resultante foi detectado utilizando um leitor *Mesoscale Discovery*. A análise e a quantificação foram realizadas utilizando o *software* do *Mesoscale Discovery*.

[365] O ensaio de ativação de células T também foi empregado de uma maneira semelhante para avaliar a capacidade de proteínas de fusão biespecíficas CD137/GPC3 previamente conhecidas SEQ ID NOs: 99 e 27, SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84 em coestimular as respostas das células T. No experimento, as placas de cultura de tecidos foram pré-revestidas por 1 h a 37°C usando 200 µL de 0,25 µg/mL de anticorpo anti-CD3 e lavadas duas vezes com PBS. $1,25 \times 10^4$ células tumorais HepG2 por poço foram plaqueadas, deixadas aderir durante a noite a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ e tratadas por 2 horas a 37°C com mitomicina C 10 µg/mL. As placas foram lavadas duas vezes com PBS e 5×10^4 células T e as moléculas de teste a uma concentração de 1 µg/mL foram adicionadas a cada poço. As placas foram cobertas com uma vedação permeável aos gases e incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ umidificada durante 3 dias. Posteriormente, a concentração de IL-2 foi avaliada no sobrenadante.

[366] Dados exemplificativos são mostrados na Figura 7. A

cocultura de células Pan T com células SK-Hep1 transfectadas com GPC3 humana (Figura 7B) ou células tumorais HepG2 expressando GPC-3 (Figura 7C) na presença da proteína de fusão (SEQ ID NOs: 87 e 82) levou a fortes secreção de IL-2 dependente da dose em comparação com o controle isotópico e é muito mais forte do que a cocultura com anticorpo GPC3 (SEQ ID NOs: 81 e 82), muteína de lipocalina específica para GPC3 (SEQ ID NO: 129) ou com a proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NOs: 83), onde nenhum aumento de IL-2 foi detectado, ou foi observado um ligeiro aumento na secreção de IL-2 apenas em altos níveis de dose. Quando em cocultura com células SK-Hep1 falsamente transfectadas (GPC3 negativo), nenhuma molécula de teste exibe aumento dose-dependente na secreção de IL-2. Os resultados ilustram que a ativação de células T pelas proteínas de fusão fornecidas é dependente de GPC3.

EXEMPLO 10

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T NA PRESENÇA DE CÉLULAS TUMORAIS QUE EXPRESSAM NÍVEIS DIFERENTES DE GPC3

[367] Um ensaio de células T adicional foi usado para avaliar a capacidade das proteínas de fusão exemplares de coestimular a ativação de células T de uma maneira dependente do alvo GPC3. As proteínas de fusão foram aplicadas em diferentes concentrações de anti-CD3 estimulou as células T, na presença de linhagem celular de tumores com diferentes níveis de expressão de GPC3. As linhagens de células tumorais testadas incluem HepG2, Hep3B, MKN-45 e NCI-N87 (alta a moderada: expressão: HepG2 > Hep3B > MKN-45, GPC3 negativo: NCI-N87). Os níveis de secreção de IL-2 foram medidos nos sobrenadantes.

[368] PBMCs de doadores voluntários saudáveis foram isoladas a partir da camada leuco-plaquetária e os linfócitos foram purificados a partir de

PBMCs como descrito no Exemplo 9.

[369] Para o ensaio, as células T foram descongeladas e colocadas em repouso em meio de cultura (meio RPMI-1640 + GlutaMAX, Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco) por 16 horas a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

[370] O procedimento a seguir foi realizado usando triplicatas para cada condição experimental: placas de cultura de tecido com fundos planos foram pré-revestidas com 0,25 µg/mL de anticorpo anti-CD3 por 2 h a 37°C e depois lavadas duas vezes com PBS. As linhagens de células tumorais HepG2, Hep3B, MKN-45 ou NIC-N87 foram tratadas durante 30 min com 30 µg/mL de mitomicina C (Sigma Aldrich) de modo a bloquear a proliferação. As células tumorais tratadas com mitomicina foram então lavadas duas vezes com PBS e semeadas a 8,3 x 10³ células por poço em meio de cultura para permitir a aderência durante a noite a 37°C em uma incubadora sob atmosfera de CO₂ a 5% umidificada. As células alvo haviam sido anteriormente cultivadas sob condições padrão, separadas usando Accutase (PAA Laboratories) e ressuspensas em meio de cultura.

[371] Nos dias seguintes, após a lavagem das placas por duas vezes com PBS, foram adicionadas 2,5 x 10⁴ células T por poço às células tumorais. Uma série de diluições de uma proteína de fusão exemplar (SEQ ID NOs: 87 e 82), do anticorpo GPC3 ou da muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão Fc) como incluída na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82 e SEQ ID NO: 98, respectivamente), de um anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27), ou de um controle isotópico (SEQ ID NOs: 24 e 25), tipicamente no intervalo de 0,26 nM a 10 nM, foram adicionados aos poços correspondentes. As placas foram cobertas com uma vedação permeável aos

gases e incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ umidificada durante 3 dias.

[372] Após 3 dias de cocultura, o nível de IL-2 no sobrenadante foi avaliado conforme descrito no Exemplo 9.

[373] Dados exemplificativos são mostrados na Figura 8. A cocultura de células Pan-T com as células HepG2 e Hep3B, expressando níveis elevados de GPC3, em presença da proteína de fusão SEQ ID NOs: 87 e 82 levou a um claro aumento na secreção de IL-2 em comparação ao controle isotípico hlgG₄. Além disso, a cocultura com MKN-45 (expressão moderada de GPC3) ou NIC-N87 (GPC3–negativo) não aumentou os níveis de secreção de IL-2 com a proteína de fusão. Os dados indicam que a atividade funcional das proteínas de fusão, medida pela capacidade de ativar células T ou aumentar a secreção de IL-2, é dependente de GPC3. Em contrapartida, a ativação de células T ou secreção de IL-2 induzida pelo anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) não é necessariamente dependente de GPC3 e difícil de prever.

EXEMPLO 11

AVALIAÇÃO DA CITÓLISE MEDIADA POR CÉLULAS T DE CÉLULAS TUMORAIS QUE EXPRESSAM GPC3 INDUZIDA POR PROTEÍNAS DE FUSÃO

[374] Um ensaio de morte de células T baseado em impedância foi empregado para avaliar a capacidade das proteínas de fusão em ativar a via de sinalização coestimuladora de CD137 e induzir a citólise mediada por células T de células tumorais que expressam GPC3. Para isso, células tumorais aderentes foram semeadas nos poços de uma placa de microtitulação eletrônica (placa E). A adesão das células aos microeletrodos de ouro impede o fluxo de corrente elétrica entre os eletrodos. Esta impedância é medida como o parâmetro de “índice celular” sem unidade. O índice celular (CI) aumenta à

medida que as células se fixam e, em seguida, proliferam ao longo do tempo. Células T CD8⁺ não aderentes, um anticorpo anti-CD3 que ativa antígenos de células T independentemente e moléculas de teste em diferentes concentrações foram adicionadas às células HepG2. A adição em si não causou alterações de impedância. Se as moléculas de teste coestimulam as células T citotóxicas através da ativação da via de sinalização de CD137, a citólise das células-alvo mediada por células T aumentaria e a destruição das células tumorais aderentes pelas células efetoras pode ser detectada como uma diminuição do CI, permitindo a geração de uma curva de morte em tempo real.

[375] As PBMCs de doadores voluntários saudáveis foram isoladas a partir da camada leuco-plaquetária. As células T CD8⁺ foram isoladas dessas PBMCs e armazenadas em nitrogênio líquido até uso posterior. Para o ensaio, as células T CD8⁺ foram descongeladas e permaneceram em repouso em meio de ensaio constituído por RPMI 1640 suplementado com SBF a 10% e 1% de Penicilina-Estreptomicina durante 24 h a 37°C em ambiente umidificado e 5% de CO₂.

[376] O procedimento a seguir foi realizado usando triplicatas para cada condição experimental. As linhagens de células tumorais HepG2 (linhagem de células de carcinoma hepatocelular, expressando GPC3) ou NCI-N87 (linhagem de células de carcinoma gástrico, GPC3–negativo) foram semeadas em uma placa E em meio de ensaio e incubadas por 24 h a 37°C em uma atmosfera umidificada e 5% de CO₂ para permitir a adesão e proliferação celular.

[377] No dia seguinte, um anticorpo anti-CD3 foi adicionado às células tumorais, seguindo-se da diluição seriada da proteína de fusão exemplar (SEQ ID NO: 87 e 82), de anticorpo para GPC3 ou muteína de

lipocalina específica para CD137 (fusão Fc) como a incluída na proteína de fusão (SEQ ID NO: 81 e 82 e SEQ ID NO: 98, respectivamente), de anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27), de uma determinada proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NO: 83), de uma muteína de lipocalina específica para GPC3 (Fc) (SEQ ID NO: 97), ou de um controle isotópico (SEQ ID NOs: 24 e 25). As células T CD8⁺ em repouso foram então adicionadas às células tumorais em uma proporção de 5:1. As placas foram cobertas com um selo permeável a gases e incubadas por 3 dias, durante os quais a impedância foi medida periodicamente.

[378] Os valores de IC foram representados graficamente em função do tempo usando o programa RTCA HT V 1.0.1 (ACEA Biosciences). O CI normalizado foi calculado como IC em um determinado ponto de tempo (20 h, 30 h, 40 h, 50 h, 60 h, 70 h após a adição de células efectoras) dividido pelo IC no ponto de tempo de normalização (primeira medição após adição de células efectoras). Para cada triplicata, o valor CI médio normalizado e o valor de DP correspondente foram usados para calcular o valor de morte específico usando a seguinte fórmula: $100 - (\text{CI médio normalizado da molécula teste} / \text{CI médio normalizado de células alvo e células efectoras}) \times 100$. Os valores de morte específicos foram exportados para o programa *GraphPad Prism v7* e plotados com os respectivos valores de EP contra os intervalos de tempo de interesse em um gráfico XY.

[379] Os resultados de experimentos exemplares são representados na Figura 9. Os dados mostram que a proteína de fusão SEQ ID NOs: 87 e 82 induziu uma lise mediada por células T dependente da dose de células HepG2 que expressam GPC3 (Figura 9 A–9C), ao passo que nenhuma lise específica de células NCI-N87 negativas alvo foi observada (Figura 9D), demonstrando que a ativação da via CD137 induzida pela proteína de fusão, levando à morte mediada por células T, é dependente de GPC3. A proteína de fusão fornecida SEQ ID NOs:

87 e 82 induziu um nível muito mais alto de morte de células alvo positivas para GPC3 por células T citotóxicas em comparação com uma quantidade equimolar da proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 previamente conhecida (SEQ ID NO: 83), do anticorpo GPC3 (SEQ ID NOs: 81 e 82), ou da muteína de lipocalina específica para GPC3 (fusão Fc) (SEQ ID NO: 97) (Figura 9C). Além disso, a muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão Fc) (SEQ ID NO: 98), o anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) e o controle isotípico hIgG₄ (SEQ ID NOs: 24 e 25) não induziram a morte mediada por células T CD8⁺ (Figura 9C).

[380] Outro experimento foi conduzido para demonstrar que a forte lise mediada por células T de células HepG2 pela proteína de fusão biespecífica CD137/GPC3 (SEQ ID NOs: 87 e 82) é dependente de seu design biespecífico, ao invés apenas da combinação de anti-GPC3 e anti-CD137. O experimento foi conduzido essencialmente tal como descrito acima, mas todas as construções foram adicionadas a 10 nM e foram comparados com um coquetel do anticorpo GPC3 (SEQ ID NO: 81 e 82) e anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) bem como um coquetel de anticorpo GPC3 (SEQ ID NO: 81 e 82) e muteína de lipocalina específica para CD137 (fusão de Fc) (SEQ ID NO: 98). Embora novamente uma lise mediada por células T forte foi detectada para a proteína de fusão de SEQ ID NOs: 87 e 82, a lise específica mediada por ambos os coquetéis foi apenas moderada, demonstrando o benefício deste formato biespecífico para conseguir a lise mediada por células T.

EXEMPLO 12

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL *IN VIVO* EM UM MODELO DE XENOENXERTO EM CAMUNDONGO ENXERTADO COM PBMCs HUMANAS

[381] A fim de investigar a atividade *in vivo* das proteínas de fusão fornecidas, foram utilizados camundongos NOG imunodeficientes enxertados com

células tumorais HepG2 humanas e PBMC humanas.

[382] Camundongos NOG de 4 a 6 semanas de idade foram injetados por via subcutânea (s.c.) com 5×10^6 células HepG2 em uma solução de matrigel/PBS (1:1). Os tumores foram autorizados a crescer até um tamanho de 80-100 mm³, momento em que o ponto de tempo foi definido como dia 0 do experimento. Os camundongos foram randomizados no dia 0 em grupos de tratamento (ou controle) de acordo com o tamanho do tumor e peso do animal. Os camundongos receberam 5×10^6 PBMCs humanas frescas por via intravenosa (i.v.) via injeção na veia caudal. Os camundongos receberam tratamento ou controle (PBS) via injeção intraperitoneal (i.p.) após a injeção i.v. de PBMCs no dia 1, e novamente receberam tratamento ou controle no dia 8 e dia 15. As moléculas em estudo incluíram uma proteína de fusão exemplar SEQ ID NOs: 87 e 82 (0,5, 5 ou 20 mg/kg), o anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82) (0,39 ou 3,9 mg/kg, concentração equimolar para o tratamento de 0,5 ou 5 mg/kg com a proteína de fusão), e um anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27) (3,9 mg/kg, concentração equimolar para o tratamento de 5 mg/kg com a proteína de fusão). O crescimento tumoral foi registrado a cada 3-4 dias. Os animais sem exposição à droga foram excluídos das análises de dados.

[383] Ao final do estudo (dia 16), os camundongos foram sacrificados e os tumores foram fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE). A análise histológica e imuno-histoquímica dos tumores foi realizada no *BioSiteHisto*. Tecido tumoral de xenoinxerto FFPE foi seccionado e corado com H&E ou com os marcadores de células T CD3, CD4 ou CD8. As lâminas coradas foram fotografadas e digitalizadas usando instrumentação 3D *Histech Panoramic MIDI* com objetiva 20 x. O *CaseViewer 2.2* foi usado para a microscopia de lâminas digitais e o programa *Imagem J* foi usado para a

análise baseada na área do tumor. Foi calculada a porcentagem de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) por área de tumor menos a área de necrose.

[384] A Figura 1 0 reflete a variação no volume tumoral, conforme medido no dia 2, dia 6, dia 9, dia 13, e dia 16 do estudo. A inibição do crescimento tumoral foi alcançada pela proteína de fusão SEQ ID NOs: 87 e 82 e pelo anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão SEQ ID NOs: 81 e 82. Tanto a proteína de fusão quanto o anticorpo GPC3 (a uma concentração de 5 ou 3,9 mg/kg, respectivamente) inibiram completamente o crescimento do tumor ao longo do estudo. Os efeitos da proteína de fusão e do anticorpo GPC3 foram dependentes da dose, como as concentrações mais baixas (0,5 ou 0,39 mg/kg) teve um efeito menor sobre o crescimento tumoral. Apenas um efeito limitado sobre o crescimento tumoral foi conseguido através do tratamento com o anticorpo CD137 de referência (SEQ ID NOs: 26 e 27).

[385] A Tabela 9 resume os dados obtidos pela análise histológica e imuno-histoquímica dos linfócitos infiltrantes do tumor. A infiltração intratumoral de células T CD3, CD4 ou CD8 é mostrada como % TILs por (área do tumor - área necrótica). O tratamento com a proteína de fusão levou à infiltração de células T em até 10% de (área do tumor - área necrótica) (todos os grupos de tratamento). Nenhuma infiltração intratumoral de células T foi induzida pelo tratamento com o anticorpo GPC3 ou anticorpo CD137 de referência em comparação com o controle com veículo.

TABELA 9

PORCENTAGEM DE LINFÓCITOS INFILTRANTES DE TUMOR (TILs) POR ÁREA DE TUMOR MENOS A ÁREA NECRÓTICA

	% céls. T CD3	% céls. T CD4	% céls. T CD8
Veículo	0,78	0,67	0,41
SEQ ID NOs: 87 e 82 0,5 mg/kg	6,19	4,65	4,52
SEQ ID NOs: 87 e 82 5 mg/kg	4,07	3,27	3,00

SEQ ID NOs: 87 e 82 20 mg/kg	10,7	4,86	7,29
SEQ ID NOs: 81 e 82 0,39 mg/kg	1,57	1,28	0,72
SEQ ID NOs: 81 e 82 3,9 mg/kg	0,75	0,6	0,49
SEQ ID NOs: 26 e 27 3,9 mg/kg	0,84	0,68	0,22

EXEMPLO 13

FARMACOCINÉTICA DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO EM CAMUNDONGOS

[386] As análises da farmacocinética de uma proteína de fusão representativa (SEQ ID NOs: 87 e 82) e do anticorpo GPC3 como incluído na proteína de fusão (SEQ ID NOs: 81 e 82) foram realizadas em camundongos e comparadas com as análises de duas proteínas de fusão biespecíficas CD137/GPC3 previamente conhecidas (SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84). Camundongos CD-1 machos com aproximadamente 5 semanas de idade (2 camundongos por ponto de tempo; Charles River Laboratories) receberam pela veia caudal a respectiva construção a uma dose de 2 mg/kg (SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 82) ou 10 mg/kg (SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84). As amostras de plasma dos camundongos foram obtidas nos pontos de tempo de 5 min, 24 h, 168 h e 336 h para construções baseadas em anticorpos e em 5 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 2 d, 3 d, 4 d, 7 d, 9 d, 11 d, 14 d e 21 d. Sangue total suficiente - coletado sob anestesia com isoflurano - foi coletado para obter pelo menos 30-50 µL de plasma coletado em Li-Heparina por animal e ponto de tempo. Os níveis de fármaco no plasma foram então analisados por ELISA.

[387] Para as SEQ ID NOs: 87 e 82 ou SEQ ID NOs: 81 e 82, foi usado o seguinte protocolo: GPC3 humana foi dissolvida em PBS (1 µg/mL) e revestida durante a noite em placas de microtitulação a 4°C. As placas foram lavadas por cinco vezes após cada etapa de incubação com 80 µL de PBS-0,05%T. As placas foram bloqueadas com PBS-0,1% de T-BSA a 2% durante 1 h em temperatura ambiente e subsequentemente lavadas. As amostras de

plasma foram diluídas em PBS-0,1%T/BSA-2% para uma concentração de plasma de 20%, adicionadas aos poços e incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Seguiu-se outra etapa de lavagem. Os agentes ligados em estudo foram detectados após 1 h de incubação com anticorpo anti-humano SULFO-TAG (Mesoscale Discovery) ou antissoro policlonal purificado por afinidade anti-NGAL a 1 µg/mL diluído em PBS-0,1%T-BSA-2%. Após uma etapa de lavagem adicional, 25 µL de tampão de leitura foram adicionados a cada poço e foi feita a leitura do sinal de eletroquimioluminescência (ECL) de cada poço utilizando um leitor *Mesoscale Discovery*.

[388] Para a SEQ ID NO: 83 ou SEQ ID NO: 84, foi usado o seguinte protocolo: CD137 humano foi dissolvido em PBS (1 µg/mL) e revestido durante a noite em placas de microtitulação a 4°C. As placas foram lavadas após cada etapa de incubação com 80 µL de PBS-0,05%T. As placas foram bloqueadas com PBS-0,1%T/BSA-0,2% durante 1 h à temperatura ambiente e subsequentemente novamente lavadas. As amostras de plasma foram diluídas em PBS-0,1%T/BSA-2% para uma concentração de plasma de 20%, adicionadas aos poços e incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Seguiu-se outra etapa de lavagem. Os agentes ligados em estudo foram detectados após 1 h de incubação com *Glypican-bio* humano e Streptavidina SULFO-tag a 1 µg/mL diluído em PBS-0,1%T-BSA-2%. Após uma etapa de lavagem adicional, 25 µL de tampão de leitura foram adicionados a cada poço e foi feita a leitura do sinal ECL de cada poço utilizando um leitor *Mesoscale Discovery*.

[389] Para a análise e quantificação de dados, uma curva de calibração com diluições de proteína padrão também foi preparada. A concentração plasmática ao longo do tempo para as moléculas teste em um experimento exemplar foi representada graficamente na Figura 12. Uma análise não compartimental foi aplicada aos dados usando o programa *Phoenix*

WinNonlin versão 8.1, e os resultados estão resumidos na Tabela 10.

[390] Os dados demonstram que a proteína de fusão fornecida SEQ ID NOs: 87 e 82 mostra farmacocinética de anticorpo típica, enquanto as proteínas de fusão biespecíficas CD137/GPC3 previamente conhecidas SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84 mostram perfis farmacocinéticos significativamente prejudicados.

TABELA 10

FARMACOCINÉTICA EM CAMUNDONGOS

SEQ ID NO	Meia-vida Terminal [h]	C _{máx} [µg/mL] / dose	AUC _{últ} [h*(µg/mL)]	Depuração [ml/kg/h]
SEQ ID NOs: 87 e 82	131,53	13,67	2834,55	0,00061
SEQ ID NOs: 81 e 82	228,12	15,15	4461,79	0,0003
SEQ ID NO: 83	20,04	15,76	2430,17	0,00411
SEQ ID NO: 84	11,42	11,26	1771,88	0,00564

EXEMPLO 14

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE PROTEÍNAS DE FUSÃO

[391] Para determinar as temperaturas de fusão (T_{ms}) das proteínas de fusão, que são um indicador geral da estabilidade geral, as moléculas de teste na concentração de proteína de 1 mg/mL em PBS (Gibco) foram escaneadas (25-100 °C) a 1°C/min, utilizando um instrumento nanoDSC capilar (CSC 6300, TA Instruments). As T_{ms} foram calculadas a partir do termograma exibido, utilizando o *software* Nano Analyze integrado.

[392] As temperaturas de fusão máximas resultantes, bem como a temperatura de início de fusão para proteínas de fusão exemplares, estão listadas na Tabela 11 abaixo. As proteínas de fusão de SEQ ID NOs: 72 e 82 e CD137Ac1-Fusão 2 tiveram termoestabilidade melhorada, em comparação com certas proteínas de fusão biespecíficas CD137/GPC3 previamente conhecidas de SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, e SEQ ID NOs: 26 e 102.

TABELA 11**T_m E TEMPERATURA DE INÍCIO DA FUSÃO CONFORME DETERMINADO POR NANO DSC**

	Início da fusão [°C]	T _m [°C]
SEQ ID NOs: 87 e 82	60,0	66,6 / 71,1
CD137Ac1-Fusão 2	60,0	66,6 / 70,9
SEQ ID NOs: 81 e 82	60,0	66,6 / 71,1
SEQ ID NO:83	57,5	67,3 / 71,7
SEQ ID NO: 84	59,0	67,6 / 70,7
SEQ ID NOs: 26 e 102	46,0	56,9 / 70,8

[393] Os exemplos de realização descritos de forma ilustrativa na presente divulgação podem ser adequadamente praticados na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não estejam especificamente divulgados no presente. Desta maneira, por exemplo, os termos “compreendendo”, “incluindo”, “contendo” e etc. devem ser interpretados de maneira expansiva e sem qualquer limitação. Adicionalmente, os termos e expressões empregados no presente foram utilizados como termos de descrição e não de limitação, e não há intenção no uso de tais termos e expressões de excluir qualquer equivalente das características mostradas e descritas ou suas porções, mas reconhece-se que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser compreendido que, apesar dos presentes exemplos de realização terem sido especificamente descritos como exemplos de realização preferidos e características opcionais, modificações e variações possam ser recorridas pelos especialistas na técnica, tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo desta invenção. Todas as patentes, pedidos de patentes, livros e publicações revisadas por pares descritas na presente invenção são integralmente incorporados pela referência. Além disso, quando uma definição ou uso de um termo em uma referência, que é integralmente incorporada ao presente pela referência, é inconsistente ou contrária à definição do mesmo termo aqui fornecido, aplica-se a definição do termo aqui

fornecido e não a definição do referido termo nas referências. Cada uma das espécies mais restritas e agrupamentos subgenéricos abrangidos na divulgação genérica também fazem parte da invenção. Isto inclui a descrição genérica da invenção com uma condição ou limitação negativa que remove qualquer matéria do gênero, independentemente se a matéria retirada é ou não explicitamente descrita no presente documento. Além disso, quando características são descritas nos termos de grupos Markush, os técnicos no assunto reconhecerão que a divulgação também é descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush. Outros exemplos de realização tornar-se-ão evidentes a partir das seguintes reivindicações.

[394] Equivalentes: Os técnicos hábeis no assunto irão reconhecer, ou serão capazes de verificar pelo uso de não mais do que a experimentação de rotina, que existem muitos equivalentes para os exemplos de realizações específicos da presente invenção. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos pelas reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados neste relatório descritivo são incorporados ao presente pela referência como se cada publicação de patente ou pedido de patente individual tivesse sido especificamente e individualmente indicado como incorporado ao presente pela referência.

VI. REFERÊNCIAS NÃO PATENTÁRIAS

[395] 1. CHENG, W., TSENG, C. J., LIN, T. T., CHENG, I., PAN, H. W., HSU, H. C. & LEE, Y. M. 2008. *Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. Carcinogenesis*, 29, 1319-26.

[396] 2. SONG, H. H., SHI, W., XIANG, Y. Y. & FILMUS, J.

2005. *The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling. J Biol Chem*, 280, 2116-25.

[397] 3. SONG, H. H., SHI, W. & FILMUS, J. 1997. *OCI-5/rat glypican-3 binds to fibroblast growth factor-2 but not to insulin-like growth factor-2. J Biol Chem*, 272, 7574-7.

[398] 4. PILIA, G., HUGHES-BENZIE, R. M., MACKENZIE, A., BAYBAYAN, P., CHEN, E. Y., HUBER, R., NERI, G., CAO, A., FORABOSCO, A. & SCHLESSINGER, D. 1996. *Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. Nat Genet*, 12, 241-7.

[399] 5. AYDIN, O., YILDIZ, L., BARIS, S., DUNDAR, C. & KARAGOZ, F. 2015. *Expression of Glypican 3 in low and high grade urothelial carcinomas. Diagn Pathol*, 10, 34.

[400] 6. USHIKU, T., UOZAKI, H., SHINOZAKI, A., OTA, S., MATSUZAKA, K., NOMURA, S., KAMINISHI, M., ABURATANI, H., KODAMA, T. & FUKAYAMA, M. 2009. *Glypican 3-expressing gastric carcinoma: distinct subgroup unifying hepatoid, clear-cell, and alpha-fetoprotein-producing gastric carcinomas. Cancer Sci*, 100, 626-32.

[401] 7. GAILEY, M. P. & BELLIZZI, A. M. 2013. *Immunohistochemistry for the novel markers glypican 3, PAX8, and p40 (DeltaNp63) in squamous cell and urothelial carcinoma. Am J Clin Pathol*, 140, 872-80.

[402] 8. YAMANAKA, K., ITO, Y., OKUYAMA, N., NODA, K., MATSUMOTO, H., YOSHIDA, H., MIYAUCHI, A., CAPURRO, M., FILMUS, J. & MIYOSHI, E. 2007. *Immunohistochemical study of glypican 3 in thyroid cancer. Oncology*, 73, 389-94.

[403] 9. NAKATSURA, T., KAGESHITA, T., ITO, S.,

WAKAMATSU, K., MONJI, M., IKUTA, Y., SENJU, S., ONO, T. & NISHIMURA, Y. 2004. *Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. Clin Cancer Res*, 10, 6612-21.

[404] 10. ZYNGER, D. L., DIMOV, N. D., LUAN, C., TEH, B. T. & YANG, X. J. 2006. *Glypican 3: a novel marker in testicular germ cell tumors. Am J Surg Pathol*, 30, 1570-5.

[405] 11. MONTALBANO, M., RASTELLINI, C., WANG, X., CORSELLO, T., ELTORKY, M. A., VENTO, R. & CICALESSE, L. 2016. *Transformation of primary human hepatocytes in hepatocellular carcinoma. Int J Oncol*, 48, 1205-17.

[406] 12. MIDORIKAWA, Y., ISHIKAWA, S., IWANARI, H., IMAMURA, T., SAKAMOTO, H., MIYAZONO, K., KODAMA, T., MAKUUCHI, M. & ABURATANI, H. 2003. *Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. Int J Cancer*, 103, 455-65.

[407] 13. CAPURRO, M., WANLESS, I. R., SHERMAN, M., DEBOER, G., SHI, W., MIYOSHI, E. & FILMUS, J. 2003. *Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology*, 125, 89-97.

[408] 14. NAKATSURA, T., YOSHITAKE, Y., SENJU, S., MONJI, M., KOMORI, H., MOTOMURA, Y., HOSAKA, S., BEPPU, T., ISHIKO, T., KAMOHARA, H., ASHIHARA, H., KATAGIRI, T., FURUKAWA, Y., FUJIYAMA, S., OGAWA, M., NAKAMURA, Y. & NISHIMURA, Y. 2003. *Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. Biochem Biophys Res Commun*, 306, 16-25.

[409] 15. SUNG, Y. K., HWANG, S. Y., PARK, M. K., FAROOQ, M., HAN, I. S., BAE, H. I., KIM, J. C. & KIM, M. 2003. *Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Cancer Sci*, 94, 259-62.

[410] 16. ZHU, Z. W., FRIESS, H., WANG, L., ABOU-SHADY, M., ZIMMERMANN, A., LANDER, A. D., KORC, M., KLEEFF, J. & BUCHLER, M. W. 2001. *Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. Gut*, 48, 558-64.

[411] 17. JELIC, S., SOTIROPOULOS, G. C. & GROUP, E. G. W. 2010. *Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v59-64.

[412] 18. FENG, M. & HO, M. 2014. *Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer. FEBS Lett*, 588, 377-82.

[413] 19. TAKAI, H., KATO, A., KINOSHITA, Y., ISHIGURO, T., TAKAI, Y., OHTANI, Y., SUGIMOTO, M. & SUZUKI, M. 2009. *Histopathological analyses of the antitumor activity of anti-glypican-3 antibody (GC33) in human liver cancer xenograft models: The contribution of macrophages. Cancer Biol Ther*, 8, 930-8.

[414] 20. NAKANO, K., ORITA, T., NEZU, J., YOSHINO, T., OHIZUMI, I., SUGIMOTO, M., FURUGAKI, K., KINOSHITA, Y., ISHIGURO, T., HAMAKUBO, T., KODAMA, T., ABURATANI, H., YAMADA-OKABE, H. & TSUCHIYA, M. 2009. *Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun*, 378, 279-84.

[415] 21. ISHIGURO, T., SUGIMOTO, M., KINOSHITA, Y., MIYAZAKI, Y., NAKANO, K., TSUNODA, H., SUGO, I., OHIZUMI, I., ABURATANI, H., HAMAKUBO, T., KODAMA, T., TSUCHIYA, M. & YAMADA-OKABE, H. 2008. *Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. Cancer Res*, 68, 9832-8.

[416] 22. LI, S. Y. & LIU, Y. 2013. *Immunotherapy of melanoma with the immune costimulatory monoclonal antibodies targeting CD137. Clin Pharmacol*, 5, 47-53.

[417] 23. SNELL, L. M., LIN, G. H., MCPHERSON, A. J., MORAES, T. J. & WATTS, T. H. 2011. *T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. Immunol Rev*, 244, 197-217.

[418] 24. WYZGOL, A., MULLER, N., FICK, A., MUNKEL, S., GRIGOLEIT, G. U., PFIZENMAIER, K. & WAJANT, H. 2009. *Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. J Immunol*, 183, 1851-61.

[419] 25. YAO, S., ZHU, Y. & CHEN, L. 2013. *Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov*, 12, 130-46.

[420] 26. MELERO, I., BACH, N., HELLSTROM, K. E., ARUFFO, A., MITTLER, R. S. & CHEN, L. 1998. *Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. Eur J Immunol*, 28, 1116-21.

[421] 27. YANG, Y., YANG, S., YE, Z., JAFFAR, J., ZHOU, Y., CUTTER, E., LIEBER, A., HELLSTROM, I. & HELLSTROM, K. E. 2007. *Tumor cells expressing anti-CD137 scFv induce a tumor-destructive environment. Cancer Res*, 67, 2339-44.

[422] 28. ZHANG, H., KNUTSON, K. L., HELLSTROM, K. E., DISIS, M. L. & HELLSTROM, I. 2006. *Antitumor efficacy of CD137 ligation is maximized by the use of a CD137 single-chain Fv-expressing whole-cell tumor vaccine compared with CD137-specific monoclonal antibody infusion. Mol Cancer Ther*, 5, 149-55.

[423] 29. YE, Z., HELLSTROM, I., HAYDEN-LEDBETTER, M., DAHLIN, A., LEDBETTER, J. A. & HELLSTROM, K. E. 2002. *Gene therapy for*

cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. Nat Med, 8, 343-8.

[424] 30. MARTINET, O., DIVINO, C. M., ZANG, Y., GAN, Y., MANDELI, J., THUNG, S., PAN, P. Y. & CHEN, S. H. 2002. *T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. Gene Ther, 9, 786-92.*

[425] 31. YE, Q., SONG, D. G., POUSSIN, M., YAMAMOTO, T., BEST, A., LI, C., COUKOS, G. & POWELL, D. J., JR. 2014. *CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. Clin Cancer Res, 20, 44-55.*

[426] 32. CHACON, J. A., WU, R. C., SUKHUMALCHANDRA, P., MOLLIDREM, J. J., SARNAIK, A., PILON-THOMAS, S., WEBER, J., HWU, P. & RADVANYI, L. 2013. *Co-stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. PLoS One, 8, e60031.*

[427] 33. FISHER, T. S., KAMPERSCHROER, C., OLIPHANT, T., LOVE, V. A., LIRA, P. D., DOYONNAS, R., BERGQVIST, S., BAXI, S. M., ROHNER, A., SHEN, A. C., HUANG, C., SOKOLOWSKI, S. A. & SHARP, L. L. 2012. *Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. Cancer Immunol Immunother, 61, 1721-33.*

[428] 34. SKERRA, A. 2000. *Lipocalins as a scaffold. Biochim Biophys Acta, 1482, 337-50.*

[429] 35. FLOWER, D. R., NORTH, A. C. & SANSOM, C. E. 2000. *The lipocalin protein family: structural and sequence overview. Biochim Biophys Acta, 1482, 9-24.*

[430] 36. FLOWER, D. R. 1996. *The lipocalin protein family:*

structure and function. Biochem J, 318 (Pt 1), 1-14.

[431] 37. ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.

[432] 38. ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. *Basic local alignment search tool. J Mol Biol*, 215, 403-10.

[433] 39. SMITH, T. F. & WATERMAN, M. S. 1981. *Identification of common molecular subsequences. J Mol Biol*, 147, 195-7.

[434] 40. WARD, E. S., GUSSOW, D., GRIFFITHS, A. D., JONES, P. T. & WINTER, G. 1989. *Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. Nature*, 341, 544-6.

[435] 41. HOLLIGER, P., PROSPERO, T. & WINTER, G. 1993. *"Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6444-8.

[436] 42. JOHNSON, G. & WU, T. T. 2000. *Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. Nucleic Acids Res*, 28, 214-8.

[437] 43. EHRENMANN, F., KAAS, Q. & LEFRANC, M. P. 2010. *IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic Acids Res*, 38, D301-7.

[438] 44. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., ZHANG, J., DRANOFF, G., WILSON, N. S. & BROGDON, J. L. 2014. *OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcγR3s, leading to antitumor*

efficacy. Immunol Cell Biol, 92, 475-80.

[439] 45. BULLIARD, Y., JOLICOEUR, R., WINDMAN, M., RUE, S. M., ETTENBERG, S., KNEE, D. A., WILSON, N. S., DRANOFF, G. & BROGDON, J. L. 2013. *Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. J Exp Med*, 210, 1685-93.

[440] 46. SPIESS, C., ZHAI, Q. & CARTER, P. J. 2015. *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol*, 67, 95-106.

[441] 47. SEDYKH, S. E., PRINZ, V. V., BUNEVA, V. N. & NEVINSKY, G. A. 2018. *Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. Drug Des Devel Ther*, 12, 195-208.

[442] 48. ALAVIJEH, M. S. & PALMER, A. M. 2004. *The pivotal role of drug metabolism and pharmacokinetics in the discovery and development of new medicines. IDrugs*, 7, 755-63.

[443] 49. RYMAN, J. T. & MEIBOHM, B. 2017. *Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 6, 576-588.

[444] 50. SILVA, J. P., VETTERLEIN, O., JOSE, J., PETERS, S. & KIRBY, H. 2015. *The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation. J Biol Chem*, 290, 5462-9.

[445] 51. GLAESNER, W., VICK, A. M., MILLICAN, R., ELLIS, B., TSCHANG, S. H., TIAN, Y., BOKVIST, K., BRENNER, M., KOESTER, A., PORKSEN, N., ETGEN, G. & BUMOL, T. 2010. *Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. Diabetes Metab Res Rev*, 26, 287-96.

[446] 52. DALL'ACQUA, W. F., KIENER, P. A. & WU, H. 2006. *Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). J Biol Chem*, 281, 23514-24.

[447] 53. ZALEVSKY, J., CHAMBERLAIN, A. K., HORTON, H. M., KARKI, S., LEUNG, I. W., SPROULE, T. J., LAZAR, G. A., ROOPENIAN, D. C. & DESJARLAIS, J. R. 2010. *Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. Nat Biotechnol*, 28, 157-9.

[448] 54. SHIELDS, R. L., NAMENUK, A. K., HONG, K., MENG, Y. G., RAE, J., BRIGGS, J., XIE, D., LAI, J., STADLEN, A., LI, B., FOX, J. A. & PRESTA, L. G. 2001. *High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. J Biol Chem*, 276, 6591-604.

[449] 55. ALTSHULER, E. P., SEREBRYANAYA, D. V. & KATRUKHA, A. G. 2010. *Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. Biochemistry (Mosc)*, 75, 1584-605.

[450] 56. HARLOW, E. & LANE, D. 1999. *Using antibodies : a laboratory manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

[451] 57. HARLOW, E. & LANE, D. 1988. *Antibodies : a laboratory manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.*

[452] 58. LI, J., SAI, T., BERGER, M., CHAO, Q., DAVIDSON, D., DESHMUKH, G., DROZDOWSKI, B., EBEL, W., HARLEY, S., HENRY, M., JACOB, S., KLINE, B., LAZO, E., ROTELLA, F., ROUTHIER, E., RUDOLPH, K., SAGE, J., SIMON, P., YAO, J., ZHOU, Y., KAVURU, M., BONFIELD, T., THOMASSEN, M. J., SASS, P. M., NICOLAIDES, N. C. & GRASSO, L. 2006. *Human antibodies for immunotherapy development generated via a human B*

cell hybridoma technology. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 3557-62.

[453] 59. KOZBOR, D. & RODER, J. C. 1983. *The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes. Immunol Today*, 4, 72-9.

[454] 60. COLE, S. P., CAMPLING, B. G., LOUWMAN, I. H., KOZBOR, D. & RODER, J. C. 1984. *A strategy for the production of human monoclonal antibodies reactive with lung tumor cell lines. Cancer Res*, 44, 2750-3.

[455] 61. HOLLIGER, P. & HUDSON, P. J. 2005. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol*, 23, 1126-36.

[456] 62. PERVAIZ, S. & BREW, K. 1987. *Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. FASEB J*, 1, 209-14.

[457] 63. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[458] 64. FLOWER, D. R. 2000. *Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. Biochim Biophys Acta*, 1482, 327-36.

[459] 65. BREUSTEDT, D. A., KORNDORFER, I. P., REDL, B. & SKERRA, A. 2005. *The 1.8-A crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. J Biol Chem*, 280, 484-93.

[460] 66. SCHMIDT, T. G., KOEPKE, J., FRANK, R. & SKERRA, A. 1996. *Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. J Mol Biol*, 255, 753-66.

[461] 67. VAJO, Z. & DUCKWORTH, W. C. 2000. *Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millenium. Pharmacol Rev*, 52, 1-9.

[462] 68. FUERTGES, F. & ABUCHOWSKI, A. 1990. *The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. Journal of Controlled Release*, 11, 139-148.

[463] 69. DENNIS, M. S., ZHANG, M., MENG, Y. G., KADKHODAYAN, M., KIRCHHOFER, D., COMBS, D. & DAMICO, L. A. 2002. *Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. J Biol Chem*, 277, 35035-43.

[464] 70. KONIG, T. & SKERRA, A. 1998. *Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. J Immunol Methods*, 218, 73-83.

[465] 71. OSBORN, B. L., OLSEN, H. S., NARDELLI, B., MURRAY, J. H., ZHOU, J. X., GARCIA, A., MOODY, G., ZARITSKAYA, L. S. & SUNG, C. 2002. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. J Pharmacol Exp Ther*, 303, 540-8.

[466] 72. LOWMAN, H. B. 1997. *Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26, 401-24.

[467] 73. RODI, D. J. & MAKOWSKI, L. 1999. *Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. Curr Opin Biotechnol*, 10, 87-93.

[468] 74. VENTURI, M., SEIFERT, C. & HUNTE, C. 2002. *High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. J Mol Biol*, 315, 1-8.

[469] 75. BRUCKDORFER, T., MARDER, O. & ALBERICIO, F. 2004. *From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future. Curr Pharm Biotechnol*, 5, 29-43.

[470] 76. FRESE, K., EISENMANN, M., OSTENDORP, R., BROCKS, B. & PABST, S. 2013. *An automated immunoassay for early specificity profiling of antibodies*. *MAbs*, 5, 279-87.

REIVINDICAÇÕES

1. PROTEÍNA DE FUSÃO capaz de se ligar ao CD137 e GPC3, caracterizada por compreender pelo menos duas subunidades em qualquer ordem, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno desta e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137.

2. PROTEÍNA DE FUSÃO, caracterizada por compreender pelo menos duas subunidades, em que uma primeira subunidade compreende uma imunoglobulina de comprimento total ou um domínio de ligação ao antígeno da mesma e é específica para GPC3, e em que uma segunda subunidade compreende uma muteína de lipocalina e é específica para CD137, em que a segunda subunidade está ligada pelo N-terminal ao C-terminal de cada cadeia pesada da primeira subunidade, opcionalmente por um ligante.

3. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada:

(a) pela proteína de fusão ser capaz de se ligar à GPC3 com um valor K_D de, no máximo, cerca de 1 nM ou comparável, ou menor, do que o valor K_D da imunoglobulina ou um domínio de ligação ao antígeno que está incluído na primeira subunidade sozinho;

(b) pela proteína de fusão ser capaz de se ligar ao CD137 com um valor de EC_{50} de, no máximo, cerca de 3 nM, ou comparável, ou menor do que o valor de EC_{50} da muteína de lipocalina específica para CD137 que está incluída na segunda subunidade sozinha;

(c) pela proteína de fusão apresentar reação cruzada com GPC3 de cinomolgo;

(d) pela proteína de fusão ser capaz de se ligar

simultaneamente ao CD137 e GPC3 com valores de EC_{50} de no máximo cerca de 10 nM, quando a referida proteína de fusão é medida em um ensaio ELISA;

(e) pela proteína de fusão ser capaz de se ligar às células tumorais que expressam GPC3;

(f) pela proteína de fusão ser capaz de induzir secreção aumentada de IL-2;

(g) pela proteína de fusão ser capaz de induzir secreção aumentada de IL-2 a um nível mais alto do que a indução conseguida com a SEQ ID NO: 83 e/ou com uma melhor eficiência em comparação com a SEQ ID NO: 83;

(h) pela proteína de fusão ser capaz de induzir citotoxicidade mediada por linfócitos;

(i) pela proteína de fusão ser capaz de induzir a morte aumentada de células tumorais que expressam GPC3 mediadas por células T do que a SEQ ID NO: 83 e/ou induzir a ativação de células T citotóxicas com uma melhor eficácia em comparação com a SEQ ID NO: 83;

(j) pela proteína de fusão ser capaz de coestimular respostas de células T de uma maneira dependente de GPC3; ou

(k) pela proteína de fusão ser capaz de coestimular respostas de células T em um microambiente tumoral.

4. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pela proteína de fusão ter uma meia-vida em camundongos de pelo menos 50 horas, pelo menos 75 horas, pelo menos 100 horas, pelo menos 125 horas, pelo menos 150 horas, pelo menos 175 horas, pelo menos 200 horas, pelo menos 250 horas, ou ainda mais, e/ou definida pela proteína de fusão ter uma meia-vida em camundongos que é mais longa do que a proteína de SEQ ID NO: 83.

5. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pela proteína de fusão ter um ponto isoelétrico de pelo menos 6,5, pelo menos 6,8, pelo menos 7,1, pelo menos 7,4, pelo menos 7,5, pelo menos 7,7 ou ainda maior, e/ou definida pela proteína de fusão tem um ponto isoelétrico maior do que o da proteína de SEQ ID NO: 83.

6. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pela muteína de lipocalina compreender um ou mais resíduos de aminoácido mutados nas posições correspondentes às posições 28, 36, 40-41, 49, 52, 65, 68, 70, 72 -73, 77, 79, 81, 83, 87, 94, 96, 100, 103, 106, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) madura (SEQ ID NO: 2).

7. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pela muteína de lipocalina compreender um ou mais resíduos de aminoácido mutados nas posições correspondentes às posições 20, 25, 28, 33, 36, 40-41, 44, 49, 52, 59, 68, 70-73, 77-82, 87, 92, 96, 98, 100, 101, 103, 122, 125, 127, 132 e 134 da sequência polipeptídica linear da lipocalina associada à gelatinase neutrofílica humana (hNGAL) madura (SEQ ID NO: 2).

8. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência polipeptídica linear da hNGAL madura (SEQ ID NO: 2):

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys

73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106

→ Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; e Lys 134 → Tyr;

(j) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(k) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Lys 98 → Arg; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(l) Asn 25 → Tyr; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu;

Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Gln; Phe 92 → Ser; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(m) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Tyr 78 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(n) Asn 25 → Asp; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(o) Val 33 → Ile; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(p) Gln 20 → Arg; Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Val; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Phe 122 → Tyr; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(q) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Ile 80 → Asn; Arg 81 → Trp; Thr 82 → Pro; Asn 96 →

Phe; Tyr 100 → Asp; Pro 101 → Leu; Leu 103 → Pro; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly;

(r) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Gln 49 → His; Tyr 52 → Gly; Lys 59 → Asn; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Gln; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly; e

(s) Leu 36 → Met; Ala 40 → Asn; Ile 41 → Leu; Glu 44 → Asp; Gln 49 → His; Tyr 52 → Ser; Ser 68 → Asp; Leu 70 → Met; Phe 71 → Leu; Arg 72 → Leu; Lys 73 → Asp; Asp 77 → His; Trp 79 → Ile; Arg 81 → Trp; Phe 92 → Leu; Asn 96 → Phe; Tyr 100 → Asp; Leu 103 → His; Lys 125 → Ser; Ser 127 → Ile; Tyr 132 → Trp; e Lys 134 → Gly.

9. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina possuir pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 39-57.

10. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pela muteína de lipocalina compreender um ou mais resíduos de aminoácidos mutados em posições correspondentes às posições 5, 26-31, 33-34, 42, 46, 52, 56, 58, 60-61, 65, 71, 85, 94, 101, 104-106, 108, 111, 114, 121, 133, 148, 150 e 153 da sequência polipeptídica linear da lipocalina lacrimal humana madura (SEQ ID NO: 1).

11. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e 10, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina compreender um dos seguintes conjuntos de resíduos de aminoácidos mutados em comparação com a sequência polipeptídica linear da

lipocalina de lágrima humana madura (SEQ ID NO: 1):

(a) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; e Cys 153 → Ser;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(c) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; e Cys 153 → Ser;

(e) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114

→ Trp; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser;

(f) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser; e

(g) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; e Cys 153 → Ser.

12. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 e 10 a 11, caracterizada pela sequência de aminoácidos da muteína de lipocalina possuir pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 32-38.

13. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pela segunda subunidade estar ligada no N-terminal através de um ligante ao N-terminal ou C-terminal de cada região constante de cadeia pesada (C_H) da primeira subunidade ou ao N-terminal ou C-terminal de cada região constante da cadeia leve (C_L) da primeira subunidade.

14. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo anticorpo compreender uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, respectivamente, como segue: SEQ ID NOs: 78 e 79, SEQ ID NOs: 129 e 79,

SEQ ID NOs: 114 e 115, ou SEQ ID NOs: 126 e 127, ou região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve que têm uma sequência com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou mais, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 78 e 79, SEQ ID NOs: 129 e 79, SEQ ID NOs: 114 e 115, ou SEQ ID NOs: 126 e 127.

15. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pela cadeia pesada do anticorpo compreender o seguinte conjunto de sequências de CDR: GYTFTDYE (HCDR1, SEQ ID NO: 72), LDPKTGDT (HCDR2, SEQ ID NO: 73), TRFYSYTY (HCDR3; SEQ ID NO: 74), e pela cadeia leve do anticorpo compreender o seguinte conjunto de sequências de CDR: QSLVHSNRNTY (LCDR1, SEQ ID NO: 75), KVS (LCDR2), SQNTHVPPT (LCDR3; SEQ ID NO: 77).

16. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo anticorpo ter uma estrutura de IgG₄.

17. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pela estrutura de IgG₄ ter uma ou mais das seguintes mutações: S228P, N297A, F234A, L235A, M428L, N434S, M252Y, S254T e T256E.

18. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizada pela proteína de fusão compreender os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 87 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 88 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 89, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 90, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 91 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 92 e 82, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 93, os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 81 e 94, os aminoácidos mostrados

nas SEQ ID NOs: 95 e 82 ou os aminoácidos mostrados nas SEQ ID NOs: 96 e 82.

19. PROTEÍNA DE FUSÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pela proteína de fusão compreender sequências de aminoácidos com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 92%, pelo menos 95%, em pelo menos 97% ou pelo menos 98% de identidade de sequência, ou uma identidade até mesmo maior, com as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 87 e 82, SEQ ID NOs: 88 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 89, SEQ ID NOs: 81 e 90, SEQ ID NOs: 91 e 82, SEQ ID NOs: 92 e 82, SEQ ID NOs: 81 e 93, SEQ ID NOs: 81 e 94, SEQ ID NOs: 95 e 82, ou SEQ ID NOs: 96 e 82.

20. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, caracterizada por compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 19.

21. MÉTODO DE PRODUÇÃO da proteína de fusão, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pela proteína de fusão ser produzida a partir do ácido nucleico codificante da proteína de fusão.

22. MÉTODO DE ATIVAR SIMULTANEAMENTE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO a jusante de CD137 e a ligação de células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

23. MÉTODO DE COESTIMULAR CÉLULAS T e envolver células tumorais GPC3-positivas simultaneamente, caracterizado por

compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido compreendendo um tumor.

24. MÉTODO DE INDUZIR UMA RESPOSTA DE LINFÓCITOS localizada na proximidade de células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreender a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 19 ou uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido compreendendo um tumor.

25. MÉTODO DE INDUZIR O AUMENTO DA CITÓLISE mediada por linfócitos de células tumorais GPC3-positivas, caracterizado por compreende a aplicação de uma ou mais proteínas de fusão conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 19; ou de uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

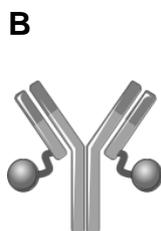
26. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender uma ou mais proteínas de fusão, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 19.

27. MÉTODO PARA PREVENIR, MELHORAR OU TRATAR CÂNCERES GPC3-positivos, caracterizado por compreender a aplicação da proteína de fusão conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 19; ou uma ou mais composições compreendendo tal proteína de fusão a um tecido que compreende um tumor.

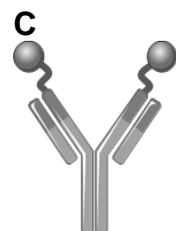
Figura 1



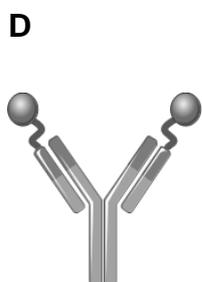
SEQ ID NOs: 87 e 82
 SEQ ID NOs: 91 e 82
 SEQ ID NOs: 95 e 82
 SEQ ID NOs: 96 e 82



SEQ ID NOs: 81 e 89
 SEQ ID NOs: 81 e 93



SEQ ID NOs: 88 e 82
 SEQ ID NOs: 92 e 82



SEQ ID NOs: 81 e 90
 SEQ ID NOs: 81 e 94

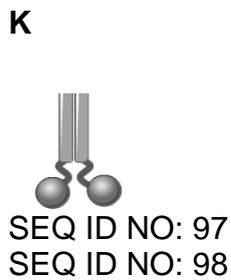
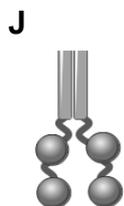
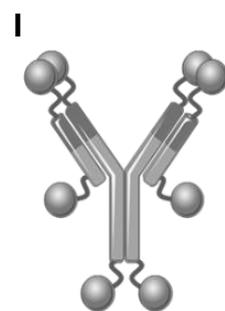
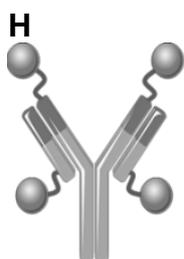
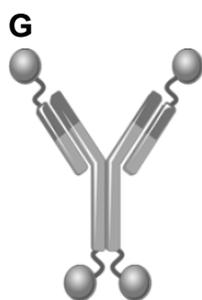
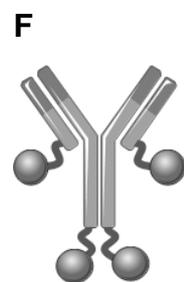
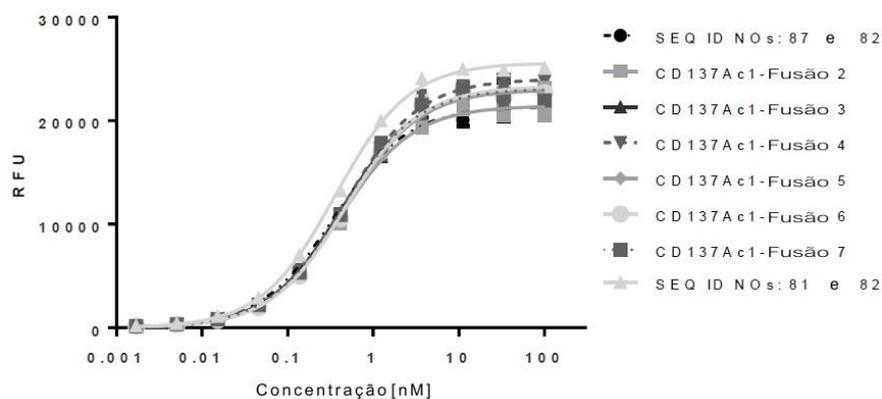
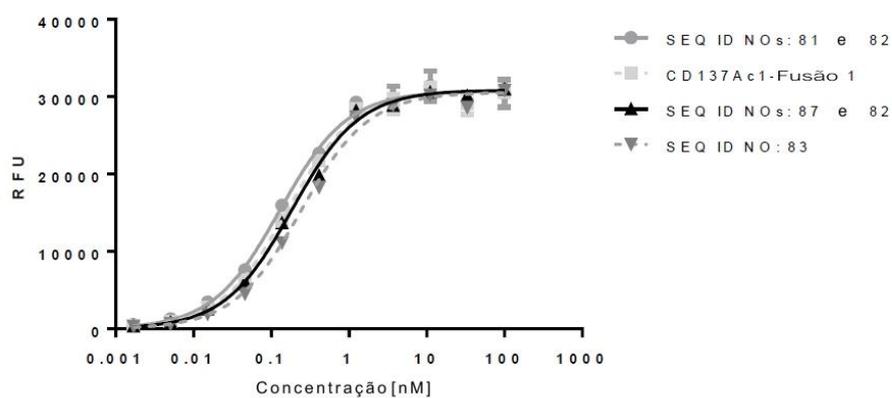


Figura 2

A. Ligação à GPC3 humana



B. Ligação à GPC3 de cinomolgos

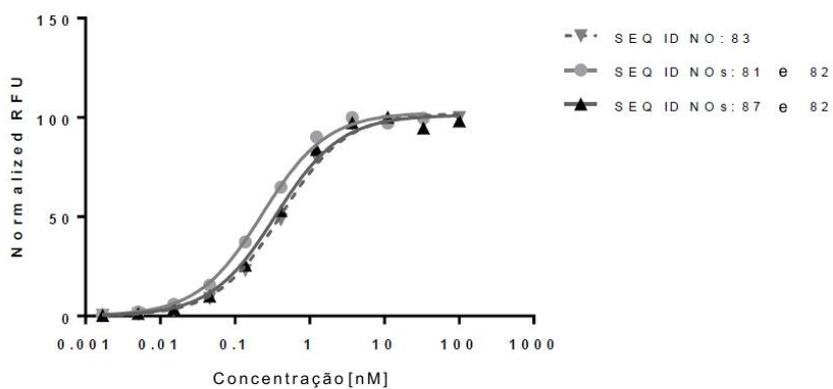


Figura 2 (Cont.)

C. Ligação ao CD137 humano

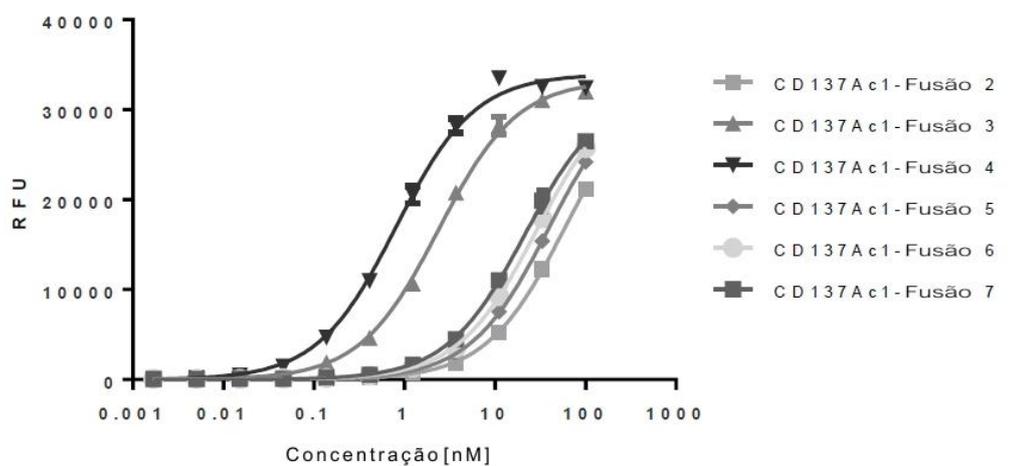
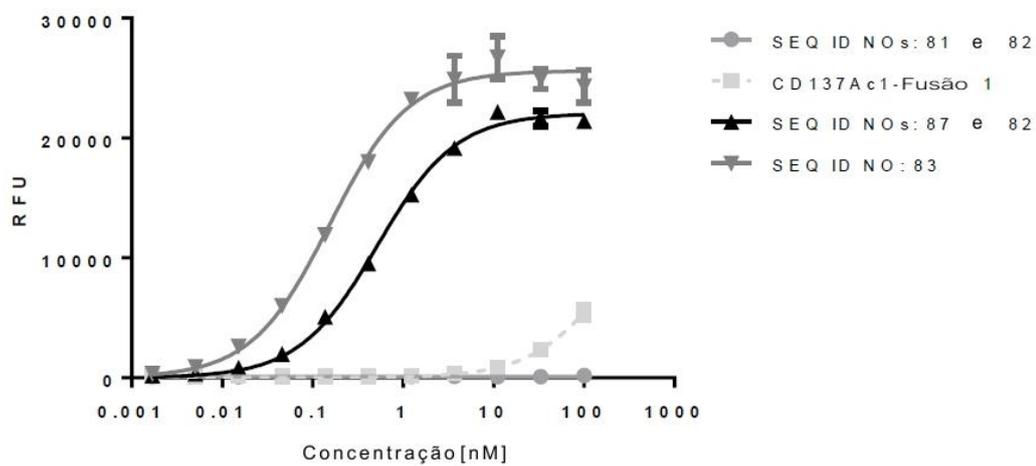
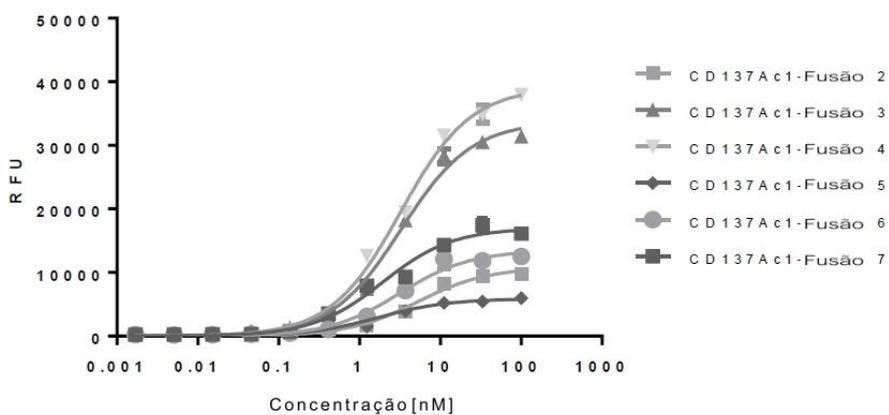
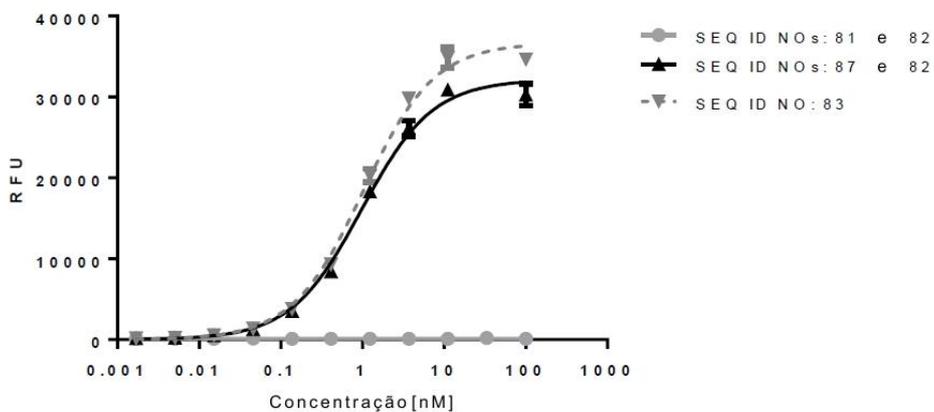


Figura 3

A. Detecção GPC3 captura_CD137



B. Detecção CD137 captura_GPC3

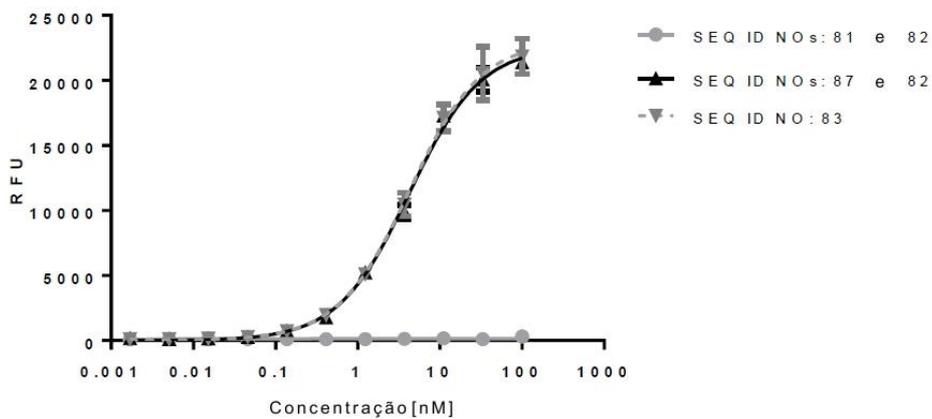


Figura 4

A

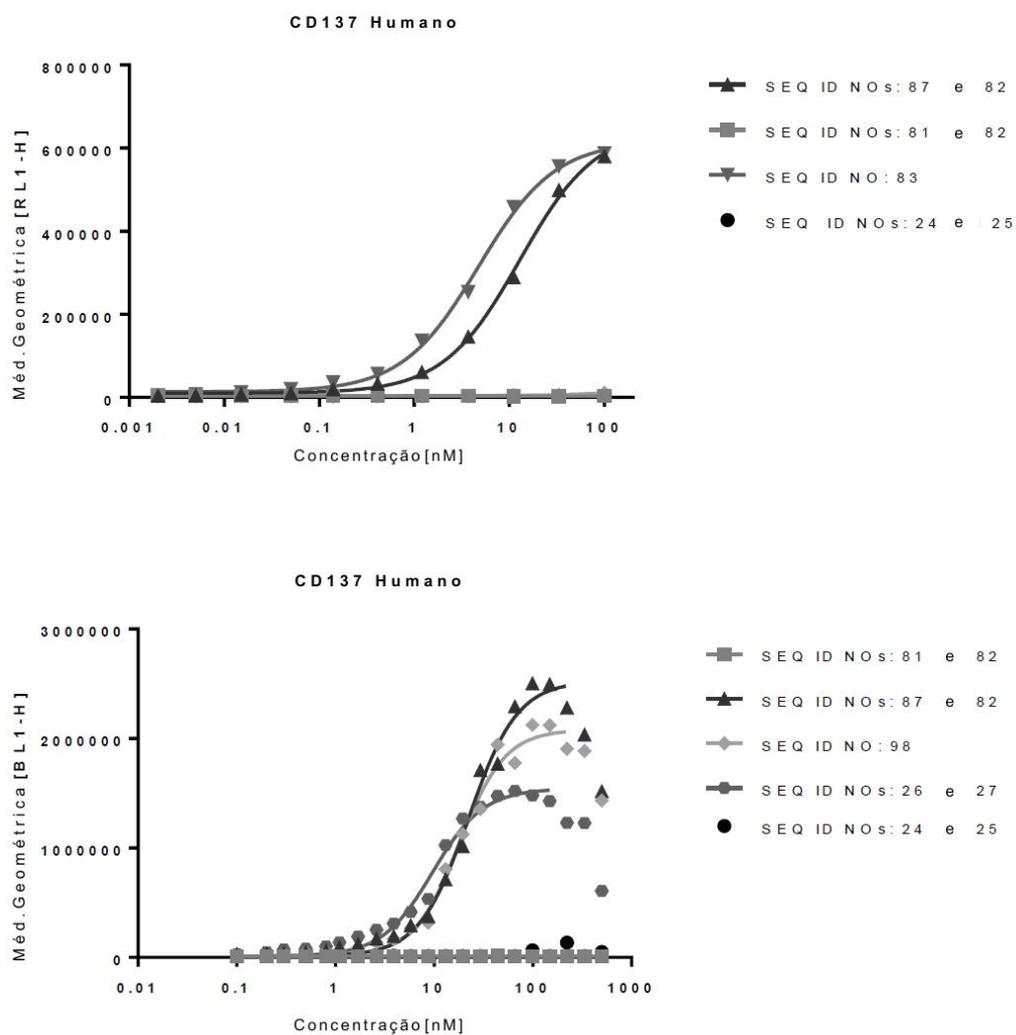


Figura 4 (Cont.)

B

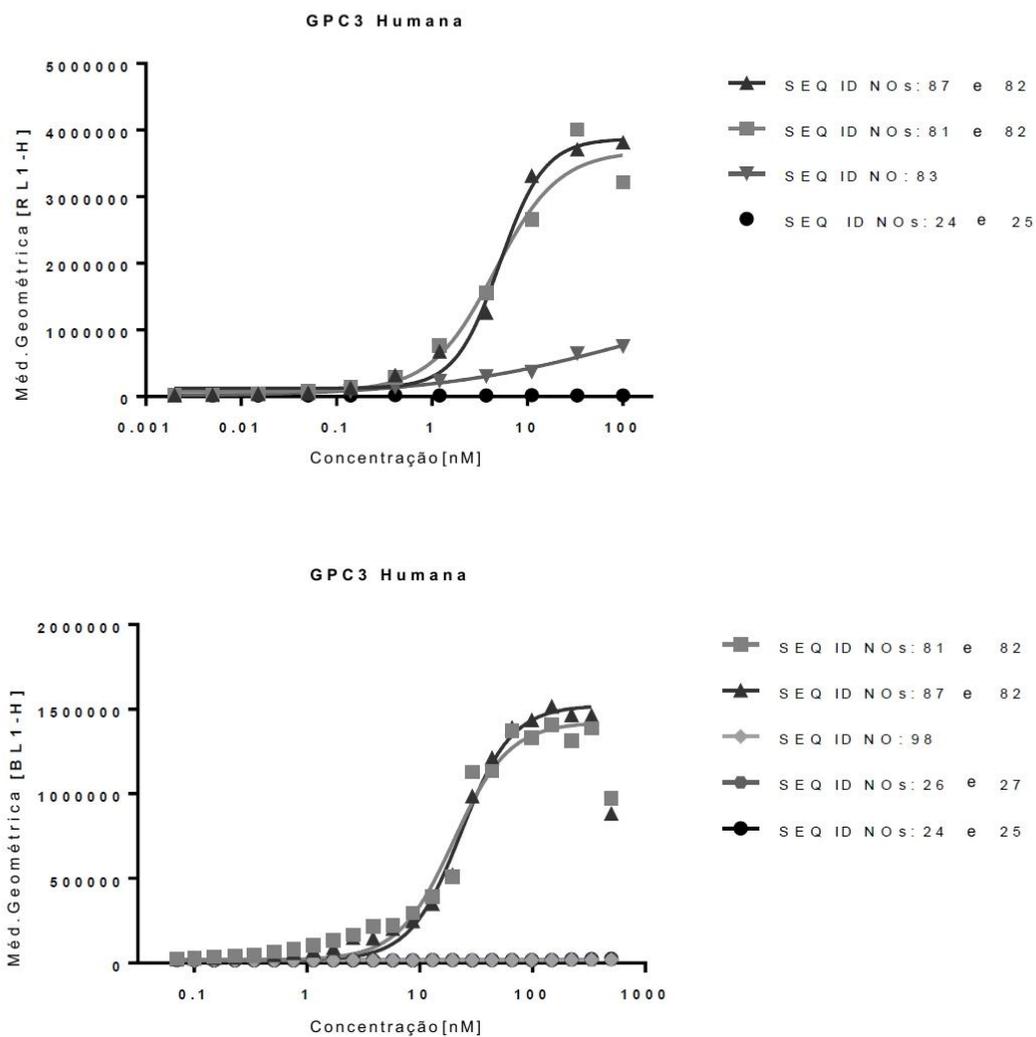


Figura 5

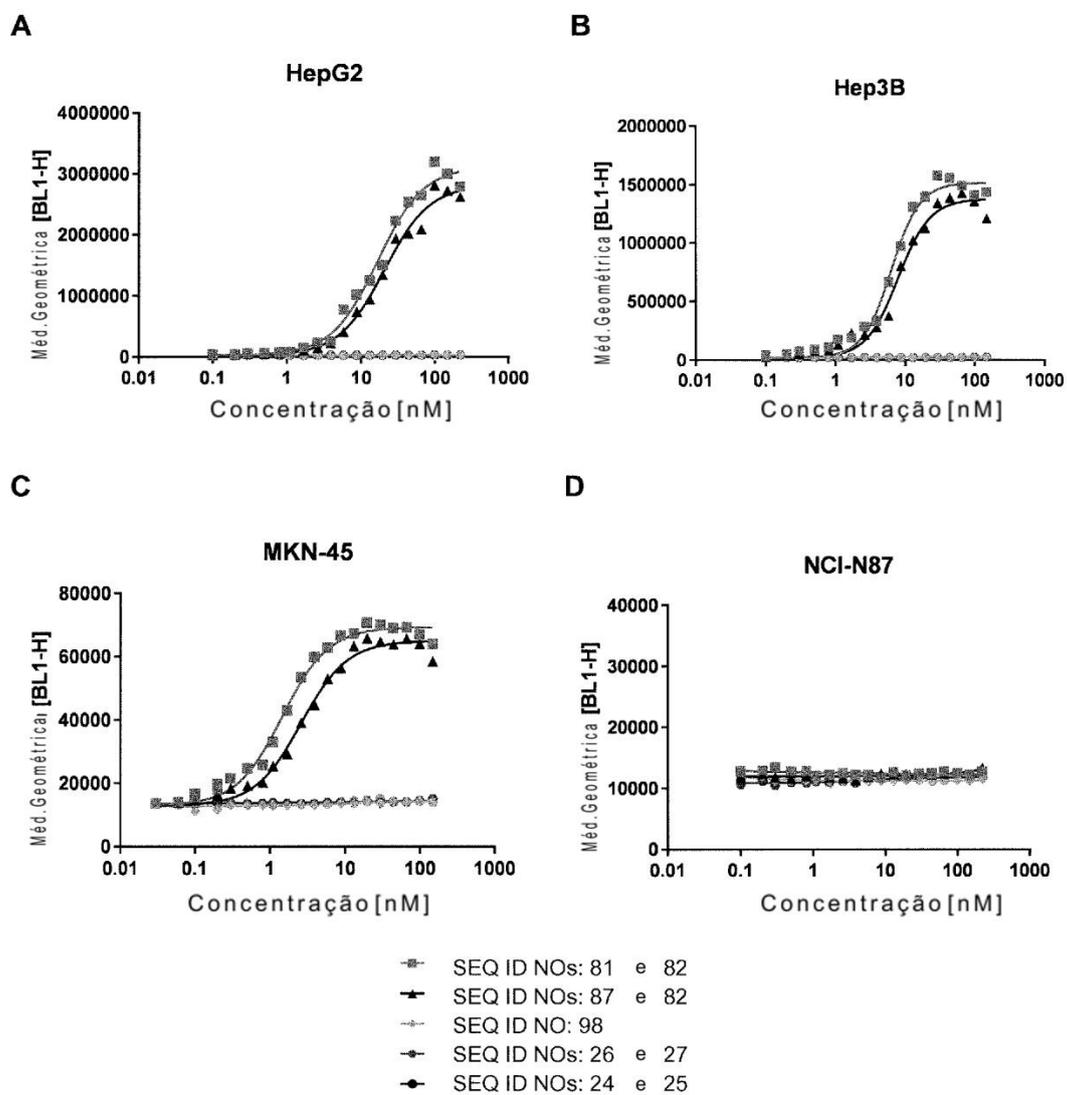


Figura 6

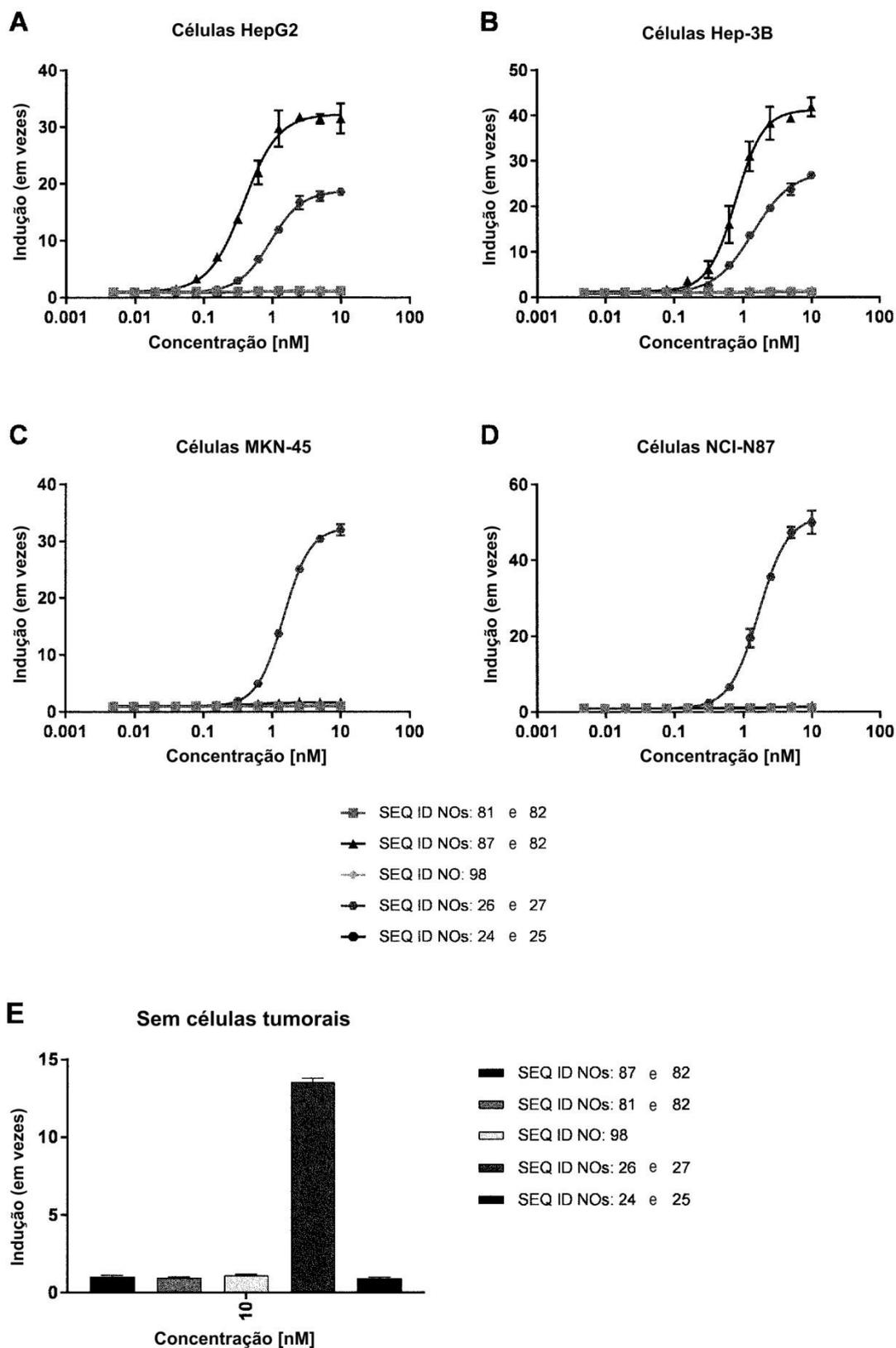


Figura 7

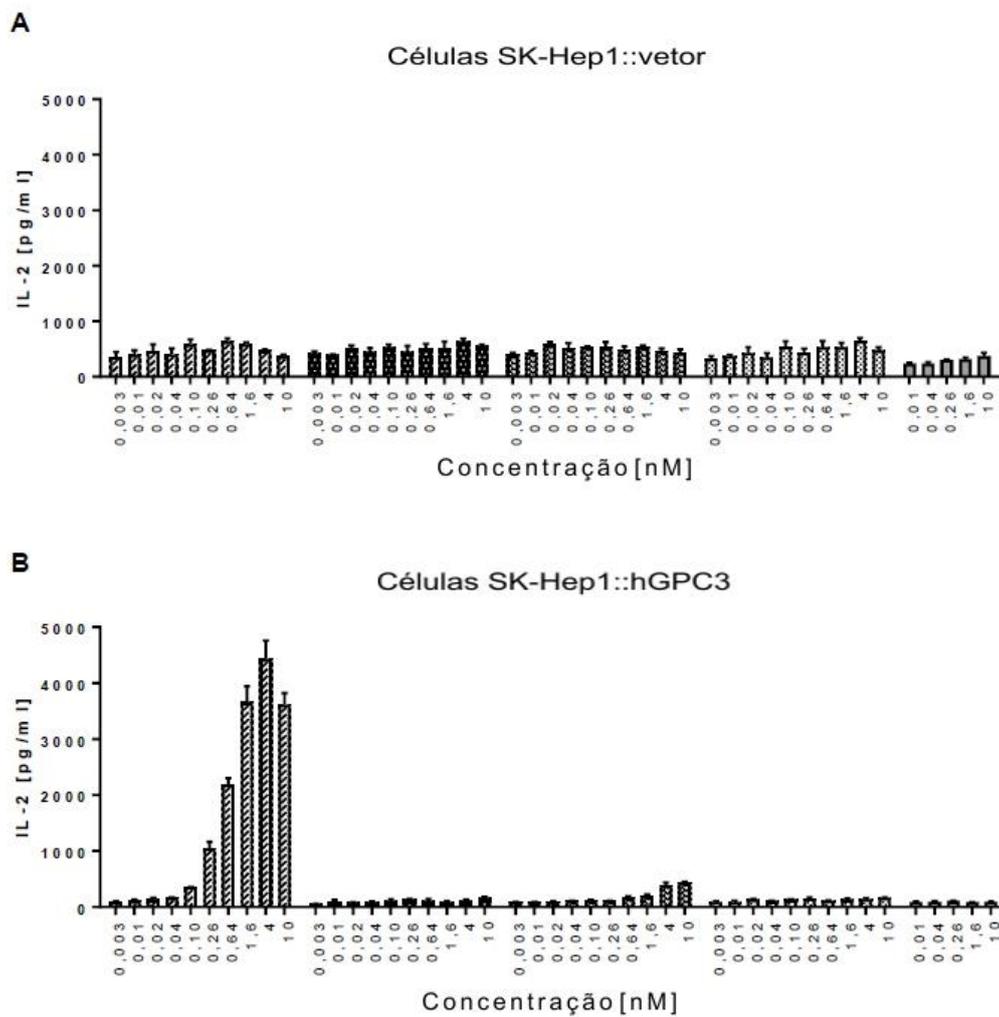


Figura 7 (Cont.)

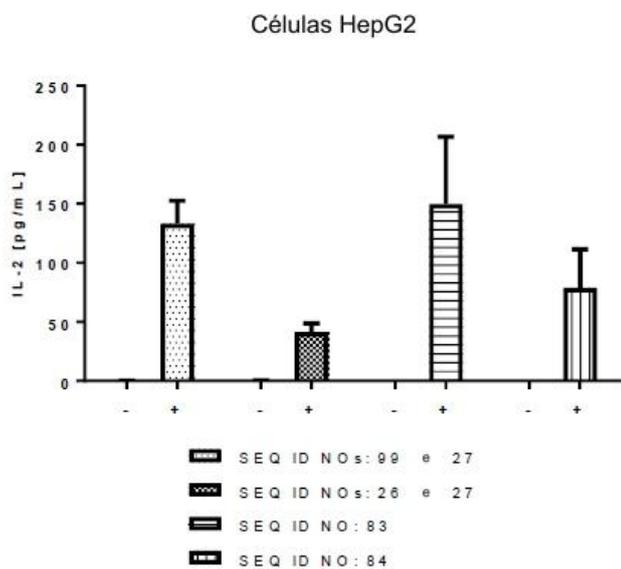
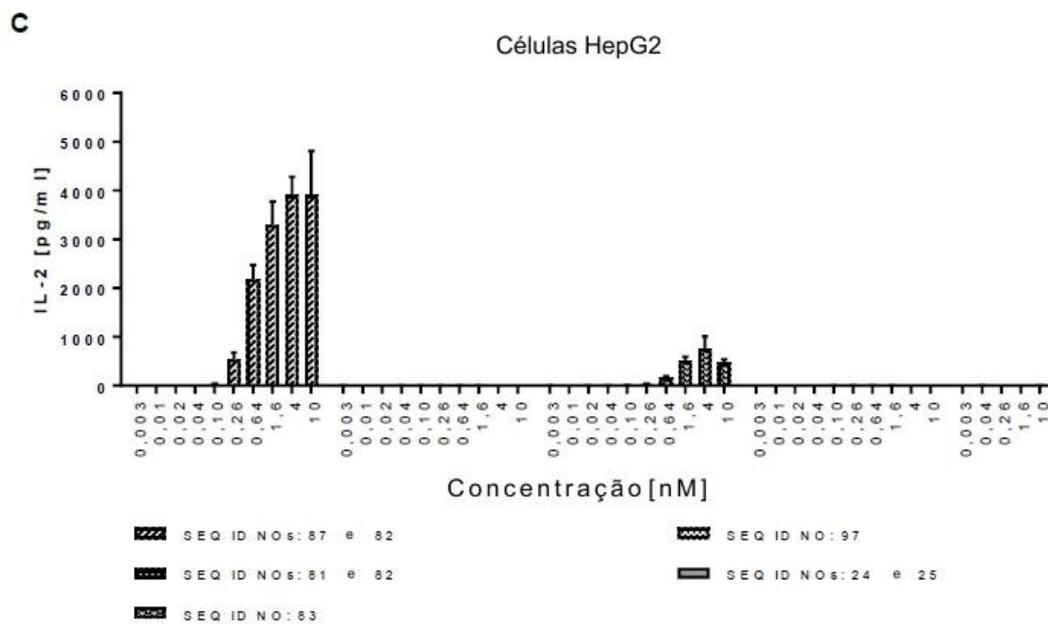
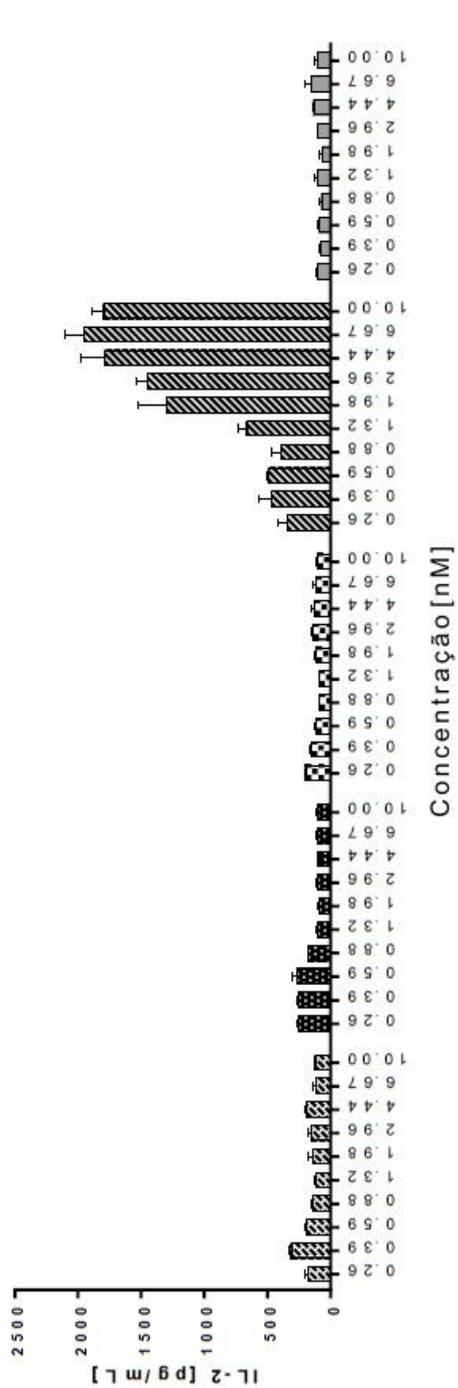


Figura 8 (Cont.)

C. Cocultura com células MKN-45



D. Cocultura com células NCI-87

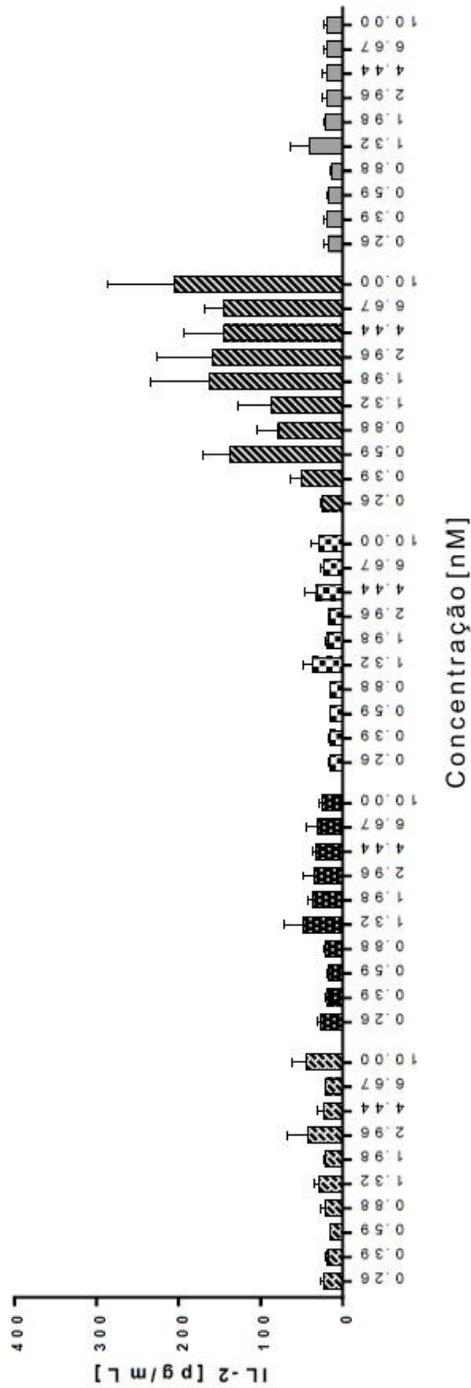


Figura 9

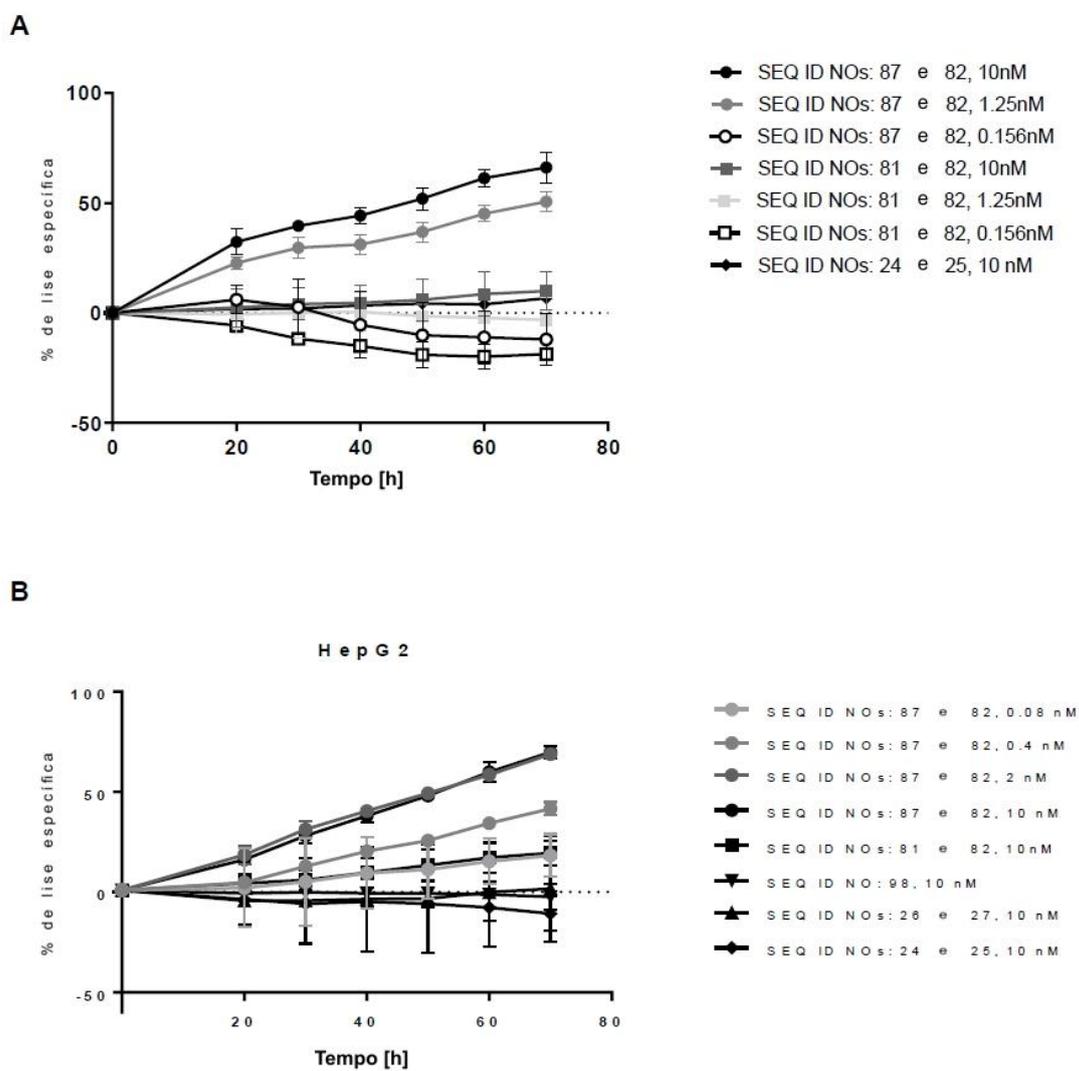


Figura 9 (Cont.)

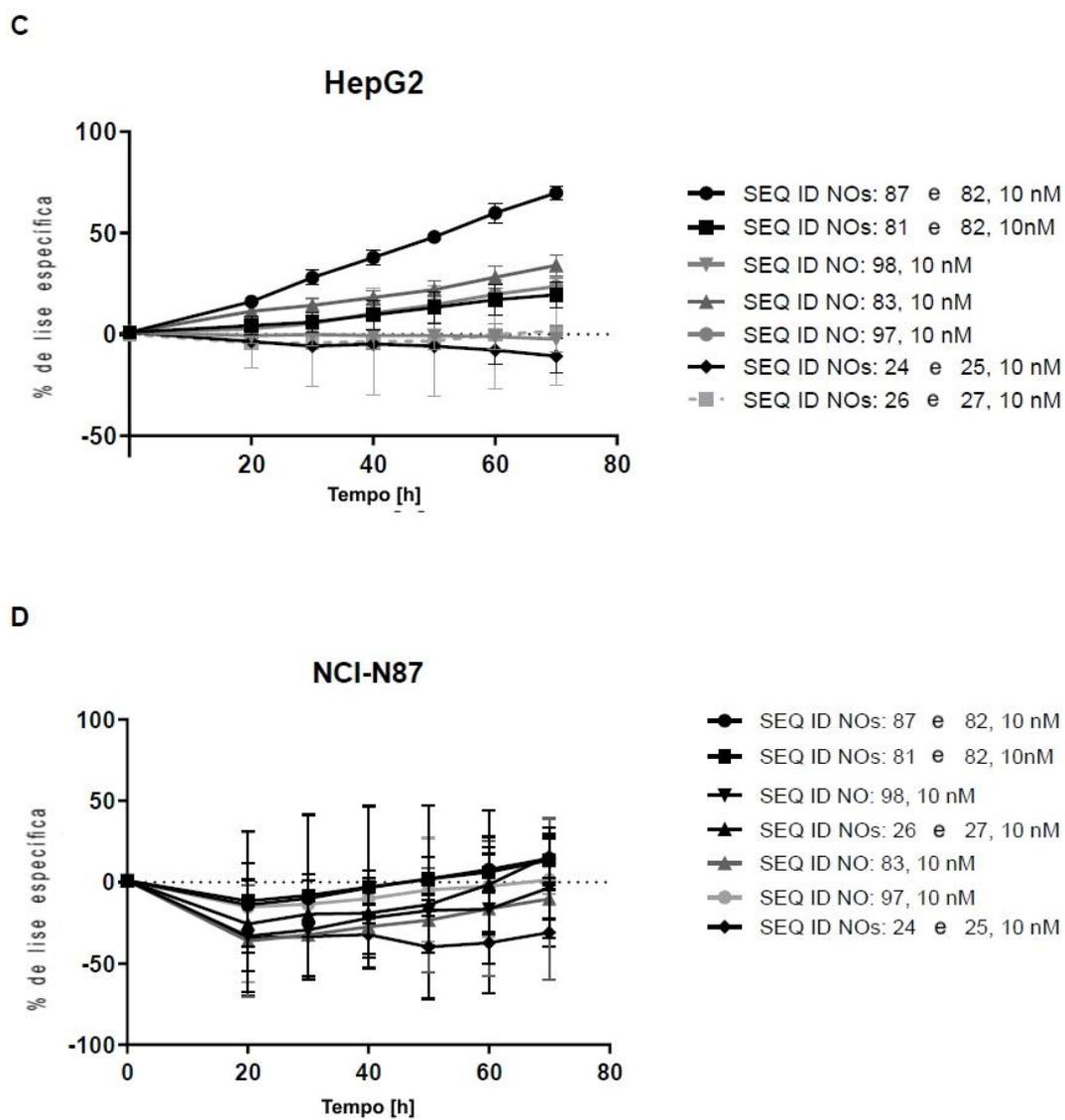


Figura 9 (Cont.)

E

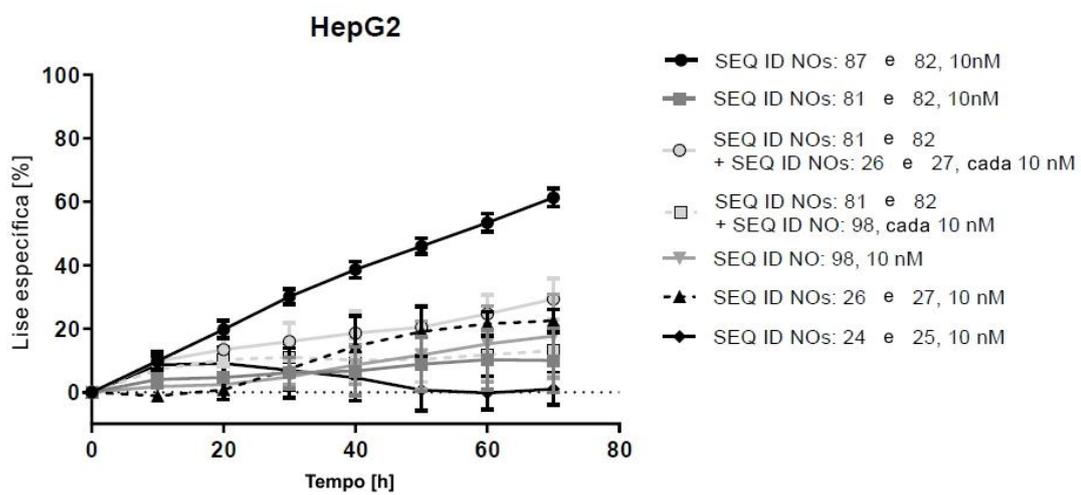


Figura 10

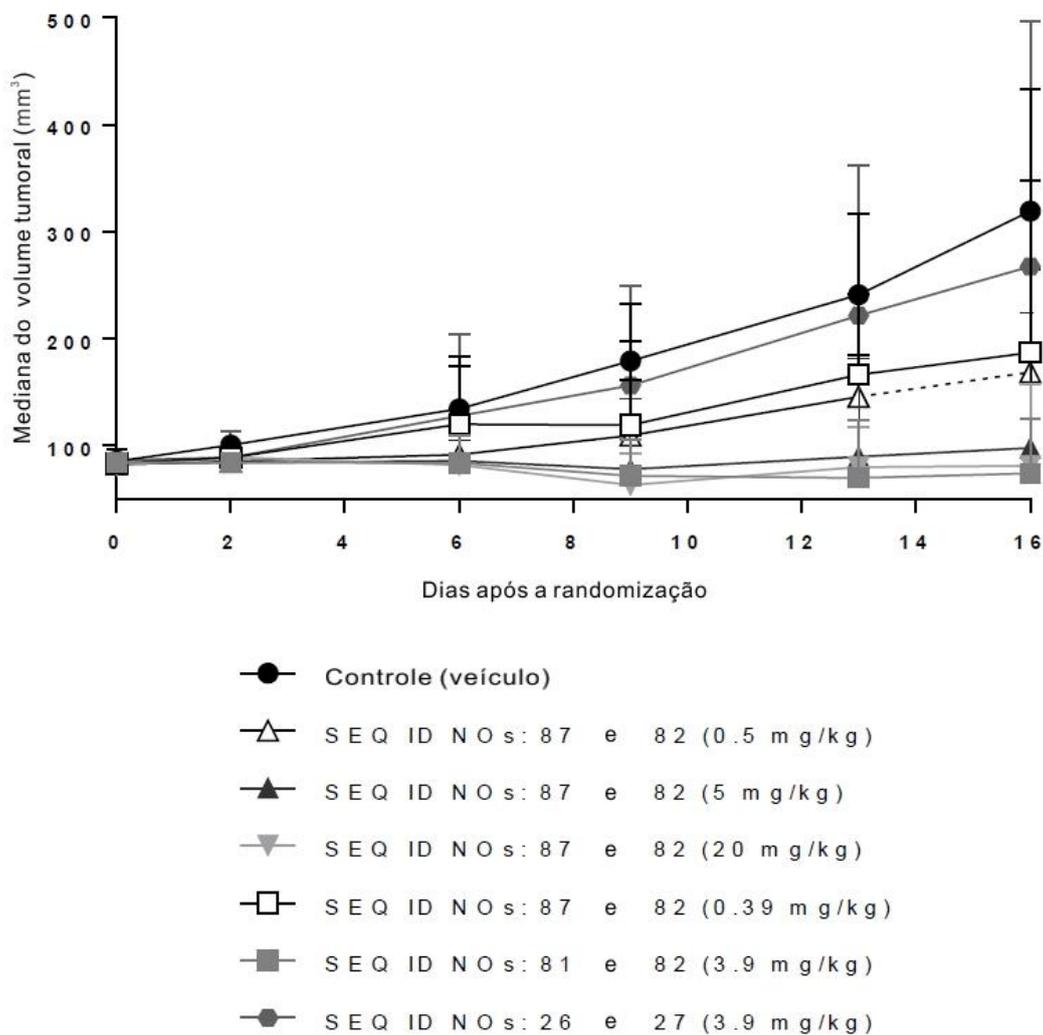
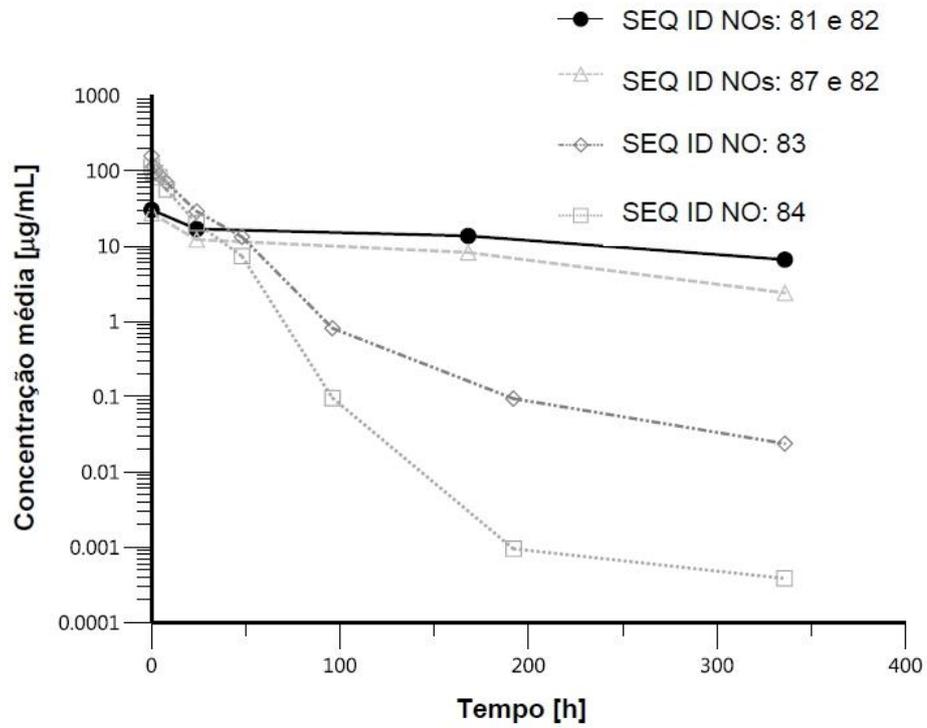


Figura 11



RESUMO**“PROTEÍNAS DE FUSÃO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO, DE ATIVAR SIMULTANEAMENTE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO, DE COESTIMULAR CÉLULAS T, DE INDUZIR UMA RESPOSTA DE LINFÓCITOS E DE INDUZIR O AUMENTO DA CITÓLISE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA PREVENIR, MELHORAR OU TRATAR CÂNCERES”**

A divulgação fornece proteínas de fusão específicas para CD137 e GPC3, cuja proteína de fusão pode ser usada para coestimular a ativação de linfócitos de uma maneira dependente do alvo GPC3. Tais proteínas de fusão podem ser usadas em diversas aplicações farmacêuticas, por exemplo, como agentes anticâncer e/ou moduladores imunológicos para o tratamento ou prevenção de doenças humanas, tal como uma variedade de tumores. A presente divulgação também diz respeito a métodos para a produção das proteínas de fusão aqui descritas, bem como composições compreendendo tais proteínas de fusão. A presente divulgação diz respeito ainda às moléculas de ácido nucleico que codificam tais proteínas de fusão e aos métodos para a geração de tais proteínas de fusão e moléculas de ácido nucleico. Além disso, o presente pedido descreve utilizações terapêuticas e/ou de diagnóstico de tais proteínas de fusão, bem como composições compreendendo uma ou mais dessas proteínas de fusão.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2057-0013_Filing_Sequence Listing_BBB-VGD.TXT
- Data de Geração do Código: 25/08/2021
- Hora de Geração do Código: 13:53:20
- Código de Controle:
 - Campo 1: 829DD79976D7E47A
 - Campo 2: 60F50AF9733831BC