



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

(21) BR 112019017713-2 A2



(22) Data do Depósito: 27/02/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 07/04/2020

(54) **Título:** PROTEÍNAS QUIMÉRICAS À BASE DE CSF1R

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/00; C07K 14/705; C07K 19/00; C12N 15/11.

(30) **Prioridade Unionista:** 27/02/2017 US 62/463.997.

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

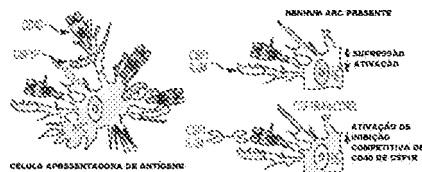
(72) **Inventor(es):** TAYLOR SCHREIBER; GEORGE FROMM; SURESH DE SILVA.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018020039 de 27/02/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/157164 de 30/08/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 26/08/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se, em parte, a proteínas quiméricas, que incluem o domínio extracelular de um receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R) e seu uso no tratamento de doenças, tais como imunoterapias para câncer e/ou uma doença inflamatória.



**“PROTEÍNAS QUIMÉRICAS À BASE DE CSF1R”****PRIORIDADE**

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 62/463.997, depositado em 27 de fevereiro de 2017, cujo conteúdo é incorporado ao presente por referência em sua totalidade.

**INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA DE MATERIAIS APRESENTADOS POR VIA ELETRÔNICA**

[002] Este pedido contém uma listagem de sequências. Ela foi apresentada eletronicamente via EFS-Web como um arquivo de texto ASCII intitulado “SHK-002PC\_SequenceListing\_ST25”. A listagem de sequências tem 92.976 bytes de tamanho e foi criada em 27 de fevereiro de 2018 ou aproximadamente. A listagem de sequências é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

**CAMPO TÉCNICO**

[003] A presente invenção refere-se, em parte, a proteínas quiméricas, que incluem o domínio extracelular de um receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R) e seu uso no tratamento de doenças, tais como imunoterapias para câncer e/ou doenças inflamatórias.

**FUNDAMENTOS**

[004] Dados clínicos recentes demonstraram respostas impressionantes dos pacientes a agentes que direcionam moléculas imunes coinibitórias, incluindo, por exemplo, ensaios clínicos que levaram à aprovação de YERVOY, KEYTRUDA e OPDIVO. Essas imunoterapias são coletivamente caracterizadas como inibidores de ponto de verificação e, infelizmente, essas terapias apenas fornecem benefício clínico para ~ 15-30% dos pacientes com câncer. Uma abordagem potencial para melhorar as taxas de resposta clínica para uma população mais ampla de pacientes com câncer inclui a combinação de um inibidor de ponto de verificação terapêutico com outra terapia. Tais combinações, quando aplicadas usando múltiplas terapias individuais, podem levar a um benefício clínico melhorado, mas são complicadas de se

desenvolver. Além disso, muitas imunoterapias são complicadas por efeitos colaterais graves que limitam significativamente a janela terapêutica do paciente para tratamento.

[005] Permanece a necessidade de novos métodos e composições que forneçam imunoterapias eficazes, incluindo a consolidação de múltiplos mecanismos terapêuticos em medicamentos únicos.

### **SUMÁRIO**

[006] Por conseguinte, a presente invenção proporciona, em parte, composições e métodos que são úteis no tratamento do câncer, por exemplo, superando múltiplos mecanismos supressores, no microambiente tumoral, e estimulando mecanismos imunológicos antitumorais. Do mesmo modo, as composições e métodos são utilizados no tratamento de uma doença inflamatória. Por exemplo, a presente invenção fornece, em parte, composições e métodos que permitem o direcionamento duplo de populações mieloides supressoras pela inibição da sinalização de CSF1/CSF1R e ativação de células apresentadoras de antígeno estimulando a sinalização de CD40/CD40L. Tal bloqueio concomitante de CSF1R e agonismo de CD40 provoca, inter alia, uma diminuição global nas células imunossupressoras e uma mudança para um meio mais inflamatório e um efeito antitumoral aumentado.

[007] Em aspectos, a presente invenção fornece uma proteína quimérica heteróloga compreendendo: (a) um primeiro domínio compreendendo uma porção de um receptor de fator de estimulação de colônias (CSF1R) que é capaz de ligar um ligando CSF1R; (b) um segundo domínio compreendendo uma porção de Ligando CD40 (CD40L) que é capaz de ligar um receptor de CD40L; e (c) um ligante que liga o primeiro domínio e o segundo domínio. Em aspectos, a presente invenção proporciona métodos de tratamento do câncer com esta proteína quimérica heteróloga. Em aspectos, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de uma doença inflamatória com esta proteína quimérica heteróloga.

[008] Em modalidades, a presente invenção fornece uma

proteína de fusão recombinante compreendendo uma estrutura geral de: N terminal - (a) - (b) - (c) - C terminal, onde (a) é um primeiro domínio compreendendo um domínio extracelular de CSF1R que é pelo menos 95% idêntico à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e é capaz de ligar um ligando CSF1R, (b) é um ligante que liga o primeiro domínio e o segundo domínio e compreendendo um domínio de dobradiça-CH2-CH3 Fc derivado de IgG4 humana (por exemplo, 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, ou SEQ ID NO: 27, e (c) é um segundo domínio compreendendo um domínio extracelular do ligando CD40 (CD40L) que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:4 e que é capaz de ligar a um receptor de CD40L. Em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento do câncer com esta proteína quimérica heteróloga. Em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de uma doença inflamatória com esta proteína quimérica heteróloga.

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

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[010] **A FIG. 1A** mostra, sem querer estar limitado pela teoria, um esquema para um mecanismo de ação para a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L. **A FIG. 1B** mostra uma sinapse que se formou por uma proteína quimérica entre uma célula tumoral e uma célula T. **A FIG. 1C** mostra a estrutura secundária predita de CSF1R-Fc-CD40L humano, indicando como se prevê que os três domínios se formem no seu estado natural. O peso molecular monomérico predito da proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L é de cerca de 105,4 kDa.

[011] **A FIG. 2** mostra caracterização por análise de Western blot dos três domínios de CSF1R-Fc-CD40L humana sob condições não redutoras/fervidas, redutoras/fervidas e redutoras desglicosilantes/fervidas

(PNGase). Os tamanhos das bandas confirmam o peso molecular monomérico predito de cerca de 105,4 kDa e sugerem que o estado nativo existe como um dímero glicosilado. Como mostrado, a faixa 1, começando a partir da esquerda em cada mancha, é um marcador de peso molecular de proteína.

[012] **A FIG. 3** mostra ensaios funcionais de imunoadsorção enzimática (ELISAs) demonstrando a ligação de CSF1R-Fc-CD40L humana aos alvos dos três domínios individualmente (Fc - mostrado na esquerda superior, CSF1R - mostrado na direita superior e CD40L - mostrado na esquerda inferior) bem como a ligação contemporânea tanto a CSF1 recombinante como a CD40 - mostrado na direita inferior. No painel superior esquerdo, a curva superior é padrão IgG e a curva inferior hCSFR1-Fc-CD40L. No painel inferior esquerdo, a curva superior é CD40L-Fc e a curva inferior hCSFR1-Fc-CD40L.

[013] **A FIG. 4** mostra ensaios de ligação celular *in vitro* que demonstram a capacidade da proteína quimérica CSF1R(CD115)-Fc-CD40L humana de se ligar ao receptor CD40 expresso pelas células Jurkat (uma linhagem de célula T humana). A ligação  $EC_{50}$  foi medida como 77 nM. “ARC” refere-se à proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L.

[014] **FIG. 5A a FIG. 5F** mostram a afinidade de ligação de Octet de CSF1R-Fc-CD40L humana. Taxas de associação, taxas de dissociação, e afinidade (KD) foram determinados para CSF1R-Fc-CD40L humana para CD40-His (**FIG. 5A**), CD40L-Fc a CD40-His comercialmente disponível de lado único (**FIG. 5B**), um anticorpo CD40 a CD40-His comercialmente disponível (**FIG. 5C**), hCSF1R-Fc-CD40L a CSF1-His (**FIG. 5D**), e CSF1R-Fc a CSF1-His comercialmente disponível (**FIG. 5E**). CSF1R-Fc-CD40L humana ligou CD40 a 4,83 nM e CSF1 a 646 pM (**FIG. 5F**). O termo “CSF1R-Fc-CD40L ARC” refere-se à proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L. Em toda a **FIG. 5A a FIG. 5E**, a ordem das curvas, de cima para baixo, é: agente de teste a 100 mM, agente de teste a 33 mM, agente de teste a 11 mM e vazio.

[015] **A FIG. 6** mostra a caracterização por interferometria

de biocamada (Octet) da afinidade de ligação relativa de CSF1R-Fc-CD40L humana a CD40 recombinante, CSF1 e IL-34. Ligação idêntica foi observada para os dois ligandos de CSF1R: CSF1 e IL-34; assim, as curvas se sobrepõem umas às outras. Portanto, a ordem das curvas é: CD40-his na parte superior e CSF1-his e IL-34-his na parte inferior e sobreposta.

[016] **FIG. 7A** e **FIG. 7B** mostram caracterização por Western blot e ligação ELISA funcional da CSF1R-Fc-CD40L murina. **A FIG. 7A** mostra a detecção de Western blot de todos os três domínios da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L em tratamentos não reduzidos (faixa 2), reduzidos (faixa 3), e reduzidos+PNGase (faixa 4). A forma reduzida e desglicosilada da proteína migra com o peso molecular esperado de cerca de 105 kDa. **A FIG. 7B** mostra que ensaios ELISA foram realizados para detectar a ligação de CSF1R a CSF1 recombinante (painel esquerdo), Fc a IgG (painel central) e CD40L a rCD40 (painel direito) utilizando métodos de detecção delineados nos esquemas acima de cada gráfico. CD115 é sinônimo de CSF1R. Na **FIG. 7B**, a mCD115-Fc-CD40L do painel esquerdo é a curva superior, nos painéis central e direito mCD115-Fc-CD40L é a curva inferior.

[017] **A FIG. 8** mostra a ligação celular *in vitro* de CSF1R-Fc-CD40L murina a células CHO-K1 que sobre-expressam CD40 murina (curva superior), em comparação com uma linhagem celular CHO-K1 parental que não expressa mCD40 (curva inferior). A ligação  $EC_{50}$  foi medida como 91,1 nM.

[018] **A FIG. 9** mostra dados de um ensaio de sinalização de NF- $\kappa$ B/NIK *in vitro* utilizando a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L humana. As células U2OS do ensaio de sinalização DiscoverX NIK foram cultivadas com uma titulação de ou CD40L-Fc comercialmente disponível de lado único, CSF1R-Fc de lado único, ou anti-CD40, ou a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L humana. As unidades de luciferase relativas (RLU) indicam a força relativa da sinalização de NF- $\kappa$ B/NIK ativada após o tratamento com os regimes indicados. As curvas são identificadas como segue: a 0,01  $\mu$ g/mL no

eixo X, de cima para baixo é: CD40L-Fc, hCSF1R-Fc-CD40L, CSF1R-Fc e anti-CD40.

[019] **As FIG. 10A e FIG. 10B** mostram leituras funcionais *in vivo* da atividade de CSF1R-Fc-CD40L murina. **A FIG. 10A** mostra um ensaio de armadilha/lavador de CSF1. Camundongos não portadores de tumor foram injetados com uma dose única de anti-CD115 (CSF1R) no dia 0. No dia 2, os camundongos foram deixados sem tratamento ou injetados com uma dose única da proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L. O soro sanguíneo foi colhido no dia 2 antes da injeção da proteína quimérica e no dia 3 após o tratamento da proteína quimérica. Os ELISAs de CSF1 murina foram realizados no soro e mostraram que a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L murina se liga e elimina CSF1 no soro. (**FIG. 10B** mostra a indução de *in vivo* IL15R $\alpha$ . Os camundongos portadores de tumor foram tratados com duas doses de 150  $\mu$ g de mCSF1R-Fc-CD40L ARC nos dias 5 e 7 após inoculação de tumor inicial. No dia 13, uma coorte de camundongos foi sacrificada e os seus baços e nódulos linfáticos foram removidos e dissociados para análise de citometria de fluxo de IL15R $\alpha$ . Consistente com um mecanismo conhecido da função CD40L, os camundongos tratados com a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L apresentaram um aumento de IL15R $\alpha$  em ambos os compartimentos do tecido. CD115 é sinônimo de CSF1R. Para o gráfico da FIG. 10A, a curva superior é + $\alpha$ CD115, a curva média é +  $\alpha$ CD115, depois CD115-Fc-CD40L no dia 2 e a curva inferior é não tratada. Para a **FIG. 10B** (painéis superior e inferior), os pontos esquerdos são controlados e à direita são CSF1R-Fc-CD40L.

[020] **FIG. 11A a FIG. 11C** mostram a eficácia antitumoral de CSF1R-Fc-CD40L murina em tumores CT26 colorretais. Camundongos Balb/c foram inoculados com tumores CT26 no dia 0. Após 4 dias de crescimento tumoral, quando os tumores atingiram um diâmetro de 4-5 mm, os camundongos foram tratados com anticorpos de controle ou com a proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L. Os tratamentos foram então repetidos novamente no dia 7. A figura acima inclui: (**FIG. 11A**) curvas individuais de

crescimento tumoral para cada grupo de tratamento (**FIG. 11A**) sobrevida global até o dia 60 da experiência e (**FIG. 11A**) uma tabela resumindo os resultados do tratamento para cada grupo. CD115 é sinônimo de CSF1R. Para a **FIG. 11B**, com referência ao dia 35, as curvas são (de cima para baixo): CD115-Fc-CD40L (150 µg x 2), αCD115, αCD115/CD40, αCD40 (os camundongos não tratados não sobreviveram até este ponto).

[021] **FIG. 12A** a **FIG. 12E** mostram imunofenotipagem *in vivo* em camundongos portadores de tumor. A imunofenotipagem portadora de tumor foi também realizada para cada grupo de tratamento através da análise de esplenócitos, células de nódulos linfáticos e linfócitos de infiltração tumoral para camundongos de cada grupo no dia 13 após a inoculação do tumor. **A FIG. 12A** apresenta resultados que demonstram que os camundongos tratados com CSF1R-Fc-CD40L murina tinham frequências aumentadas de células T CD4+ e CD8+ no baço, mas não linfonodos ou tumores em comparação com os controles. **A FIG. 12B** mostra uma diminuição na proporção de células CD4+CD25+ no baço e no tumor, o que pode indicar uma diminuição nas células T imunorregulatórias. Curiosamente, apesar de um aumento não significativo na proporção de células CD8+ totais dentro do tumor (ver, **FIG. 12C**), foi detectado um aumento significativo na proporção de células T CD8+ específicas para o antígeno de tumor AH1 (por coloração de tetrâmero). Para determinar a evidência potencial da ativação do receptor CD40, analisou-se a indução de células CD19+ (**FIG. 12D**) e células positivas para IL-15Rα (**FIG. 12E**). Para toda a **FIG. 12A** a **FIG. 12E**, os pontos da esquerda são controlados e os da direita são CSF1R-Fc-CD40L.

[022] **A FIG. 13A** e **a FIG. 13B** mostram a segurança de CSF1R-Fc-CD40L murina versus um anticorpo agonista de CD40. A monoterapia com um anticorpo agonista de CD40 (clone FGK4.5) ou terapia de combinação com o anticorpo agonista de CD40 e um anticorpo anti-CD115 (CSF1R) (clone AFS98) produziu diarreia significativa e perda de peso em



camundongos ao longo da experiência. Estes dados indicam que o anticorpo agonista de CD40 iniciou uma resposta inflamatória intestinal que conduzia a diarreia e perda de peso, que foi então significativamente exacerbada pela combinação com o bloqueio de CD115. Os camundongos no grupo de combinação de anticorpos perderam > 25% do seu peso corporal (ver **FIG. 13B**), tinham uma aparência moribunda (**FIG. 13A**) e em alguns casos esta resposta inflamatória foi letal. Importante, os camundongos tratados com a proteína quimérica CD115-Fc-CD40L murina (que é outro nome para a proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L) pareciam saudáveis, não desenvolveram quaisquer sinais de diarreia ou perda de peso e comportaram-se normalmente (ver fotos em painel esquerdo). Estes dados estão de acordo com dados clínicos em humanos tratados com anticorpos agonistas de CD40 e sugerem um perfil de segurança benéfico de mCD115-Fc-CD40L. CD115 é sinônimo de CSF1R. Na **FIG. 13B**, a ordem das barras é: não tratada,  $\alpha$ CD115,  $\alpha$ CD40,  $\alpha$ CD115+ $\alpha$ CD40, CD115-Fc-CD40L FP.

[023] **A FIG. 14** mostra quatro configurações potenciais de proteínas quiméricas ilustrativas (PD1-Fc-OX40L).

[024] **A FIG. 15** mostra Western blots de proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L executados em SDS-PAGE sob uma condição não redutora, uma condição redutora e uma condição redutora e após tratamento com Peptídeo-N-Glicosidase F (PNGaseF).

[025] **A FIG. 16** mostra um cromatograma para proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L executadas em Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC).

[026] **A FIG. 17** mostra géis PAGE SDS-PAGE e nativa (não SDS) para proteínas quiméricas PD-1-Fc-OX40L executados sob uma condição não redutoras ("-") ou sob uma condição redutora ("+").

[027] **A FIG. 18** mostra um gel PAGE nativo (não SDS) para proteínas quiméricas PD-1-Sem Fc-OX40L que não têm um domínio Fc em um ligante.

[028] **A FIG. 19** mostra, sem querer estar limitado pela teoria, um modelo de como um hexâmero e concatâmeros se formam a partir de proteínas quiméricas da presente invenção.

[029] **A FIG. 20** é uma tabela mostrando ligantes de junção e ligantes Fc que podem ser combinados em ligantes modulares exemplificativos. Os ligantes modulares exemplificativos mostrados podem ser combinados com quaisquer proteínas Tipo I e Tipo II proteínas e/ou domínios extracelulares aqui descritos de proteínas Tipo I e Tipo II aqui descritas para formar uma proteína quimérica da presente invenção.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[030] A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta de proteínas quiméricas engenheiradas compreendendo um primeiro domínio compreendendo uma porção de receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R) que é capaz de ligar a um ligando CSF1R. Em modalidades, a proteína quimérica compreende ainda um segundo domínio compreende uma porção de Ligando CD40 (CD40L) que é capaz de ligar um receptor de CD40L. Em modalidades, o primeiro domínio e o segundo domínio são conectados por um ligante. Em modalidades, a presente proteína quimérica fornece um sinal imunoestimulatório, por exemplo, capaz de ativar macrófagos e células apresentadoras de antígeno, enquanto proporciona uma armadilha localizada para um sinal inibitório que poderia de outro modo deslocar o equilíbrio para a imunossupressão (*por exemplo*, CSF1 ou IL-34). Modalidades da invenção proporcionam, desse modo, o tratamento eficaz de cânceres e/ou doenças inflamatórias.

### ***Proteínas quiméricas***

[031] Em modalidades, a presente invenção refere-se a proteínas quiméricas engenheiradas para compreender um domínio, *por exemplo*, o domínio extracelular, do receptor imunoinibitório receptor do fator de estimulação de colônia 1 (CSF1R), também conhecido como receptor do fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSFR) e agrupamento de

diferenciação 115 (CD115). Assim, ao longo desta divulgação, CSF1R e CD115 são sinônimos, quando referenciados isoladamente e/ou quando referenciados no contexto de uma proteína quimérica, assim, por exemplo, CSF1R-Fc-CD40L é a mesma proteína quimérica que CD115-Fc-CD40L. CSF1R é uma proteína membrana tipo I de passagem única que funciona como um receptor para o fator de estimulação de colônia 1 (CSF1). CSF1R também demonstrou ser um receptor para IL-34. A ligação de CSF1R a CSF1 ou IL-34 desempenha um papel crítico na sobrevivência, proliferação, e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas, especialmente os fagócitos mononucleares, tais como macrófagos e monócitos. Além disso, foi demonstrado que CSF1R se liga a CSF1 ou a IL-34 dentro do microambiente tumoral. A ligação do receptor a estes ligandos induz a imunossupressão através, *inter alia*, da indução de macrófagos associados a tumores (TAMs) e células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs).

[032] Em modalidades, a presente proteína quimérica compreende um domínio, *por exemplo*, o domínio extracelular, de CSF1R humana. CSF1R humana compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (com a sequência de aminoácidos do domínio extracelular compreendendo os aminoácidos 20 a 517).

[033] Em modalidades, a presente proteína quimérica compreende o domínio extracelular, de CSF1R humana, que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem compreender o domínio extracelular de CSF1R como aqui descrito, ou uma variante ou um fragmento funcional do mesmo. Por exemplo, a proteína quimérica pode compreender uma sequência do domínio extracelular de CSF1R como fornecido acima, ou uma variante ou fragmento funcional da mesma tendo pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 61%, ou pelo menos cerca de 62%, ou pelo menos cerca de 63%, ou pelo menos cerca de 64%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 66%, ou pelo menos cerca de 67%, ou pelo menos cerca de 68%, ou pelo

menos cerca de 69%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 71%, ou pelo menos cerca de 72%, ou pelo menos cerca de 73%, ou pelo menos cerca de 74%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 76%, ou pelo menos cerca de 77%, ou pelo menos cerca de 78%, ou pelo menos cerca de 79%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 81%, ou pelo menos cerca de 82%, ou pelo menos cerca de 83%, ou pelo menos cerca de 84%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86%, ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92%, ou pelo menos cerca de 93%, ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96%, ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio extracelular de CSF1R como descrito aqui.

[034] A estrutura de CSF1R é descrita, por exemplo, em W.D. Tap, *et al.*, "Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor", *N. Engl. J. Med.* 30 de julho de 2015; 373(5):428-37. Os derivados de CSF1R podem ser preparados com base nas estruturas disponíveis de CSF1R.

[035] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem compreender um domínio extracelular variante de CSF1R em que o peptídeo sinal (*por exemplo*, como proporcionado na SEQ ID NO: 1) é substituído por um peptídeo sinal alternativo. Em modalidades, a presente proteína quimérica pode compreender um domínio extracelular variante de CSF1R que é expresso a partir de um cDNA que foi otimizado por códon para expressão em células produtoras de proteína, tais como células de ovário de hamster chinês (CHO) ou de rim embrionário humano (HEK).

[036] Em modalidades, um domínio extracelular de CSF1R refere-se a uma porção da proteína que é capaz de interagir com o ambiente extracelular. Em modalidades, o domínio extracelular de CSF1R é a

sequência de aminoácidos completa da proteína que é externa de uma célula ou da membrana celular. Em modalidades, o domínio extracelular de CSF1R é uma porção de uma sequência de aminoácidos da proteína que é externa de uma célula ou da membrana celular e é necessária para a transdução de sinal e/ou ligação de ligando como pode ser testado usando métodos conhecidos na técnica (*por exemplo, in vitro* ensaios de ligação ao ligando e/ou de ativação celular).

[037] Em modalidades, o domínio extracelular de CSF1R refere-se a uma porção da proteína que é capaz de ligar ao fator de estimulação de colônias 1 (CSF1). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CSF1 humana com uma  $K_D$  de menos que cerca de 1  $\mu$ M, cerca de 900 nM, cerca de 800 nM, cerca de 700 nM, cerca de 600 nM, cerca de 500 nM, cerca de 400 nM, cerca de 300 nM, cerca de 200 nM, cerca de 150 nM, cerca de 130 nM, cerca de 100 nM, cerca de 90 nM, cerca de 80 nM, cerca de 70 nM, cerca de 60 nM, cerca de 55 nM, cerca de 50 nM, cerca de 45 nM, cerca de 40 nM, cerca de 35 nM, cerca de 30 nM, cerca de 25 nM, cerca de 20 nM, cerca de 15 nM, cerca de 10 nM, ou cerca de 5 nM, ou cerca de 1 nM (como medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CSF1 humana com uma  $K_D$  de menos que cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 55 pM, cerca de 50 pM, cerca de 45 pM, cerca de 40 pM, cerca de 35 pM, cerca de 30 pM, cerca de 25 pM, cerca de 20 pM, cerca de 15 pM, ou cerca de 10 pM, ou cerca de 1 pM (como medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada).

[038] Em modalidades, o domínio extracelular de CSF1R refere-se a uma porção da proteína que é capaz de ligar a IL-34. Em modalidades, a proteína quimérica se liga a IL-34 humana com uma  $K_D$  de

menos de cerca de 1  $\mu\text{M}$ , cerca de 900 nM, cerca de 800 nM, cerca de 700 nM, cerca de 600 nM, cerca de 500 nM, cerca de 400 nM, cerca de 300 nM, cerca de 200 nM, cerca de 100 nM, cerca de 90 nM, cerca de 80 nM, cerca de 70 nM, cerca de 60 nM, cerca de 55 nM, cerca de 50 nM, cerca de 45 nM, cerca de 40 nM, cerca de 35 nM, cerca de 30 nM, cerca de 25 nM, cerca de 20 nM, cerca de 15 nM, cerca de 10 nM, ou cerca de 5 nM, ou cerca de 1 nM (medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a IL-34 com uma  $K_D$  de menos que cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 55 pM, cerca de 50 pM, cerca de 45 pM, cerca de 40 pM, cerca de 35 pM, cerca de 30 pM, cerca de 25 pM, cerca de 20 pM, cerca de 15 pM, ou cerca de 10 pM, ou cerca de 1 pM (como medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CSF1 humana com uma  $K_D$  de cerca de 100 pM a cerca de 600 pM.

[039] A presente proteína quimérica compreende ainda um domínio, *por exemplo*, o domínio extracelular, do ligando CD40 da molécula imunoestimulatória (CD40L, também conhecida como CD154). CD40L é uma proteína transmembranar tipo II, pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). CD40L se liga ao receptor CD40 em macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APC), incluindo células B apresentadoras de antígenos, o que leva a muitos efeitos, dependendo do tipo de célula-alvo. CD40L também mostrou ligar as integrinas  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 11\beta 3$ . CD40L atua como uma molécula coestimulatória e é particularmente importante em um subconjunto de células T chamadas de células auxiliares foliculares T (células TFH). Nas células TFH, CD40L promove a maturação e função das células B ao envolver o CD40 na superfície das células B, facilitando assim a comunicação célula-célula.

[040] Em modalidades, a presente proteína quimérica compreende um domínio, *por exemplo*, o domínio extracelular, de CD40L humana. CD40L humana compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (com a sequência de aminoácidos do domínio extracelular compreendendo os aminoácidos 47 a 261). Em modalidades, a presente proteína quimérica compreende o domínio extracelular, de CD40L humana, que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem compreender o domínio extracelular de CD40L como aqui descrito, ou uma variante ou um fragmento funcional do mesmo. Por exemplo, as proteínas quiméricas podem compreender uma sequência do domínio extracelular de CD40L como fornecido acima, ou uma variante ou fragmento funcional do mesmo, tendo pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 61%, ou pelo menos cerca de 62%, ou pelo menos cerca de 63% ou pelo menos cerca de 64%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 66%, ou pelo menos cerca de 67%, ou pelo menos cerca de 68%, ou pelo menos cerca de 69%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 71%, ou pelo menos cerca de 72% ou pelo menos cerca de 73%, ou pelo menos cerca de 74%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 76%, ou pelo menos cerca de 77%, ou pelo menos cerca de 78%, ou pelo menos cerca de 79%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 81%, ou pelo menos cerca de 82% ou pelo menos cerca de 83%, ou pelo menos cerca de 84%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86%, ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92% ou pelo menos cerca de 93% ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96%, ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio extracelular de CD40L como descrito aqui.

[041] Derivados CD40L podem ser construídos a partir de dados estruturais disponíveis, incluindo os descritos por Oganessian V., *et al.*, “Fibronectin type III domains engineered to bind CD40L: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of two complexes”, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. Setembro de 2013; 69 (Pt 9): 1045-8.

[042] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem compreender um domínio extracelular variante de CD40L em que o peptídeo sinal (*por exemplo*, como proporcionado na SEQ ID NO: 3) é substituído por um peptídeo sinal alternativo. Em modalidades, a presente proteína quimérica pode compreender um domínio extracelular variante de CD40L que é expresso a partir de um cDNA que foi otimizado por códon para expressão em células produtoras de proteína, tais como células de ovário de hamster chinês (CHO) ou HEK.

[043] Em modalidades, o domínio extracelular de CD40L refere-se a uma porção da proteína que é capaz de interagir com o ambiente extracelular. Em modalidades, o domínio extracelular de CD40L é a sequência de aminoácidos completa da proteína que é externa de uma célula ou da membrana celular. Em modalidades, o domínio extracelular de CD40L é uma porção de uma sequência de aminoácidos da proteína que é externa de uma célula ou da membrana celular e é necessária para a transdução de sinal e/ou ligação de ligando como pode ser testado usando métodos conhecidos na técnica.

[044] Em modalidades, o domínio extracelular de CD40L refere-se a uma porção da proteína que é capaz de ligar a CD40. Semelhante a outros membros da superfamília de TNF, a CD40L ligada à membrana existe como um homotrímero. CD40L se liga-se a CD40, um membro da superfamília de receptores de TNF que é expresso predominantemente em células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas (DCs), células B e macrófagos. As interações CD40L/CD40 exercem efeitos profundos sobre as



células dendríticas, células B e células endoteliais, entre muitas células dos compartimentos hematopoiético e não hematopoiético. Por exemplo, a sinalização de CD40 induz DCs a amadurecer e efetivamente disparar a ativação e diferenciação de células T. A sinalização CD40 das células B promove a formação do centro germinativo (GC), troca do isotipo da imunoglobulina (Ig), hipermutação somática (SHM) da Ig para intensificar a afinidade pelo antígeno e a formação de células plasmáticas de vida longa e células B de memória. A sinalização de CD40 também é crítica para a sobrevivência da célula imune.

[045] Em modalidades, a proteína quimérica da invenção se liga a CD40 humana com uma  $K_D$  de menos que cerca de 1  $\mu$ M, cerca de 900 nM, cerca de 800 nM, cerca de 700 nM, cerca de 600 nM, cerca de 550 nM, cerca de 530 nM, cerca de 500 nM, cerca de 400 nM, cerca de 300 nM, cerca de 200 nM, cerca de 100 nM, cerca de 90 nM, cerca de 80 nM, cerca de 70 nM, cerca de 60 nM, cerca de 55 nM, cerca de 50 nM, cerca de 45 nM, cerca de 40 nM, cerca de 35 nM, cerca de 30 nM, cerca de 25 nM, cerca de 20 nM, cerca de 15 nM, cerca de 10 nM, ou cerca de 5 nM, ou cerca de 1 nM (como medido, por exemplo, por ressonância de plásmon de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CD40 humana com uma  $K_D$  de menos que cerca de 1 nM, cerca de 900 pM, cerca de 800 pM, cerca de 700 pM, cerca de 600 pM, cerca de 500 pM, cerca de 400 pM, cerca de 300 pM, cerca de 200 pM, cerca de 100 pM, cerca de 90 pM, cerca de 80 pM, cerca de 70 pM, cerca de 60 pM, cerca de 55 pM, cerca de 50 pM, cerca de 45 pM, cerca de 40 pM, cerca de 35 pM, cerca de 30 pM, cerca de 25 pM, cerca de 20 pM, cerca de 15 pM, ou cerca de 10 pM, ou cerca de 1 pM (como medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a C40 humana com um  $K_D$  de cerca de 300 pM a cerca de 700 pM.

[046] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CSF1R (SEQ ID NO: 2).

[047] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CD40L (SEQ ID NO: 4).

[048] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de OX40L (SEQ ID NO: 7).

[049] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CSF1R (SEQ ID NO: 2) e do domínio extracelular de CD40L (SEQ ID NO: 4).

[050] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CSF1R (SEQ ID NO: 2) e do domínio extracelular de OX40L (SEQ ID NO: 7).

[051] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana (SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, ou SEQ ID NO: 27).

[052] Em modalidades, uma proteína quimérica compreende um ligante modular, tal como mostrado na **FIG. 20**.

[053] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CSF1R e o domínio extracelular de CD40L, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera CSF1R-Fc-CD40L é a SEQ ID NO: 5).

[054] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende um domínio extracelular de CSF1R e o domínio extracelular de OX40L, usando o domínio dobradiça-CH2-CH3 de uma sequência de anticorpo IgG4 humana como um ligante (esta quimera CSF1R-Fc-OX40L é a SEQ ID NO: 8).

[055] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende SEQ ID NO: 5, *isto é*, proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L monomérica (SL-115154), ou um fragmento funcional ou variante da mesma.

[056] Em modalidades, as proteínas quiméricas podem ter

pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 61%, ou pelo menos cerca de 62%, ou pelo menos cerca de 63%, ou pelo menos cerca de 64%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 66% ou pelo menos cerca de 67%, ou pelo menos cerca de 68%, ou pelo menos cerca de 69%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 71%, ou pelo menos cerca de 72%, ou pelo menos cerca de 73%, ou pelo menos cerca de 74%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 76% ou pelo menos cerca de 77%, ou pelo menos cerca de 78%, ou pelo menos cerca de 79%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 81%, ou pelo menos cerca de 82%, ou pelo menos cerca de 83%, ou pelo menos cerca de 84%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86% ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92%, ou pelo menos cerca de 93%, ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96% ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO:5 ou 8.

[057] Em modalidades, as proteínas quiméricas da invenção podem compreender uma sequência que tem uma ou mais mutações de aminoácidos com relação a qualquer uma das sequências aqui divulgadas. Em modalidades, a proteína quimérica compreende uma sequência que tem cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 ou mais mutações de aminoácidos em relação a qualquer uma das sequências de aminoácidos das proteínas quiméricas aqui divulgadas.

[058] Em modalidades, as mutações de um ou mais aminoácidos podem ser independentemente selecionadas de substituições, inserções, deleções e truncagens.

[059] Em modalidades, as mutações de aminoácidos são

substituições de aminoácidos e podem incluir substituições conservativas e/ou não conservativas.

[060] As "substituições conservativas" podem ser feitas, por exemplo, com base na semelhança em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou na natureza anfipática dos resíduos de aminoácidos envolvidos. Os 20 aminoácidos de ocorrência natural podem ser agrupados nos seguintes seis grupos de aminoácidos padrão: (1) hidrofóbico: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) ácido: Asp, Glu; (4) básico: His, Lys, Arg; (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

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

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

[063] Em várias modalidades, as substituições podem também incluir aminoácidos não-clássicos (*por exemplo*, selenocisteína, pirrolisina, *N*-formilmetionina- $\beta$ -alanina, GABA e ácido  $\delta$ -amino-levulínico, ácido 4-aminobenzoico (PABA), isômeros D dos aminoácidos comuns, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, Ácido 2-amino-butírico,  $\gamma$ -Abu,  $\epsilon$ -Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiônico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, T-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclo-hexilalanina,  $\beta$ -alanina, Fluoro-aminoácidos,

aminoácidos criadores, como  $\beta$  aminoácidos de metil, aminoácidos de C- $\alpha$ -metil, aminoácidos de N- $\alpha$ -metil e análogos de aminoácidos em geral).

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

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

[066] Em modalidades, a proteína quimérica da presente invenção compreende (a) um primeiro domínio que compreende uma porção de receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R), *por exemplo*, o domínio extracelular de CSF1R, que é capaz de ligar a um ligando CSF1R; (b) um segundo domínio compreendendo uma porção de Ligando CD40 (CD40L), *por exemplo*, o domínio extracelular de CD40L, que é capaz de se ligar a um receptor de CD40L; e (c) um ligante que liga o primeiro domínio ao segundo domínio.

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

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

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

[069] Em modalidades, a proteína quimérica compreende um ligante. Em modalidades, o ligante pode ser derivado de proteínas de vários domínios de ocorrência natural ou são ligantes empíricos, como descrito, por exemplo, em Chichili *et al.*, (2013), *Protein Sci.* 22(2):153-167, Chen *et al.*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65 (10): 1357-1369, cujo conteúdo completo é aqui

incorporado por referência. Em algumas modalidades, o ligante pode ser projetado utilizando-se bancos de dados de projeção de ligantes e programa de computador, como os descritos em Chen *et al.*, (2013), *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1357-1369 e Crasto *et al.*, (2000), *Protein Eng.* 13(5):309-312, cujo conteúdo completo é aqui incorporado por referência.

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

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

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

[073] Em modalidades, o ligante compreende uma região de dobradiça de um anticorpo (*por exemplo*, de IgG, IgA, IgD, e IgE, inclusive de subclasses (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e IgA1 e IgA2)). A

região de dobradiça, encontrada nos anticorpos de classe IgG, IgA, IgD e IgE, atua como um espaçador flexível, permitindo que a porção Fab se mova livremente no espaço. Em contraste com as regiões constantes, os domínios de haste são estruturalmente diversos, variando tanto em sequência quanto em comprimento entre classes. Por exemplo, o comprimento e a flexibilidade da região de dobradiça variam entre as subclasses da IgG. A região de dobradiça de IgG1 engloba os aminoácidos 216-231 e, por ser livremente flexível, os fragmentos Fab podem girar em torno de seus eixos de simetria e se mover dentro de uma esfera centrada na primeira das duas pontes de dissulfeto da inter-cadeia pesada. A IgG2 tem uma dobradiça mais curta do que a IgG1, com 12 resíduos de aminoácidos e quatro pontes de dissulfeto. A região de dobradiça da IgG2 não possui um resíduo de glicina, é relativamente curta e contém uma dupla hélice rígida de poli-prolina, estabilizada por pontes de dissulfeto de inter-cadeia pesada extra. Essas propriedades restringem a flexibilidade da molécula da IgG2. A IgG3 difere das outras subclasses pela sua única região de dobradiça estendida (cerca de quatro vezes maior que a dobradiça da IgG1), contendo 62 aminoácidos (incluindo 21 prolínas e 11 cisteínas), formando uma dupla hélice de poliprolina inflexível. Na IgG3, os fragmentos Fab são relativamente distantes do fragmento Fc, proporcionando à molécula maior flexibilidade. A dobradiça alongada da IgG3 também é responsável pelo seu peso molecular mais elevado em comparação com as outras subclasses. A região de dobradiça da IgG4 é mais curta do que a da IgG1 e sua flexibilidade é intermediária entre a da IgG1 e da IgG2. A flexibilidade das regiões de dobradiça declina alegadamente na ordem IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2. Em modalidades, pode ser derivado de IgG4 humana e conter uma ou mais mutações para aumentar a dimerização (incluindo S228P) ou a ligação de FcRn

[074] De acordo com estudos cristalográficos, a região de dobradiça da imunoglobulina pode ser ainda subdividida funcionalmente em três regiões: a região de dobradiça superior, a região do núcleo e a região de



dobradiça inferior. Ver Shin *et al.*, 1992 *Immunological Reviews* 130:87. A região de dobradiça superior inclui aminoácidos da extremidade carboxil de C<sub>H1</sub> para o primeiro resíduo na dobradiça que restringe o movimento, geralmente o primeiro resíduo de cisteína que forma uma ligação dissulfeto intercadeia entre as duas cadeias pesadas. O comprimento da região de dobradiça superior correlaciona-se com a flexibilidade segmentar do anticorpo. A região de dobradiça do núcleo contém as pontes de dissulfeto inter-cadeias pesadas, e a região de dobradiça inferior une-se à extremidade do terminal amino do domínio C<sub>H2</sub> e inclui resíduos em C<sub>H2</sub>. *Id.* A região de dobradiça central da IgG1 humana de tipo selvagem contém a sequência CPPC (SEQ ID NO: 48) que, quando dimerizada por formação de ligações dissulfeto resulta em um octapeptídeo cíclico que acredita-se que atua como um pivô, conferindo flexibilidade. Em modalidades, o presente ligante compreende, um ou dois, ou três da região de dobradiça superior, a região do núcleo e a região de dobradiça inferior de qualquer anticorpo (*por exemplo*, IgG, IgA, IgD e IgE, inclusive de subclasses (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e IgA1 e IgA2)). A região de dobradiça também pode conter um ou mais sítios de glicosilação, que incluem vários tipos de sítios estruturalmente distintos para anexos de carboidratos. Por exemplo, IgA1 contém cinco sítios de glicosilação dentro de um segmento de 17 aminoácidos da região de dobradiça, conferindo resistência do polipeptídeo da região de dobradiça a proteases intestinais, considerada uma propriedade vantajosa para uma imunoglobulina secretória. Em modalidades, o ligante da presente invenção compreende um ou mais sítios de glicosilação

[075] Em modalidades, o ligante compreende um domínio Fc de um anticorpo (*por exemplo*, de IgG, IgA, IgD, e IgE, inclusive de subclasses (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e IgA1 e IgA2)). Em modalidades, o ligante compreende um domínio de haste CH2-CH3Fc derivado de um anticorpo de IgG4 humana. Em modalidades, o ligante compreende um domínio CH2-CH3Fc de haste derivado de um anticorpo de IgG1 humana. Em

modalidades, o domínio Fc exibe afinidade aumentada e ligação aumentada ao receptor Fc neonatal (FcRn). Em modalidades, o domínio Fc inclui uma ou mais mutações que aumentam a afinidade e aumentam a ligação a FcRn. Sem querer estar limitado pela teoria, acredita-se que o aumento da afinidade e a melhoria da ligação ao FcRn aumenta a meia vida *in vivo* das presentes proteínas quiméricas.

[076] Em modalidades, o domínio Fc em um ligante contém uma ou mais substituições de aminoácidos nos resíduos de aminoácidos 250, 252, 254, 256, 308, 309, 311, 416, 428, 433 ou 434 (de acordo com a numeração de Kabat, como em Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) expressamente incorporado aqui por referência), ou equivalentes dos mesmos. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 250 é uma substituição com glutamina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 252 é uma substituição por tirosina, fenilalanina, triptofano ou treonina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 254 é uma substituição por treonina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 256 é uma substituição por serina, arginina, glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico ou treonina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 308 é uma substituição por por treonina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 309 é uma substituição por prolina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 311 é uma substituição por serina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 385 é uma substituição por, arginina, ácido aspártico, serina, treonina, histidina, lisina, alanina ou glicina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 386 é uma substituição por treonina, prolina, ácido aspártico, serina, lisina, arginina, isoleucina ou metionina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 387 é uma substituição

por arginina, prolina, histidina, serina, treonina ou alanina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 389 é uma substituição por prolina, serina ou asparagina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 416 é uma substituição por serina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 428 é uma substituição por leucina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 433 é uma substituição por arginina, serina, isoleucina, prolina ou glutamina. Em modalidades, a substituição de aminoácido no resíduo de aminoácido 434 é uma substituição por histidina, fenilalanina ou tirosina.

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

[078] Em modalidades, os anticorpos humanizados modificados da invenção compreendem uma região constante de IgG que contém uma ou mais mutações nos resíduos de aminoácidos 250, 253, 307, 310, 380, 428, 433, 434, e 435 (de acordo com a numeração de Kabat, como em Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) expressamente incorporado aqui por referência). Mutações ilustrativas incluem T250Q, M428L, T307A, E380A, I253A, H310A, M428L, H433K, N434A, N434F, N434S e H435A. Em modalidades, a região constante de IgG compreende uma

mutação M428L/N434S ou mutação LS. Em uma modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação T250Q/M428L ou mutação QL. Em uma modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação N434A. Em uma modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação T307A/E380A/N434A ou uma mutação AAA. Em uma modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação I253A / H310A / H435A ou mutação IHH. Em uma modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação H433K/N434F. Em uma modalidade, a região constante de IgG compreende uma mutação M252Y/S254T/T256E e uma mutação H433K/N434F em combinação.

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

[080] Em modalidades, o domínio Fc em um ligante tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (ver a tabela abaixo), ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de identidade. Em modalidades, as mutações são feitas com a SEQ ID NO: 25 para aumentar a estabilidade e/ou meia-vida. Em modalidades, o domínio Fc em um ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (ver a tabela abaixo), ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de identidade. Um mutante estabilizador Fc ilustrativo é S228P. Os mutantes que se estendem na meia-vida do Fc ilustrativo são T250Q, M428L, V308T, L309P e Q311S e os presentes ligantes podem compreender 1, ou 2, ou 3, ou 4, ou 5 destes mutantes. Por exemplo, em modalidades, o domínio Fc em um ligante compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (ver a tabela abaixo), ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de

identidade.

[081] Além disso, um ou mais ligantes de junção podem ser empregados para ligar um domínio Fc num ligante (*por exemplo*, uma de SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 ou pelo menos 90%, ou 93%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99% de identidade) e os domínios extracelulares. Por exemplo, qualquer uma de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, ou variantes das mesmas, podem ligar um domínio extracelular (ECD) como aqui descrito e um domínio Fc em um ligante como aqui descrito. Opcionalmente, qualquer uma de SEQ ID NOs: 28 a 74, ou variantes das mesmas estão localizados entre um domínio extracelular, tal como aqui descrito e um domínio de Fe, tal como aqui descrito. Em modalidades, uma proteína quimérica compreende um ligante de junção precedendo um domínio de Fc e um segundo ligante de junção seguindo o domínio de Fc; assim, uma proteína quimérica pode compreender a seguinte estrutura.

[082] ECD 1 (*por exemplo*, CSF1R) - Ligante de junção 1 - Domínio Fc - Ligante de junção 2 - ECD 2 (*por exemplo*, CD40L).

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

[084] Em modalidades, o primeiro e o segundo ligantes de junção podem ser selecionados das sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 25 a 74 e são fornecidos na Tabela 1 abaixo:

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

SEQ ID NO.	Sequência
25	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLMSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT

	CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSRLTV DKSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
26	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTPHSDWLSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSRLTV DKSSWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLGK
27	APEFLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYK CKVSSKGLPSSIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLGLGK
28	SKYGPPCPSCP
29	SKYGPPCPPCP
30	SKYGPP
31	IEGRMD
32	GGGVPRDCG
33	IEGRMDGGGGAGGGG
34	GGSGGGGS
35	GGSGGGGGSGGG
36	EGKSSGSGSESKST
37	GGSG
38	GGSGGGSGGGSG
39	EAAAKEAAAKEAAAK
40	EAAAREAAAAREAAAAR
41	GGGGSGGGGSGGGGSAS
42	GGGGAGGGG
43	GS ou GGS ou LE
44	GSGSGS

45	GSGSGSGSGS
46	GGGGSAS
47	APAPAPAPAPAPAPAPAP
48	CPPC
49	GGGGS
50	GGGGSGGGGS
51	GGGGSGGGGSGGGGS
52	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
53	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
54	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
55	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
56	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
57	GGSGGSGGGGSGGGGS
58	GGGGGGGG
59	GGGGGG
60	EAAAK
61	EAAAKEAAAK
62	EAAAKEAAAKEAAAK
63	AEAAAKEAAAKA
64	AEAAAKEAAAKEAAAKA
65	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
66	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
67	AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
68	PAPAP
69	KESGSVSSEQLAQFRSLD
70	GSAGSAAGSGEF
71	GGGSE
72	GSESG

73	GSEGS
74	GEGGSLEGSSLEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGG

[085] Em modalidades, o ligante de junção substancialmente compreende resíduos de glicina e serina (*por exemplo*, cerca de 30%, ou cerca de 40%, ou cerca de 50%, ou cerca de 60%, ou cerca de 70%, ou cerca de 80%, ou cerca de 90%, ou cerca de 95%, ou cerca de 97%, ou cerca de 98%, ou cerca de 99%, ou cerca de 100% de glicinas e serinas). Por exemplo, em modalidades, o ligante de junção é  $(Gly_4Ser)_n$ , onde n é de cerca de 1 a cerca de 8, *por exemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 (SEQ ID NO: 49 a SEQ ID NO: 56, respectivamente). Em modalidades, a sequência do ligante de junção é GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 57). Ligantes de junção ilustrativos adicionais incluem, mas não estão limitados a, ligantes que têm a sequência LE,  $(Gly)_8$  (SEQ ID NO: 58),  $(Gly)_6$  (SEQ ID NO: 59),  $(EAAAK)_n$  (n=1-3) (SEQ ID NO: 60 - SEQ ID NO: 62),  $A(EAAAK)_nA$  (n = 2-5) (SEQ ID NO: 63 – SEQ ID NO: 66),  $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$  (SEQ ID NO: 67), PAPAP (SEQ ID NO: 68), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 69), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 70), e  $(XP)_n$ , com X designando qualquer aminoácido, *por exemplo*, Ala, Lys, ou Glu. Em modalidades, o ligante de junção é GGS.

[086] Em modalidades, o ligante de junção é um ou mais de GGGSE (SEQ ID NO: 71), GSESG (SEQ ID NO: 72), GSEGS (SEQ ID NO: 73), GEGGSLEGSSLEGSSSEGGGSEGGGSEGGGSEGGG (SEQ ID NO: 74), e um ligante de junção de G, S e E colocados aleatoriamente a cada 4 intervalos de aminoácidos.

[087] Em modalidades, uma proteína quimérica compreende um ligante modular, tal como mostrado na **FIG. 20**.

[088] Em modalidades, o ligante pode ser funcional. Por exemplo, sem limitação, o ligante pode funcionar para melhorar a dobragem e/ou estabilidade, melhorar a expressão, melhorar a farmacocinética e / ou



melhorar a bioatividade da presente proteína quimérica. Em outro exemplo, o ligante pode funcionar para direcionar a proteína quimérica para um tipo ou local de célula em particular.

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

[090] Em modalidades, uma proteína quimérica com a fórmula ECD 1 - Ligante de Junção 1 - Domínio de Fc - Ligante de Junção 2 - ECD 2, em que ECD 1 é CSF1R e ECD 2 é CD40L pode ser referido na presente divulgação como CSF1R-Fc-CD40L. Em modalidades, a proteína quimérica não tem um ou ambos os ligantes de junção; tal proteína quimérica pode ser referida na presente divulgação como CSF1R-Fc-CD40L.

[091] Em modalidades, uma proteína quimérica é uma proteína de fusão com a fórmula N terminal - (a) - (b) - (c) - C terminal, em que (a) é CSF1R, (b) é um ligante compreendendo pelo menos uma porção de um domínio Fc, e (c) é CD40L pode ser referido na presente divulgação como CSF1R-Fc-CD40L.

[092] Em modalidades, uma proteína quimérica é

otimizada para/dirigida a ligandos/receptores murinos; um exemplo de uma tal proteína quimérica é CSF1R-Fc-CD40L murina, que também é aqui referida como mCSF1R-Fc-CD40L.

[093] Em modalidades, uma proteína quimérica é otimizada para/dirigida a ligandos/receptores humanos; um exemplo de tal proteína quimérica é CSF1R-Fc-CD40L humana, que também é aqui referida como hCSF1R-Fc-CD40L.

[094] Estas proteínas quiméricas podem não ter um ou ambos os ligantes de junção. Ligantes de Junção Exemplificativos 1s, Domínios Fc e Ligantes de Junção 2 são descritos acima na Tabela 1; ligantes modulares úteis para a formação de proteínas quiméricas e compreendendo ligantes de junção específicos 1s, domínios de Fc e Ligantes de Junção 2s são mostrados em **FIG. 20**. Em modalidades, a presente proteína quimérica é modificada para atingir a via de sinalização imunoinibitória CSF1R/CSF1. Em modalidades, a proteína quimérica é engenheirada para interromper, bloquear, reduzir e/ou inibir a transmissão de um sinal imunoinibitório mediado pela ligação de CSF1 a CSF1R. Em modalidades, um sinal imunoinibitório refere-se a um sinal que diminui ou elimina uma resposta imune. Por exemplo, no contexto da oncologia, esses sinais podem diminuir ou eliminar a imunidade antitumoral. Em condições fisiológicas normais, sinais inibitórios são úteis na manutenção da autotolerância (*por exemplo*, prevenção de autoimunidade) e também para proteger os tecidos contra danos quando o sistema imunológico está respondendo à infecção patogênica. Por exemplo, sem limitação, um sinal imunoinibitório pode ser identificado pela detecção de um aumento na proliferação celular, produção de citocinas, atividade de morte celular ou atividade fagocitária quando tal sinal inibitório é bloqueado.

[095] Em modalidades, a presente proteína quimérica interrompe, bloqueia, reduz e/ou inibe a transmissão de um sinal imunoinibitório mediado pela ligação de CSF1 ou IL-34 a CSF1R. In embodiments, a proteína quimérica se liga e sequestra CSF1 ou IL-34, e rompe deste modo interrompe,

bloqueia, reduz, e/ou inibe a transmissão do sinal inibitório a uma célula imune (*por exemplo*, macrófago associado a tumor, célula apresentadora de antígeno, célula mieloide ou célula T).

[096] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram uso em métodos compreendendo, inibir ou reduzir a ligação do par receptor/ligando imunoinibitório: CSF1R/CSF1 ou CSF1R/IL-34. Em modalidades, a presente proteína quimérica bloqueia, reduz e/ou inibe a ativação de CSF1R, por exemplo, reduzindo a ligação de CSF1R em células imunes com CSF1 ou IL-34.

[097] Em modalidades, a presente proteína quimérica direciona um sinal imunoestimulatório mediado pela ligação de CD40L a CD40. Em modalidades, a proteína quimérica é engenheirada para intensificar, aumentar e/ou estimular a transmissão de um sinal imunoestimulatório mediado pela ligação de CD40L a CD40. Em modalidades, um sinal imunoestimulatório refere-se a um sinal que aumenta uma resposta imune. Por exemplo, no contexto da oncologia, esses sinais podem melhorar a imunidade antitumoral. Por exemplo, sem limitação, o sinal imunoestimulatório pode ser identificado estimulando diretamente a proliferação, a produção de citocinas, a atividade letal ou a atividade fagocitária dos leucócitos, incluindo subconjuntos de células T.

[098] Em modalidades, a presente proteína quimérica intensifica, aumenta e/ou estimula a transmissão de um sinal imunoestimulatório mediado pela ligação de CD40L a CD40. Em modalidades, a presente proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de CD40L atua sobre uma célula imune (*por exemplo*, uma célula dendrítica, uma célula B, um macrófago, uma célula apresentadora de antígenos ou uma célula T) que expressa CD40 e intensifica, aumenta e/ou estimula a transmissão de sinal estimulatório para a célula imune (*por exemplo*, uma célula dendrítica, uma célula B, um macrófago e uma célula T).

[099] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas

são capazes de, ou encontram uso em métodos compreendendo, estimular ou reforçar a ligação de pares do ligando/receptor imunoestimulatórios: CD40:CD40L. Em modalidades, a presente proteína quimérica aumenta e/ou estimula o CD40 e/ou a ligação do CD40 com um ou mais de CD40L.

[100] Em modalidades, a presente proteína quimérica compreende um domínio extracelular da proteína de tipo II, com exceção de CD40L. Exemplos de proteínas do tipo II incluem 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL. A presente invenção inclui ainda proteínas quiméricas e métodos utilizando as seguintes proteínas quiméricas: CSF1R/4-1BBL, CSF1R/CD30L, CSF1R/FasL, CSF1R/GITRL, CSF1R/LIGHT, CSF1R/OX40L, CSF1R/TL1A, e CSF1R/TRAIL. Em modalidades, a proteína quimérica tem uma estrutura geral de um de CSF1R-Fc-4-1BBL, CSF1R-Fc-CD30L, CSF1R-Fc-FasL, CSF1R-Fc-GITRL, CSF1R-Fc-LIGHT, CSF1R-Fc-OX40L, CSF1R-Fc-TL1A, e CSF1R-Fc-TRAIL.

[101] A sequência de aminoácidos para 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL, respectivamente, compreende SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 17, 6, 21, e 23.

[102] Em modalidades, a proteína quimérica compreende o domínio extracelular de um de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A e TRAIL que, respectivamente, compreende SEQ ID NO:10, 12, 14, 16, 18, 7, 22 e 24. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas podem compreender o domínio extracelular de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A ou TRAIL, como aqui descrito, ou uma variante ou um fragmento funcional do mesmo. Por exemplo, as proteínas quiméricas podem incluir uma sequência do domínio extracelular de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, ou TRAIL como fornecido acima ou uma variante ou fragmento funcional do mesmo, tendo pelo menos cerca de 60%, ou pelo menos cerca de 61%, ou em pelo menos cerca de 62%, ou pelo menos cerca de 63%, ou pelo menos cerca de 64%, ou pelo menos cerca de 65%, ou pelo menos cerca de 66%, ou pelo menos cerca de 67%, ou pelo menos cerca de 68%, ou pelo

menos cerca de 69%, ou pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 71%, ou pelo menos cerca de 72%, ou pelo menos cerca de 73%, ou pelo menos cerca de 74%, ou pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 76%, ou pelo menos cerca de 77%, ou pelo menos cerca de 78%, ou pelo menos cerca de 79%, ou pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 81%, ou pelo menos cerca de 82%, ou pelo menos cerca de 83%, ou pelo menos cerca de 84%, ou pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 86%, ou pelo menos cerca de 87%, ou pelo menos cerca de 88%, ou pelo menos cerca de 89%, ou pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 91%, ou pelo menos cerca de 92%, ou pelo menos cerca de 93%, ou pelo menos cerca de 94%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 96%, ou pelo menos cerca de 97%, ou pelo menos cerca de 98% ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos do domínio extracelular de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, ou TRAIL como descrito acima.

[103] Em modalidades, a proteína quimérica da invenção fornece uma estimulação imune para uma célula imune (*por exemplo*, uma célula apresentadora de antígenos) enquanto fornece uma armadilha ou sequestrador localizado de sinais inibitórios. Em modalidades, a proteína quimérica fornece sinais que têm o resultado líquido da ativação imune.

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

[105] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas

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

[106] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram uso em métodos que envolvem, mascarar um ligante inibitório na superfície de uma célula tumoral e substituindo esse ligante inibitório imune por um ligante estimulatório imune. Por exemplo, a presente proteína quimérica compreende (a) um domínio extracelular de CSF1R e (b) um domínio extracelular de CD40L, permite a interrupção de um sinal inibitório de CSF1/CSF1R e substituindo-o por um sinal de estimulação de CD40L/CD40. Consequentemente, as presentes proteínas quiméricas, em modalidades, são capazes de, ou encontram uso em métodos envolvendo, reduzindo ou eliminando um sinal inibitório imune e/ou aumentando ou ativando um sinal imunoestimulatório. Por exemplo, um tumor compreendendo um sinal inibitório (evitando assim uma resposta imune) pode ser substituída por uma ligação de sinal positiva num macrófago ou numa célula T que pode então atacar uma célula tumoral. Consequentemente, em modalidades, um sinal imunoinibitório é mascarado pelos presentes construtos e um sinal imunoestimulatório é ativado. Tais propriedades benéficas são reforçadas pela abordagem de construto único das presentes proteínas quiméricas. Por exemplo, a substituição do sinal pode ser efetuada quase simultaneamente, por exemplo, contemporaneamente, e a substituição do sinal é feita sob medida para ser local em um sítio de importância clínica (*por exemplo* o microambiente tumoral).

[107] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas

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

[108] Em algumas modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, ou encontram utilização em métodos que envolvem, causar um aumento de uma ou mais células T (incluindo sem limitação linfócitos T citotóxicos, células T auxiliares, células T assassinas naturais (NKT)), células B, células assassinas naturais (NK), células T assassinas naturais (NKT), células dendríticas, monócitos e macrófagos (*por exemplo*, um ou mais de M1 e M2) num tumor ou no microambiente tumoral. Em modalidades, a proteína quimérica intensifica o reconhecimento de antígenos tumorais por células T CD8+, particularmente aquelas células T que se infiltraram no microambiente tumoral. Em modalidades, a presente proteína quimérica induz a expressão de CD19 e/ou aumenta o número de células CD19 positivas (*por exemplo*, CD19 células B positivas). Numa modalidade, a presente proteína quimérica induz a expressão de IL-15R $\alpha$  e/ou aumenta o

número de células positivas IL-15R $\alpha$  (*por exemplo*, células dendríticas positivas IL-15R $\alpha$ ).

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

[110] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos que compreendem inibir e/ou reduzir a inativação de células T e/ou a tolerância imunológica a um tumor, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de uma proteína quimérica aqui descrita a um sujeito. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de aumentar os níveis séricos de várias citocinas incluindo, mas não se limitando a, um ou mais de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F e IL-22. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de aumentar a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF $\alpha$  ou IFN $\gamma$  no soro de um sujeito tratado. A detecção de tal resposta de citocina pode fornecer um método para determinar o regime de dosagem ideal para a proteína quimérica indicada (ver, por exemplo,

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



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

[112] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas são capazes de, e podem ser utilizadas em métodos compreendendo, aumentar uma razão de células T efectoras para células T regulatórias. Células T efectoras ilustrativas incluem ICOS<sup>+</sup> células T efectoras; células T citotóxicas (*por exemplo*, αβ TCR, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>); células T efectoras CD4<sup>+</sup> (*por exemplo*, αβ TCR, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, IL-7R/CD127<sup>+</sup>); células T efectoras CD8<sup>+</sup> (*por exemplo*, αβ TCR, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, IL-7R/CD127<sup>+</sup>); células T efectoras de memória (*por exemplo*, CD62L<sup>low</sup>, CD44<sup>+</sup>, TCR, CD3<sup>+</sup>, IL-7R/CD127<sup>+</sup>, IL-15R<sup>+</sup>, CCR7<sup>low</sup>); células T de memória central (*por exemplo*, CCR7<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>; ou CCR7<sup>hi</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, TCR, CD3<sup>+</sup>, IL-7R/CD127<sup>+</sup>, IL-15R<sup>+</sup>); células T efectoras CD62L<sup>+</sup>; células T efectoras de memória (TEM) CD8<sup>+</sup> incluindo células T de memória efectoras precoces (CD27<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) e células T de memória efectoras tardias (CD27<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>) (TemE e TemL, respectivamente); células T efectoras CD127<sup>(+)</sup>CD25<sup>(low/-)</sup>; células T efectoras CD127<sup>(-)</sup>CD25<sup>(-)</sup>; células efectoras de memória de células-tronco CD8<sup>+</sup> (TSCM) (*por exemplo*, CD44<sup>(low)</sup>CD62L<sup>(high)</sup>CD122<sup>(high)</sup>sca<sup>(+)</sup>); células T efectoras TH1 (*por exemplo*, CXCR3<sup>+</sup>, CXCR6<sup>+</sup> e CCR5<sup>+</sup>; ou αβ TCR, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, IL-12R<sup>+</sup>, IFNγR<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup>), células T efectoras TH2 (*por exemplo*,

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

[113] Em modalidades, a proteína quimérica da invenção causa um aumento nas células T efetoras (*por exemplo*, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>).

[114] Em modalidades, a proteína quimérica da invenção causa uma diminuição nas células T efetoras (*por exemplo*, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>).

[115] Em modalidades, a proteína quimérica gera uma resposta de memória que pode, por exemplo, ser capaz de prevenir a recaída ou proteger o animal de um re-desafio. Assim, um animal tratado com a proteína quimérica é mais tarde capaz de atacar células tumorais e/ou prevenir o desenvolvimento de tumores quando re-desafiado após um tratamento inicial

com a proteína quimérica. Conseqüentemente, uma proteína quimérica da presente invenção estimula tanto a destruição do tumor ativo e também o reconhecimento imunológico de antígenos tumorais, que são essenciais para a programação de uma resposta de memória capaz de prevenir a recaída.

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

[117] Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam vantagens incluindo, sem limitação, facilidade de uso e facilidade de produção. Isso ocorre porque dois agentes imunoterápicos distintos são combinados em um único produto, o que permite um único processo de fabricação, em vez de dois processos de fabricação independentes. Além disso, a administração de um único agente em vez de dois agentes separados permite uma administração mais fácil e maior adesão do paciente.

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

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

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

[121] Em modalidades, a presente proteína quimérica exibe uma  $K_d$  (1/s) para CSF1 ou IL-34 humana de mais de cerca de  $2 \times 10^6$ , cerca de  $2,5 \times 10^6$ , cerca de  $3 \times 10^6$ , cerca de  $3,5 \times 10^6$ , cerca de  $4 \times 10^6$ , cerca de  $4,5 \times 10^6$ , cerca de  $5 \times 10^6$ , cerca de  $5,5 \times 10^6$ , cerca de  $6 \times 10^6$ , cerca de  $6,5 \times 10^6$ , cerca de  $7 \times 10^6$ , cerca de  $7,5 \times 10^6$ , cerca de  $8 \times 10^6$ , cerca de  $8,5 \times 10^6$ , cerca de  $9 \times 10^6$ , ou cerca de  $9,5 \times 10^6$  (como medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CSF1 humana com um  $K_D$  de cerca de 100 pM a

cerca de 600 pM. Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CSF1 humana com uma taxa de associação  $K_a$  (1/Ms) de cerca de  $5,7 \times 10^4$  e desliga de CSF1 humana com uma taxa  $K_d$  on (1/s) de cerca de  $7,3 \times 10^{-6}$ .

[122] Em modalidades, a presente proteína quimérica exibe uma  $K_d$  (1/s) para CD40 humana de mais de cerca de  $2 \times 10^6$ , cerca de  $2,5 \times 10^6$ , cerca de  $3 \times 10^6$ , cerca de  $3,5 \times 10^6$ , cerca de  $4 \times 10^6$ , cerca de  $4,5 \times 10^6$ , cerca de  $5 \times 10^6$ , cerca de  $5,5 \times 10^6$ , cerca de  $6 \times 10^6$ , cerca de  $6,5 \times 10^6$ , cerca de  $7 \times 10^6$ , cerca de  $7,5 \times 10^6$ , cerca de  $8 \times 10^6$ , cerca de  $8,5 \times 10^6$ , cerca de  $9 \times 10^6$ , ou cerca de  $9,5 \times 10^6$  (como medido, por exemplo, por ressonância plasmônica de superfície ou interferometria de biocamada). Em modalidades, a proteína quimérica se liga a CD40 humana com uma taxa de associação  $K_a$  (1/Ms) de cerca de  $1,3 \times 10^4$  e desliga de CD40 humana com uma taxa de dissociação  $K_d$ (1/s) de cerca de  $6,7 \times 10^{-6}$ .

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

[124] De fato, foi relatado que tratamentos sequenciais com anticorpos bloqueadores de CSF1 e anticorpos agonistas de CD40, por exemplo, induzem toxicidade hepática. *Ver, por exemplo, Byrne et al. J. Immunology, 2016.* Os dados aqui divulgados (ver, por exemplo, a **FIG. 13**) mostram similarmente que os dois anticorpos são altamente tóxicos quando coadministrados a camundongos e causam inflamação intestinal letal e diarreia. Em contraste e surpreendentemente, tratamentos com uma proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L bloqueia CSF1R (que inibe a transmissão de um sinal imunoinibitório) e ativa CD40 (que intensifica, aumenta e/ou estimula a transmissão de um sinal imunoestimulatório), mas sem a toxicidade resultante dos cotratamentos com anticorpos. Além disso, em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam efeitos terapêuticos sinérgicos (*por*

*exemplo*, efeitos antitumorais), uma vez que permitem uma interação melhorada específica do local de dois agentes de imunoterapia. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas proporcionam efeitos terapêuticos sinérgicos quando comparadas com anticorpos agonistas de CD40 e/ou anticorpos antagonistas de CSF1R. Em modalidades, as presentes proteínas quiméricas fornecem o potencial para reduzir a toxicidade fora do sítio e/ou sistêmica.

[125] Em modalidades, a presente proteína quimérica exibe perfis de segurança intensificados. Em modalidades, a presente proteína quimérica exibe perfis de toxicidade reduzidos. Por exemplo, administração da presente proteína quimérica pode resultar em efeitos secundários reduzidos, tais como um ou mais de diarreia, inflamação (*por exemplo*, do intestino), ou perda de peso, que são observados com a administração de anticorpos agonistas de CD40 e/ou anticorpos antagonistas de CD115. Em modalidades, a presente proteína quimérica proporciona uma maior segurança, em comparação com anticorpos agonistas de CD40 e/ou anticorpos antagonistas de CD115, sem sacrificar a eficácia.

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

### ***Doenças, Métodos de Tratamento e Seleções de Pacientes***

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

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

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

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

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



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

[132] Em modalidades, a proteína quimérica é utilizada para tratar um sujeito que tem um câncer refratário ao tratamento. Em modalidades, a proteína quimérica é utilizada para tratar um sujeito que é refratário a um ou mais agentes imunomoduladores. Por exemplo, em modalidades, a proteína quimérica é utilizada para tratar um sujeito que não apresenta resposta ao tratamento, ou mesmo progresso, após 12 semanas ou mais de tratamento. Por exemplo, em modalidades, o sujeito é refratário a um agente PD-1 e/ou PD-L1 e/ou PD-L2, incluindo, por exemplo, nivolumabe (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), pembrolizumabe (KEYTRUDA, MERCK), pidilizumabe (CT-011, CURE TECH), MK-3475 (MERCK), BMS 936559 (BRISTOL MYERS SQUIBB), Ibrutinibe (PHARMACUCLICS/ABBVIE), atezolizumabe (TECENTRIQ, GENENTECH), e/ou pacientes refratários MPDL3280A (ROCHE). Por exemplo, em modalidades, o sujeito é refratário a um agente anti-CTLA-4, *por exemplo*, pacientes refratários de ipilimumabe (YERVOY) (*por exemplo*, pacientes com melanoma). Em conformidade, em modalidades, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de câncer que resgatam pacientes que não

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

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

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

[135] Em modalidades, a doença inflamatória é uma doença autoimune ou condição, tal como esclerose múltipla, diabetes mellitus, lúpus, doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de Guillain-Barre, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, granulomatose de Wegener, epilepsia autoimune, encefalite de Rasmussen, esclerose biliar primária, colangite esclerosante, Hepatite autoimune, doença de Addison, tiroidite de Hashimoto, fibromialgia, síndrome de Meniere; rejeição de transplante (por exemplo, prevenção da rejeição de aloenxerto) anemia perniciosa, artrite

reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, miastenia grave, síndrome de Reiter, doença de Grave, e outras doenças autoimunes.

[136] Em aspectos, os presentes agentes quiméricos são utilizados em métodos de ativação de uma célula apresentadora de antígenos, *por exemplo*, através do domínio extracelular de CD40L.

[137] Em aspectos, os presentes agentes quiméricos são utilizados em métodos de prevenção da transmissão celular de um sinal imunossupressor através do domínio extracelular de CSF1R.

### ***Terapias de Combinação e Conjugação***

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

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

[140] Em modalidades, a presente proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de CSF1R como aqui descrito é coadministrada com outra proteína quimérica. Em modalidades, a presente proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de CSF1R como aqui descrito é coadministrada com outra proteína quimérica, *por exemplo*, aquele que modula a resposta imune adaptativa. Em modalidades, a presente proteína quimérica que compreende o domínio extracelular de CSF1R, tal como aqui descrito é coadministrado com uma proteína quimérica que compreende um ou mais de OX40L, PD-1, GITRL, 4-1BBL, SIRP $\alpha$ , TIM3,

TIGIT, LIGHT e VSIG8. Sem desejar estar limitado pela teoria, acredita-se que um regime combinado envolvendo a administração da presente proteína quimérica que induz uma resposta imune inata e uma ou mais proteínas quiméricas que induzem uma resposta imune adaptativa pode fornecer efeitos sinérgicos (*por exemplo*, efeitos antitumorais sinérgicos).

[141] Qualquer proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa pode ser utilizada na presente invenção. Por exemplo, a proteína quimérica pode ser qualquer uma das proteínas quiméricas divulgadas em US 62/464.002 que induzem uma resposta imune adaptativa. Em tais modalidades, a proteína quimérica compreende um primeiro domínio extracelular de uma proteína transmembranar tipo I no ou próximo do N terminal e um segundo domínio extracelular de uma proteína transmembranar tipo II na ou próximo do C terminal, em que um do primeiro e do segundo domínios extracelulares proporciona um sinal imunoinibitório e um do primeiro e do segundo domínios extracelulares proporciona um sinal imunoestimulatório, tal como divulgado em U.S. 62/464.002, todo o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência. Numa modalidade exemplificativa, a proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa é uma proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de PD-1 no N terminal e o domínio extracelular de OX40L, GITRL ou 4-1BBL no C terminal. Numa modalidade, a proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa é uma proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de VSIG8 no N terminal e o domínio extracelular de OX40L, GITRL, ou 4-1BBL no C terminal.

[142] Em modalidades, a presente proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de CSF1R, tal como aqui descrito, é administrada a um paciente para estimular a resposta imune inata e, subsequentemente (*por exemplo*, 1 dia depois, ou 2 dias depois, ou 3 dias depois, ou 4 dias depois, ou 5 dias depois, ou 6 dias depois, ou 1 semana depois, ou 2 semanas depois, ou 3 semanas depois, ou 4 semanas depois) que uma proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa é

administrada.

[143] Em modalidades, incluindo, sem limitação, aplicações de câncer, a presente invenção se refere a agentes quimioterapêuticos como agentes adicionais. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem, sem limitação, agentes alquilantes como tiotepa e CYTOXAN ciclofosfamida; sulfonatos de alquila como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolmelamina; acetogeninas (*por exemplo*, bulatacina e bulatacinona); um camptotecina (incluindo o topotecano análogo sintético); briostatina, estatina de cally; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos, adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficina (*por exemplo*, criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; um sarcodictina; espongiostatina; mostardas de nitrogênio como o clorambucil, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureias como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos como a enedina de antibióticos (*por exemplo*, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama II e caliqueamicina ômega II (*ver, por exemplo*, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluindo dinemicina A; bisfosfonatos, tais como clodronato; uma esperamicina; bem como cromóforos de neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos cromoproteicos de enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofillina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA, doxorubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolina-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e deoxorrubicina deoxi), epirubicina, esorubicina, idarrubicina,

marcelomicina, mitomicinas, tais como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptomicina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos do ácido fólico, tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais, tais como minoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantrene; edatraxato; demecolcine; diaziquona; elformitina; acetato de eliptínio; uma eptilona; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinan; lonidainina; maitansinoides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazona; complexo polissacarídeo PSK (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxana; rizoxina; sizofurano; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (*por exemplo*, toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, *por exemplo*, TAXOL paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE Cremophor-free, formulação de nanopartículas de paclitaxel formulada com albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111.) e TAXOTERE doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbucil; gemcitabina GEMZAR; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina, tais como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposídeo (VP-16);

ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE. vinorelbina; novantrona; teniposídeo; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (Camptosar, CPT-11) (incluindo o regime de tratamento de irinotecano com 5-FU e leucovorina); inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tais como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatina, incluindo o regime de tratamento com oxaliplatina (FOLFOX); lapatinibe (TYKERB); inibidores de PKC- $\alpha$ , Raf, H-Ras, EGFR (*por exemplo*, erlotinibe (Tarceva)) e VEGF-A que reduzem a proliferação celular e sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de qualquer um dos anteriores. Além disso, os métodos de tratamento podem incluir ainda a utilização de radiação. Além disso, os métodos de tratamento podem incluir ainda o uso de terapia fotodinâmica.

[144] Em várias modalidades, incluindo, sem limitação, aplicações de câncer, o presente agente adicional é um ou mais agentes imunomoduladores selecionados de um agente que bloqueia, reduz e/ou inibe PD-1 e PD-L1 ou PD-L2 e/ou ou a ligação de PD-1 com PD-L1 ou PD-L2 (a título de exemplo não limitativo, um ou mais nivolumabe (ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), pembrolizumabe (KEYTRUDA, Merck), pidilizumabe (CT-011, CURE TECH), MK-3475 (MERCK), BMS 936559 (BRISTOL MYERS SQUIBB), atezolizumabe (TECENTRIQ, GENENTECH), MPDL3280A (ROCHE)), um agente que aumenta e/ou estimula CD137 (4-1BB) e/ou a ligação de CD137 (4-1BB) com um ou mais de ligando 4-1BB (a título de exemplo não limitativo, urelumabe (BMS-663513 e anticorpo anti-4-1BB) e um agente que bloqueia, reduz e/ou inibe a atividade de CTLA-4 e/ou a ligação de CTLA-4 com um ou mais de AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 e PPP2R5A e/ou a ligação de OX40 com OX40L (a título de exemplo não limitativo GBR 830 (GLENMARK), MEDI6469 (MEDIMMUNE)).

[145] Em modalidades, incluindo, sem limitação, aplicações de doenças infecciosas, a presente invenção refere-se a anti-

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

[146] Em modalidades, inclusive, sem limitação, de aplicações autoimunes, o agente adicional é um agente imunossupressor. Em modalidades, o agente imunossupressor é um agente anti-inflamatório, tal como um agente anti-inflamatório esteroideal ou um agente anti-inflamatório não esteroideal (NSAID). Esteroides, particularmente os corticosteroides suprarrenais e seus análogos sintéticos, são bem conhecidos na técnica. Exemplos de corticosteroides úteis na presente invenção incluem, sem limitação, hidroxiltriancinolona, alfa-metil-dexametasona, beta-metil-betametasona, dipropionato de beclometasona, benzoato de betametasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, dexametasona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetato de fluclorolona,



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

[147] Em modalidades, as proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) aqui descritas, incluem derivados que são modificados, *isto é*, pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula à composição de modo que a ligação covalente não impeça a atividade da composição. Por exemplo, mas não como limitação, os derivados incluem composições que foram modificadas por, *inter alia*, glicosilação, lipidação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos protetores/bloqueadores conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, *etc.* Qualquer uma das inúmeras modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas, incluindo, mas não se limitando a clivagem

química específica, acetilação, formilação, síntese metabólica de turicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos. Ainda em as proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) aqui descritas compreendem ainda um agente citotóxico, compreendendo, em modalidades ilustrativas, uma toxina, um agente quimioterapêutico, um radioisótopo e um agente que causa apoptose ou morte celular. Tais agentes podem ser conjugados com uma composição aqui descrita.

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

### **Formulações**

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

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

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

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

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

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

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

### ***Administração, Dosagem e Regimes de tratamento***

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

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

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

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

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

[158] Rotas de administração incluem, por exemplo: intratumoral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, retal, por inalação ou tópica, particularmente nos ouvidos, nariz, olhos ou pele. Em modalidades, a administração é efetuada oralmente ou por injeção parenteral. Em alguns casos, a administração resulta na liberação de qualquer agente aqui descrito na corrente sanguínea, ou alternativamente, o agente é administrado diretamente no local da doença ativa.

[159] Qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada oralmente. Tais proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) podem também ser administradas por qualquer outra via conveniente, por exemplo, por infusão intravenosa ou injeção de bolus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (*por exemplo*, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, *etc.*) e pode ser administrado em conjunto com outro agente biologicamente activo. A

administração pode ser sistêmica ou local. Vários sistemas de entrega são conhecidos, *por exemplo*, encapsulamento em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, *por exemplo*, e podem ser usados para administrar.

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

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

com imunoterapia convencional (*por exemplo*, tratamentos com um ou mais de OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY e TECENTRIQ).

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

[163] A dosagem de qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita, assim como o esquema de dosagem pode depender de vários parâmetros, incluindo, mas não limitados a, a doença a ser tratada, a saúde geral do sujeito e a descrição do médico assistente.

[164] Qualquer proteína quimérica aqui descrita, pode ser administrada antes (*por exemplo*, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas antes), concomitantemente com, ou subsequentemente (*por exemplo*, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas ou 12 semanas após) a administração de um agente adicional, a um sujeito em necessidade do mesmo. Em modalidades, qualquer proteína quimérica e agente adicional aqui descrito são administrados com 1 minuto de intervalo, 10 minutos de intervalo, 30 minutos de intervalo, menos de 1 hora de intervalo, 1 hora de intervalo, 1 hora a 2 horas de intervalo, 2 horas a 3 horas de intervalo, 3 horas a 4 horas de intervalo, 4 horas a 5 horas de intervalo, 5 horas a 6 horas de intervalo, 6 horas a 7 horas de intervalo, 7 horas a 8 horas de intervalo, 8 horas a 9 horas de intervalo, 9 horas a 10 horas de

intervalo, 10 horas a 11 horas de intervalo, 11 horas a 12 horas de intervalo, 1 dia de intervalo, 2 dias de intervalo, 3 dias de intervalo, 4 dias de intervalo, 5 dias de intervalo, 6 dias de intervalo, 1 semana de intervalo, 2 semanas de intervalo, 3 semanas de intervalo, ou 4 semanas de intervalo.

[165] Em modalidades, a presente invenção refere-se à coadministração da proteína quimérica presente compreendendo o domínio extracelular de um receptor de fator de estimulação de colônias (CSF1R) e uma outra proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa. Em tais modalidades, a presente proteína quimérica pode ser administrada antes, concorrentemente ou subsequentemente à administração da proteína quimérica que induz uma resposta imune adaptativa. Por exemplo, as proteínas quiméricas podem ser administradas com 1 minuto de intervalo, 10 minutos de intervalo, 30 minutos de intervalo, menos de 1 hora de intervalo, 1 hora de intervalo, 1 hora a 2 horas de intervalo, 2 horas a 3 horas de intervalo, 3 horas a 4 horas de intervalo, 4 horas a 5 horas de intervalo, 5 horas a 6 horas de intervalo, 6 horas a 7 horas de intervalo, 7 horas a 8 horas de intervalo, 8 horas a 9 horas de intervalo, 9 horas a 10 horas de intervalo, 10 horas a 11 horas de intervalo, 11 horas a 12 horas de intervalo, 1 dia de intervalo, 2 dias de intervalo, 3 dias de intervalo, 4 dias de intervalo, 5 dias de intervalo, 6 dias de intervalo, 1 semana de intervalo, 2 semanas de intervalo, 3 semanas de intervalo, ou 4 semanas de intervalo. Numa modalidade exemplificativa, a presente proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de CSF1R e a proteína quimérica, que induz uma resposta imune adaptativa são administrados com uma semana de intervalo, ou administrado em semanas alternadas (isto é, administração da presente proteína quimérica compreendendo o domínio extracelular de CSF1R é seguida uma semana mais tarde com a administração da proteína quimérica induzindo uma resposta imune adaptativa e assim por diante).

[166] A dosagem de qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode depender de vários fatores, incluindo a



gravidade da doença, se a condição deve ser tratada ou prevenida, e a idade, peso e saúde do sujeito a ser tratado. Adicionalmente, a informação farmacogenômica (o efeito do genótipo no perfil farmacocinético, farmacodinâmico ou de eficácia de uma terapêutica) sobre um determinado sujeito pode afetar a dosagem utilizada. Além disso, as dosagens individuais exatas podem ser ajustadas de alguma forma dependendo de uma variedade de fatores, incluindo a combinação específica dos agentes sendo administrados, o tempo de administração, a via de administração, a natureza da formulação, a taxa de excreção, a doença a ser tratada, a gravidade do distúrbio e a localização anatômica do distúrbio. Algumas variações na dosagem podem ser esperadas. Para administração de qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita por injeção parentérica, a dosagem pode ser de cerca de 0,1 mg a cerca de 250 mg por dia, cerca de 1 mg a cerca de 20 mg por dia, ou cerca de 3 mg a cerca de 5 mg por dia. Geralmente, quando administrada oral ou parenteralmente, a dosagem de qualquer agente aqui descrito pode ser de cerca de 0,1 mg a cerca de 1.500 mg por dia, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 10 mg por dia, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg por dia, ou cerca de 200 a cerca de 1.200 mg por dia ( *por exemplo*, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, cerca de 1.000 mg, cerca de 1.100 mg, cerca de 1.200 mg por dia).

[167] Em modalidades, administração da proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrito é, por injeção parenteral numa dosagem de cerca de 0,1 mg a cerca de 1.500 mg por tratamento, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 10 mg por tratamento, ou cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg por tratamento, ou cerca de 200 a cerca de 1.200 mg por tratamento (*por exemplo*, cerca de 200 mg, cerca de 300 mg, cerca de 400 mg, cerca de 500 mg, cerca de 600 mg, cerca de 700 mg, cerca de 800 mg, cerca de 900 mg, cerca de 1.000 mg, cerca de 1.100 mg, cerca de 1.200 mg por tratamento).

[168] Em modalidades, uma dosagem adequada da

proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) está numa faixa de cerca de 0,01 mg / kg a cerca de 100 mg / kg de peso corporal, ou cerca de 0,01 mg / kg a cerca de 10 mg / kg de peso corporal do sujeito, por exemplo, cerca de 0,01 mg / kg, cerca de 0,02 mg / kg, cerca de 0,03 mg / kg, cerca de 0,04 mg / kg, cerca de 0,05 mg / kg, cerca de 0,06 mg / kg, cerca de 0,07 mg / kg, cerca de 0,08 mg / kg, cerca de 0,09 mg / kg, cerca de 0,1 mg / kg, cerca de 0,2 mg / kg, cerca de 0,3 mg / kg, cerca de 0,4 mg / kg, cerca de 0,5 mg / kg, cerca de 0,6 mg / kg, 0,7 mg / kg, cerca de 0,8 mg / kg, cerca de 0,9 mg / kg, cerca de 1 mg / kg, cerca de 1,1 mg / kg, cerca de 1,2 mg / kg, cerca de 1,3 mg / kg, cerca de 1,4 mg / kg, cerca de 1,5 mg / kg, cerca de 1,6 mg / kg, cerca de 1,7 mg / kg, cerca de 1,8 mg / kg, 1,9 mg / kg, cerca de 2 mg / kg, cerca de 3 mg / kg, cerca de 4 mg / kg, cerca de 5 mg / kg, cerca de 6 mg / kg, cerca de 7 mg / kg, cerca de 8 mg / kg, cerca de 9 mg / kg, cerca de 10 mg / kg de peso corporal, incluindo todos os valores e faixas entre eles. Numa modalidade, a distribuição pode ser numa vesícula, em particular um lipossoma (ver Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989).

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

uma combinação dos mesmos para proporcionar o perfil de liberação desejado em proporções variáveis. A liberação controlada ou prolongada de um ingrediente ativo pode ser estimulada por várias condições, incluindo, entre outras, alterações no pH, mudanças na temperatura, estimulação por um comprimento de onda apropriado de luz, concentração ou disponibilidade de enzimas, concentração ou disponibilidade de água ou outras condições fisiológicas ou compostos.

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

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

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

[173] O regime de dosagem utilizando qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrito pode ser selecionado de acordo com uma variedade de fatores incluindo tipo, espécie, idade, peso, sexo e condição médica do sujeito; a gravidade da condição a ser tratada; a via de

administração; a função renal ou hepática do sujeito; a composição farmacogenômica do indivíduo; e o composto específico da invenção utilizado. Qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada numa dose diária única ou a dosagem diária total pode ser administrada em doses divididas de duas, três ou quatro vezes ao dia. Além disso, qualquer proteína quimérica (e/ou agentes adicionais) aqui descrita pode ser administrada continuamente em vez de intermitentemente ao longo do regime de dosagem.

### ***Células e Ácidos Nucleicos***

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

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

(CMV) e o promotor de repetição terminal longa do vírus do sarcoma (RSV-LTR) podem ser utilizados. Os promotores indutíveis que podem ser úteis em células de mamífero incluem, sem limitação, promotores associados com o gene da metalotioneína II, mouse repetições terminais longas responsivas a glicocorticoide do vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV-LTR), o gene  $\beta$ -interferon e o gene hsp70 (*ver*, Williams *et al.*, *Cancer Res* 1989, 49:2735-42; and Taylor *et al.*, *Mol Cell Biol* 1990, 10:165-75). Os promotores de choque térmico ou promotores de estresse também podem ser vantajosos para direcionar a expressão das proteínas de fusão em células hospedeiras recombinantes.

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

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

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

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

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

[180] Como usado aqui, "ligação operável" se refere a uma justaposição física dos componentes então descritos para permitir que eles funcionem da maneira pretendida. No exemplo de um elemento de controle de expressão na ligação operável com um ácido nucleico, a relação é tal que o elemento de controle modula a expressão do ácido nucleico. Normalmente, uma região de controle de expressão que modula a transcrição é justaposta próximo à extremidade 5' do ácido nucleico transcrito (*isto é*, a montante). As regiões de controle de expressão também podem ser localizadas na extremidade 3' da sequência transcrita (*isto é*, "a jusante") ou dentro do transcrito (*por exemplo*, em um íntron). Os elementos de controle de expressão podem estar localizados a uma distância da sequência transcrita (*por exemplo*, 100 a 500, 500 a 1.000, 2.000 a 5.000, ou mais nucleotídeos do ácido nucleico). Um exemplo específico de um elemento de controle de expressão é um promotor, que está normalmente localizado na posição 5' da sequência transcrita. Outro exemplo específico de um elemento de controle de expressão é um potenciador, que está normalmente localizado na posição 5' ou 3' da sequência transcrita ou dentro da sequência transcrita.

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

transcrição é iniciada e pode atuar em qualquer orientação. De particular utilidade como promotores são os promotores de genes virais de mamífero, uma vez que os genes virais são frequentemente altamente expressos e possuem uma ampla faixa de hospedeiros. Exemplos incluem o promotor precoce de SV40, o promotor de LTR do vírus do tumor mamário de camundongo, o promotor tardio principal de adenovírus, o promotor do vírus herpes simplex e o promotor de CMV.

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

[183] Há uma variedade de técnicas disponíveis para introduzir ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas adequadas para a transferência de ácido nucleico para células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, eletroporação, microinjeção, fusão celular, sistemas à base de polímeros, DEAE-dextrano, transdução viral, o método de precipitação com fosfato de cálcio, *etc.* Para uma transferência de um gene *in vivo*, inúmeras técnicas e reagentes também podem ser usados, incluindo lipossomas; veículos de administração à base de polímeros naturais, como quitosano e gelatina; vetores virais também são adequados para a transdução *in vivo*. Em algumas situações é desejável oferecer um agente de direcionamento, como um anticorpo ou ligante específico para uma proteína membranas da superfície da célula de tumor. Quando lipossomas forem utilizados, as proteínas que se ligam a uma proteína de membrana da superfície da célula associada com endocitose podem ser utilizadas para o direcionamento e/ou para facilitar a captura, *por exemplo*, de proteínas de



capsídeo ou fragmentos trópicos dos mesmos para um tipo celular particular, anticorpos para proteínas que sofrem internalização no ciclo e proteínas que se direcionam à localização intracelular e aumentam a meia-vida intracelular. A técnica de endocitose mediada por receptor é descrita, por exemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); e Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990).

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

[185] Em aspectos, a invenção fornece vetores de expressão para a expressão das proteínas quiméricas (e/ou agentes adicionais) que são vetores virais. Muitos vetores virais úteis para terapia genética são conhecidos (*ver, por exemplo*, Lundstrom, Trends Biotechnol.,

21:1 17, 122, 2003. Vetores virais ilustrativos incluem aqueles selecionados de Antivírus (LV), retrovírus (RV), adenovírus (AV), vírus adeno-associados (AAV) e vírus  $\alpha$ , embora outros vetores virais também possam ser usados. Para usos *in vivo*, os vetores virais que não se integram no genoma hospedeiro são adequados para utilização, tais como vírus  $\alpha$  e adenovírus. Tipos ilustrativos de vírus  $\alpha$  incluem o vírus Sindbis, o vírus da encefalite equina venezuelana (VEE) e o vírus da floresta de Semliki (SFV). Para usos *in vitro*, vetores virais que se integram no genoma do hospedeiro são adequados, tais como retrovírus, AAV e antivírus. Numa modalidade, a invenção proporciona métodos de transdução de uma célula humana *in vivo*, compreendendo contatar um tumor sólido *in vivo* com um vetor viral da invenção.

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

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

rim de macaco verde Africano (*por exemplo*, VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (*por exemplo*, HELA, ATCC CCL 2); células renais caninas (*por exemplo*, MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (*por exemplo*, BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (*por exemplo*, W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (*por exemplo*, Hep G2, HB 8065); e células de tumor mamário de camundongo (*por exemplo*, MMT 060562, ATCC CCL51). Tipos ilustrativos de células cancerígenas para expressar as proteínas de fusão descritas neste documento incluem linhagem celular de fibroblastos de camundongo, NIH3T3, linhagem celular de carcinoma de pulmão de Lewis de camundongo, LLC, linhagem celular de mastocitoma de camundongo, P815, linhagem celular de linfoma de camundongo, EL4 e seu transfectante de ovalbumina, E.G7, linhagem celular de melanoma de camundongo, B16F10, linhagem celular de fibrossarcoma de camundongo, MC57, e linhagens celulares de carcinoma do pulmão de pequenas células humanas, SCLC #2 e SCLC #7.

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

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

técnica.

### ***Sujeitos e/ou Animais***

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

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

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

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

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

### **Kits**

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

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

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

### **EXEMPLOS**

*Exemplo 1: Mecanismo de Ação Predito e Estrutura In Silico Predita da Proteína Quimérica Monomérica CSF1R-Fc-CD40L*

[197] **A FIG. 1A** mostra uma representação esquemática do mecanismo de ação esperado de uma proteína quimérica CSF1R-Fc-

CD40L. O domínio CSF1R liga CSF1 e/ou IL-34 para fornecer um efeito de "afundamento" e evitar que CSF1 e/ou IL-34 liguem a CSF1R na superfície de células apresentadoras de antígeno, bloqueando assim um sinal de inibição imune. Contemporaneamente, o domínio CD40L da proteína quimérica liga a CD40 na superfície das células apresentadoras de antígeno, proporcionando assim um sinal de ativação imune. O efeito líquido destes dois eventos aumenta uma resposta imune bloqueando um sinal inibitório (via IL-34 e/ou CSF1) e fornecendo um sinal de ativação via CD40.

[198] **A FIG. 1B** mostra uma sinapse que se formou por uma proteína quimérica entre uma célula tumoral e uma célula T.

[199] A FIG. 1C mostra uma previsão de estrutura *in silico* da proteína quimérica monomérica CSF1R-Fc-CD40L (SL-115154) com 947 resíduos de aminoácidos (SEQ ID NO: 5), com um valor p de  $1,69 \times 10^{-29}$ . O peso molecular da proteína monomérica foi predito em 105,4 kDa. Uma estrutura da proteína quimérica é fornecida em **FIG. 1A**.

[200] Especificamente, a predição da estrutura revelou que 33 posições de aminoácidos (3%) podem ser desordenadas. A predição da estrutura secundária de toda a sequência da proteína quimérica mostrou que a proteína tem a composição de 2% de  $\alpha$ -hélice (H), 51% de  $\beta$ -folha (E) e 45% de bobina (C). O GDT (teste de distância global) e uGDT (GDT não normalizado) para a qualidade global absoluta também foram calculados para a proteína quimérica para dar um uGDT global (GDT) de 738 (78). A predição de três estados para acessibilidade do solvente dos resíduos de proteína foi de 33% exposta (E), 46% intermediária (M) e 19% enterrada (B).

#### *Exemplo 2: Caracterização da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L*

[201] Uma proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L humana (também designada por CD115-Fc-CD40L aqui) foi construída, tal como descrito acima na Descrição Detalhada e em US 62/464.002, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade. A proteína quimérica foi

caracterizada através da realização de uma análise de Western blot contra cada domínio individual da proteína quimérica, isto é, via anticorpos anti-CSF1R, anti-Fc e anti-CD40L.

[202] Os Western blots indicaram a presença de uma espécie oligomérica (possivelmente um dímero), com um peso molecular aparente de aproximadamente 240 kDa, nas faixas não reduzidas (**FIG. 2**, faixa 2 em cada mancha), que foi reduzida a um glicosilado banda monomérica na presença do agente redutor,  $\beta$ -mercaptoetanol (**FIG. 2**, faixa 3 em cada mancha). Como mostrado na **FIG. 2**, faixa 4 em cada mancha, a proteína quimérica executou como um monômero com o peso molecular predito de aproximadamente 105 kDa na presença de ambos um agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol) e uma endoglicosidase (PNGase).

*Exemplo 3: Caracterização da Afinidade de Ligação dos Diferentes Domínios da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L Usando ELISA*

[203] Ensaios de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foram desenvolvidos para demonstrar a afinidade de ligação dos diferentes domínios da hCSF1R-Fc-CD40L (também aqui referida como CD115-Fc-CD40L) aos seus respectivos parceiros de ligação (isto é, CSF1, hIgG ou CD40). Especificamente, a porção Fc da proteína quimérica foi detectada através da captura de uma IgG humana ligada a placas e detecção através de um anticorpo anti-IgG humana conjugado com HRP (quadrante superior esquerdo de **FIG. 3**). O domínio CSF1R da proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L foi detectado através da captura de uma proteína humana recombinante CSF1 ligada à placa e detecção através de um anticorpo anti-IgG humana conjugado com HRP (quadrante superior direito de **FIG. 3**). O domínio de CD40L da proteína quimérica foi detectado através da captura de uma proteína CD40 humana recombinante ligada à placa e detecção através de um anticorpo específico para CD40L (quadrante inferior esquerdo de **FIG. 3**). Finalmente, a ligação simultânea a CSF1 e CD40 foi demonstrada utilizando um formato ELISA duplo no qual foi utilizado CD40 recombinante para capturar

CSF1R-Fc-CD40L e CSF1 recombinante foi utilizada para detectar CSF1R-Fc-CD40L (porção inferior direita de **FIG. 3**).

*Exemplo 4: Caracterização da Afinidade de Ligação a Células Ex Vivo da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L*

[204] Os ensaios de ligação celular foram realizados para demonstrar a afinidade de ligação dos diferentes domínios da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L em relação os seus respectivos parceiros de ligação sobre a superfície de uma membrana celular de mamífero.

[205] Para ensaios de ligação celular, as linhagens celulares imortalizadas foram engenheiradas para expressar estavelmente CD40 (Jurkat/CD40). Concentrações crescentes da proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L foram incubadas com a linhagem celular de sobre-expressão (Jurkat/CD40) durante 2 horas. As células foram recolhidas, lavadas e coradas com anticorpos para a detecção da ligação de proteína quimérica por citometria de fluxo.

[206] Como mostrado na **FIG. 4**, a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L ligada a CD40 presente na superfície celular de uma forma dependente da concentração e com baixa afinidade nM. Especificamente, como mostrado na **FIG. 4**, o ensaio de ligação celular demonstrou que CSF1R-Fc-CD40L se liga a CD40 e com uma afinidade de cerca de 77 nM (de acordo com o cálculo de  $EC_{50}$ ).

*Exemplo 5: Caracterização da Afinidade de Ligação da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) e Interferometria de Superfície de Biocamada*

[207] A afinidade de ligação dos diferentes domínios da proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L foi medida pela ressonância plasmônica de superfície (SPR) utilizando o sistema BioRad Proteon XPR 360. Especificamente, a afinidade da proteína quimérica para CSF1 e CD40 humanas foi determinada e comparada com proteínas de controle recombinantes, e os resultados são mostrados na Tabela abaixo.



Ligação a:	CSF1	Amostra	Ka (taxa associação; 1/Ms)	Kd (taxa dissociação; 1/s)	KD (ligação; M)
		CSF1R-Fc	1,22 E+6	3,35 E-4	0,275 nM
		CSF1R-Fc- CD40L	5,70 E+4	7,30 E-6	0,128 nM
	CD40	CD40L-Fc	NA	NA	NA
		CSF1R-Fc- CD40L	1,28 E+4	6,74 E-6	0,527 nM

[208] Foi determinado que a proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L se liga a CSF1 e CD40 com alta afinidade. Em particular, foi notado que as taxas de inibição da proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L são muito mais lentas que as proteínas de controle (*isto é*, CSF1R-Fc e CD40L-Fc). Por exemplo, a taxa off da proteína quimérica da CSF1 foi 45,9 vezes mais lenta do que a proteína CSF1R-Fc.

[209] Além disso, a afinidade de ligação de cada domínio de CSF1R-Fc-CD40L foi medida usando um sistema Octet baseado em Interferometria de Superfície de BioCamada (**FIG. 5A** a **FIG. 5F**). Estes resultados confirmam ainda mais a ligação de elevada afinidade da proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L a cada parceiro de ligação.

*Exemplo 6. Afinidade de Ligação a Ambos os Ligandos de CSF1R*

[210] Foi relatado que o CSF1R se liga a dois ligandos: CSF1 e IL-34. Assim, foi desejável demonstrar que CSF1R-Fc-CD40L é capaz de ligar tanto CSF1 quanto IL-34. Isto foi testado utilizando interferometria de superfície de camada dupla (Octet), com os resultados mostrados na **FIG. 6. A**

ligação de CSF1R-Fc-CD40L a CSF1 e IL-34 foi indistinguível; assim, as curvas são praticamente sobrepostas umas sobre as outras.

*Exemplo 7. Caracterização da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L Murina*

[211] Uma CSF1R-Fc-CD40L murina (também referida como mCSF1R-Fc-CD40L na presente divulgação) foi construída, tal como descrito acima na Descrição Detalhada e em U.S. 62/464.002, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade. A proteína quimérica foi caracterizada através da realização de uma análise de Western blot contra cada domínio individual da proteína quimérica, isto é, via anticorpos  $\alpha$ -CSF1R,  $\alpha$ -Fc e  $\alpha$ -CD40L.

[212] Os Western blots indicaram a presença de uma espécie oligomérica (possivelmente um dímero), com um peso molecular aparente de aproximadamente 240 kDa, nas faixas não reduzidas (**FIG. 7A**, faixa 2 em cada mancha), que foi reduzida a um glicosilado banda monomérica na presença do agente redutor,  $\beta$ -mercaptoetanol (**FIG. 7A**, faixa 3 em cada mancha). Como mostrado na **FIG. 7A**, faixa 4 em cada mancha, a proteína quimérica executou como um monômero com o peso molecular predito de aproximadamente 105 kDa na presença de ambos um agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol) e uma endoglicosidase (PNGase).

[213] Ensaios de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foram desenvolvidos para demonstrar a afinidade de ligação dos diferentes domínios da mCSF1R-Fc-CD40L aos seus respectivos parceiros de ligação (isto é, CSF1, mIgG ou CD40). Especificamente, a porção Fc da proteína quimérica foi detectada através da captura de IgG de camundongo ligada à placa e detectada por meio de um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (gráfico do meio da **FIG. 7B**). O domínio CSF1R da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L foi detectado através da captura de uma proteína CSF1 murina recombinante ligada à placa e detecção através de um anticorpo de IgG-HRP anti-camundongo conjugado a HRP (gráfico da

esquerda de **FIG. 7B**). O domínio de CD40L da proteína quimérica foi detectado através da captura de uma proteína CD40 de camundongo recombinante ligada à placa e detecção através de um anticorpo específico para CD40L (gráfico da direita da **FIG. 7B**).

[214] Como mostrado na **FIG. 7B**, os diferentes domínios da proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L interagiram de forma eficaz com os seus respectivos parceiros de ligação com elevada afinidade. No entanto, foi observado que em ensaios de ELISA, a utilização da região Fc central para detectar proteínas quiméricas tendia a subestimar o conteúdo real de proteína em uma amostra. Por conseguinte, detectou-se baixo nível da proteína quimérica hCSF1R-Fc-CD40L em comparação com o padrão neste ensaio.

*Exemplo 8. Caracterização da Afinidade de Ligação a Células Ex Vivo da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L Murina*

[215] Os ensaios de ligação celular foram realizados para demonstrar a afinidade de ligação dos diferentes domínios da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L em relação os seus respectivos parceiros de ligação sobre a superfície de uma membrana celular de mamífero.

[216] Para ensaios de ligação celular, as linhagens celulares imortalizadas foram engenheiradas para expressar estavelmente CD40 (CHOK1/CD40). Concentrações crescentes da proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L murina foram incubadas com a linhagem celular de sobre-expressão (CHOK1/CD40) durante 2 horas. As células foram recolhidas, lavadas e coradas com anticorpos para a detecção da ligação de proteína quimérica por citometria de fluxo.

[217] Como mostrado na **FIG. 8**, a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L murina ligada a CD40 presente na superfície celular de uma forma dependente da concentração e com baixa afinidade nM. Especificamente, como mostrado na **FIG. 8**, o ensaio de ligação celular demonstrou que CSF1R-Fc-CD40L se ligou a CD40 com uma afinidade de 91,1 nM (de acordo com o cálculo de  $EC_{50}$ ). Como um controle negativo, não houve

ligação detectável à linhagem celular parental (não expressando CD40) CHOK1.

*Exemplo 9. Indução de Sinalização CD40 in Vitro*

[218] O CD40 humano é um receptor homotrimérico que, quando ativado, leva à indução de uma cascata de sinalização que envolve a ativação de NF- $\kappa$  e NIK. **A FIG. 9** mostra dados de um ensaio de sinalização de NF- $\kappa$ B/NIK *in vitro* utilizando a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L humana. As células U2OS do ensaio de sinalização DiscoverX NIK foram cultivadas com uma titulação de ou CD40L-Fc comercialmente disponível de lado único, CSF1R-Fc de lado único de lado único, ou anticorpo agonista CD40, ou a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L humana. As unidades relativas de luciferase (RLU) indicam a força relativa da sinalização de NF- $\kappa$ B/NIK ativada após o tratamento com os regimes indicados. O hCSF1R-Fc-CD40L apresenta uma sinalização fortemente ativada através de NF- $\kappa$ B e NIK, a um grau comparável como uma proteína quimérica de CD40L-Fc. O anticorpo agonista de CD40 não estimulou a ativação de CD40 neste ensaio porque o anticorpo requer reticulação do receptor Fc de modo a facilitar o agrupamento apropriado do receptor CD40.

*Exemplo 10: Ensaios Funcionais da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L*

[219] CSF1R (também conhecida como CD115) foi identificada como um ponto de verificação imune emergente devido ao seu papel na ligação a CSF1 e/ou IL-34 dentro do microambiente tumoral. Como mostrado na **FIG. 1A**, a ligação de CSF1R a qualquer destes dois ligandos estimula a imunossupressão através de vários mecanismos, incluindo a indução de células supressoras derivadas de mieloides. Sem querer estar limitado pela teoria, acredita-se que a proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L possa atuar como uma armadilha de citocina para CSF1/IL-34 e estimular macrófagos e células apresentadoras de antígeno através de CD40 gerando assim imunidade antitumoral potente.

[220] Dois ensaios funcionais foram desenvolvidos para caracterizar a atividade funcional da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L.

[221] O primeiro ensaio é um ensaio *in vivo* de armadilha/afundamento para avaliar a capacidade da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L de se ligar e reduzir os níveis séricos de CSF1 solúvel. Especificamente, os camundongos não portadores de tumor foram injetados com uma dose única de anticorpo anti-CSF1R (também conhecido como anticorpo anti-CD115) no dia 0. No dia 2, os camundongos foram deixados sem tratamento ou injetados com uma dose única da proteína quimérica CSF1R-Fc-CD40L. O soro sanguíneo foi colhido no dia 2 antes da injeção da proteína quimérica e no dia 3 após o tratamento com a proteína quimérica. Os ensaios ELISA de CSF1 murina foram realizados no soro. Como mostrado na **FIG. 10A**, a proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L foi capaz de se ligar e reduzir significativamente os níveis séricos de CSF1 solúvel, eliminando assim a sua detecção por ELISA.

[222] O segundo ensaio envolveu o perfil imune *in vivo* de camundongos portadores de tumor 13 dias após o tratamento com a proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L. Especificamente, os níveis de células IL15R $\alpha$ + no baço e nódulos linfáticos foram analisados como uma leitura da ativação imune pela proteína quimérica (particularmente pela porção CD40L da proteína quimérica). Os camundongos portadores de tumor foram tratados com duas doses de 150  $\mu$ g da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L nos dias 5 e 7 após inoculação de tumor inicial. No dia 13, uma coorte de camundongos foi sacrificada e os seus baços e nódulos linfáticos foram removidos e dissociados para análise de citometria de fluxo de IL15R $\alpha$ . Os níveis de células IL15R $\alpha$ + no baço e nódulos linfáticos foram determinados como mostrado na **FIG. 10B**. Consistente com um mecanismo conhecido de função CD40L, camundongos tratados com a proteína quimérica apresentaram um aumento de IL15R $\alpha$  no baço e nódulos linfáticos em comparação com camundongos não tratados, sugerindo fortemente que a proteína quimérica estimulou a ativação imune

através da via CD40/CD40L.

*Exemplo 11: Caracterização das Atividades Anti-Tumorais in Vivo da Proteína Quimérica CSF1R-Fc-CD40L*

[223] A atividade anti-tumoral *in vivo* da proteína quimérica mCSF1R-Fc-CD40L foi analisada utilizando os modelos de tumor colorretal de camundongo CT26.

[224] Em um conjunto de experiências, camundongos Balb/c foram inoculados com células tumorais CT26 no dia 0 e/ou redesafiados com uma segunda inoculação de células tumorais CT26 no dia 30. Após 5 dias de crescimento tumoral, quando os tumores atingiram um diâmetro de 4-5 mm, os camundongos foram tratados com anticorpos agonistas de CD40, anticorpos bloqueadores de CSF1R (CD115), a combinação desses dois anticorpos ou a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L. Os tratamentos foram repetidos no dia 7.

[225] O crescimento do tumor para cada grupo de tratamento foi avaliado como mostrado na **FIG. 11A**. Especificamente, os camundongos não tratados desenvolveram tumores rapidamente. O tratamento com os anticorpos agonistas de CD40, anticorpos bloqueadores de CSF1R (CD115) ou a combinação desses dois anticorpos pareceu retardar ligeiramente o desenvolvimento de tumores. Em comparação, tratar camundongos com a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L preveniu e/ou retardou significativamente o desenvolvimento de tumores. Os dados acima sugerem que os tratamentos com uma proteína quimérica CSF1R (CD115)-Fc-CD40L criam um efeito de memória imune *in vivo*. Assim, o animal tratado é capaz de atacar células tumorais mais tarde e/ou prevenir o desenvolvimento de tumores quando redesafiado após um tratamento inicial com a proteína quimérica.

[226] A porcentagem total de sobrevivência de camundongos até 50 dias após a inoculação do tumor também foi avaliada. Todos os camundongos não tratados morreram no prazo de 30 dias após a inoculação

do tumor. Outros grupos de camundongos tratados com os anticorpos agonistas de CD40, anticorpos bloqueadores de CSF1R (CD115), ou a combinação dos mesmos dois anticorpos prolongaram a sobrevivência, mas ainda menos de 25% dos camundongos sobreviveram até aos 50 dias após a inoculação do tumor. Significativamente, mais de 70% dos camundongos tratados com a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L sobreviveram nos últimos 50 dias após a inoculação do tumor, como mostrado na **FIG. 11B**. Como mostrado na **FIG. 11C**, o tratamento com a proteína quimérica resultou em rejeição tumoral significativamente maior do que o tratamento com anticorpos agonistas de CD40, anticorpos bloqueadores de CSF1R (CD115), ou uma combinação dos dois anticorpos.

*Exemplo 12. Imunofenotipagem de Populações de Linfócitos de Camundongos Portadores de Tumor*

[227] A imunofenotipagem também foi realizada pela análise de esplenócitos, células de linfonodos e linfócitos infiltrantes tumorais no dia 13 após a inoculação do tumor. Como mostrado na **FIG. 12A**, camundongos tratados com a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L exibiram frequências aumentadas de células T CD4+ e CD8+ no baço, mas não no nódulo linfático ou tumor, em comparação com camundongos não tratados. Adicionalmente, os camundongos tratados com a proteína quimérica exibiram uma diminuição na proporção de células CD4+ CD25+ no baço e nos tumores, sugerindo que a proteína quimérica reduz as células T regulatórias (**FIG. 12B**). Notavelmente, apesar de um aumento não significativo na proporção de células CD8+ totais dentro do tumor (**FIG. 12A**), um aumento significativo na proporção de células T CD8+ específicas para o antígeno de tumor AH1 (por coloração de tetrâmero) foi detectado em camundongos tratados com a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L (**FIG. 12C**), sugerindo que a proteína quimérica estimulou o reconhecimento de tumores por células T CD8+.

[228] Para avaliar a ativação do receptor CD40 pela proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L, a indução de células CD19+ e células

positivas para IL-15R $\alpha$  pela proteína quimérica foi analisada. Como mostrado na **FIG. 12D**, um aumento significativo de células CD19 $^{+}$  foi observado nos esplenócitos de camundongos tratados com a proteína quimérica. Este aumento nas células CD19 $^{+}$  não foi observado nos nódulos linfáticos ou nas células tumorais. Além disso, houve também um aumento significativo de células positivas para IL-15R $\alpha$  nos esplenócitos de camundongos tratados com a proteína quimérica (**FIG. 12E**). Novamente, o aumento não foi observado nos linfonodos ou células tumorais.

*Exemplo 13. Redução da Toxicidade de CSF1R-Fc-CD40L em Comparação com Anticorpos CSF1R e CD40*

[229] Os estudos *in vivo* também demonstraram surpreendentemente que a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L exibia perfis de segurança melhorados. Especificamente, verificou-se que camundongos tratados com o anticorpo agonista de CD40 e o tratamento de combinação com o anticorpo CD40 $^{+}$  CD115 desenvolviam diarreia significativa e perda de peso ao longo da experiência. Em camundongos tratados com o anticorpo agonista CD40, uma resposta inflamatória intestinal foi iniciada, levando à diarreia e perda de peso, que foi então exacerbada significativamente pelo tratamento combinado com o bloqueio de CD115. Camundongos na combinação de anticorpos (CD115 $^{+}$  CD40) perderam > 25% do peso corporal (**FIG. 13B**), tinham uma aparência moribunda e, em alguns casos, esta resposta inflamatória foi letal (ver **FIG. 13A**). Em contraste, os camundongos tratados com a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L pareciam saudáveis, não desenvolveram quaisquer sinais de diarreia ou perda de peso e comportaram-se normalmente (**FIG. 13A e FIG. 13B**).

[230] No total, estes dados indicam que o tratamento com a proteína quimérica mCD115-Fc-CD40L conduziu a taxas significativamente maiores de rejeição tumoral completa do que os anticorpos bloqueadores de CD115 isoladamente, anticorpos agonistas de CD40 sozinhos ou a combinação de bloqueadores de CD115 e anticorpos agonistas de CD40. Mais ainda, o



tratamento com a proteína quimérica proporcionou perfis de segurança melhorados em comparação com o tratamento com os anticorpos, que eram altamente tóxicos quando coadministrados a camundongos e causavam inflamação intestinal letal e diarreia.

*Exemplo 14: Caracterização da Contribuição de um Domínio Fc num Ligante para Funcionalidade de Proteínas Quiméricas*

[231] Neste exemplo, a contribuição de um domínio Fc num ligante para a funcionalidade de proteínas quiméricas da presente invenção foi ensaiada. Aqui, uma PD1-Fc-OX40L foi usada como um modelo para Fc contendo as proteínas quiméricas. Assim, os dados apresentados abaixo são relevantes para proteínas quiméricas da presente invenção.

[232] Em seu estado nativo, a PD-1 existe como monômero, enquanto OX40Ls tendem a dimerizar devido a interações eletrostáticas entre os domínios OX40L; os domínios Fc associam-se uns aos outros através de ligações dissulfeto. Juntas, várias interações intermoleculares podem contribuir para a estrutura quaternária de PD1-Fc-OX40L. Existem, pelo menos, quatro configurações potenciais de PD1-Fc-OX40L, com a proteína quimérica existindo como um monômero, um dímero, um trímero ou um hexâmero. Ver, **FIG. 14**

[233] A existência de configurações monoméricas e diméricas da proteína quimérica foi testada expondo proteínas quiméricas a condições redutoras e não redutoras e depois executando as proteínas em SDS-PAGE. Sob condições não redutoras (Reduzido: "-"), a proteína quimérica migrou em SDS-PAGE a cerca de 200 kDa. Aqui, Western blots foram sondados com anticorpos dirigidos contra PD1, Fc ou OX40L em, respectivamente, as manchas esquerda, central e direita mostradas na **FIG. 15**. Uma vez que, o peso molecular monomérico previsto da proteína quimérica é de 57,6 kDa, esperava-se que a espécie de 200 kDa fosse, pelo menos, um dímero. No entanto, sob condições reduzidas (Reduzido: "+"), que reduz as ligações dissulfeto (*por exemplo*, entre os domínios Fc), a proteína quimérica

migrou em SDS-PAGE a cerca de 100 kDa. Como as espécies de 100 kDa eram mais pesadas que o esperado, foi previsto que a massa extra fosse devida à glicosilação. Finalmente, as proteínas quiméricas foram tratadas com Peptídeo-N-Glicosidase F (PNGaseF "+") e execuções em SDS-PAGE sob condições reduzidas. Sob estas condições, a proteína quimérica migrou a cerca de 57,6 kDa. Estes dados sugerem que a proteína quimérica é glicosilada e existe naturalmente, pelo menos, com dimerização provavelmente devido à ligação dissulfeto entre os domínios Fc.

[234] Os métodos de gel SDS-PAGE não predizem com precisão o peso molecular para proteínas de alta massa molecular e/ou de grande peso molecular. Assim, em seguida, as proteínas quiméricas foram caracterizadas utilizando Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC). Ao contrário do SDS-PAGE, no qual o SDS carregado negativamente reduz as interações baseadas em carga entre os peptídeos, a SEC não usa detergentes ou agentes redutores. Quando a proteína quimérica PD1-Fc-OX40L foi administrada na SEC, nenhum dos picos foi de cerca de 200 kDa. Isto sugere que, nativamente, a proteína quimérica não existe como um dímero. Em vez disso, foi detectado um pico com um tamanho superior a 670 kDa. Ver, **FIG. 16**. Este e os dados anteriores sugerem que a proteína quimérica PD1-Fc-OX40L existe como um hexâmero no seu estado nativo.

[235] Como mostrado acima, quando executado em SDS-PAGE sob condições não redutoras ou sob condições redutoras, SDS na amostra e/ou no tampão de execução converte a proteína quimérica hexamérica PD1-Fc-OX40L em um dímero ou monômero predominante, respectivamente, na ausência e presença de um agente redutor. Ver, **FIG. 17** (gel da esquerda). Quando executada em PAGE nativo, que não possui SDS, e na ausência de um agente redutor, a proteína quimérica existe como um hexâmero. No entanto, quando executada em PAGE nativa e na presença de um agente redutor (que reduz ligações dissulfeto), a proteína quimérica migrou mais pesada do que o esperado; como mostrado na **FIG. 17** (gel direito, faixa

#2), com a proteína quimérica não conseguiu migrar substancialmente para fora do poço de carga. Estes dados sugerem que a proteína quimérica oligomerizou em uma proteína de ordem superior. Assim, em proteínas quiméricas, a ligação dissulfeto parece ser importante para controlar a oligomerização de ordem superior.

[236] Para confirmar ainda mais isso, proteínas quiméricas sem um domínio Fc foram construídas, por exemplo, “PD-1-Sem Fc-OX40L”. Tais proteínas quiméricas não terão a ligação dissulfeto que ocorre entre os domínios Fc nas proteínas quiméricas descritas anteriormente. Como mostrado na **FIG. 18**, quando proteínas quiméricas sem os domínios Fc são executadas na PAGE nativa, nenhuma das proteínas migrou substancialmente do seu poço de carga (faixa #1 a #4 mostram concentrações de carga crescentes de PD1-Sem Fc-OX40L); novamente, sugerindo que as proteínas quiméricas “Sem Fc” formaram um complexo tipo concatêmero que compreende numerosas proteínas. Assim, a omissão do domínio Fc em uma proteína quimérica leva à formação de agregados proteicos. Estes dados indicam que a ligação dissulfeto, por exemplo, entre domínios Fc em diferentes proteínas quiméricas, estabiliza as proteínas quiméricas e assegura que cada uma delas existe como um hexâmero e não como uma proteína/concatêmero de ordem superior. Em outras palavras, o domínio Fc surpreendentemente coloca ordem em complexos proteicos quiméricos. As faixas #1 a #4, respectivamente, incluem 2,5 µg, de PD1-Sem Fc-OX40L, 5 µg de PD1-Sem Fc-OX40L, 7,5 µg de PD1-Sem Fc-OX40L e 10 µg de PD1-Sem Fc-OX40L

[237] É mostrado na **FIG. 19**, um modelo que resume os dados acima e mostra como um hexâmero e concatêmeros se formam a partir de proteínas quiméricas da presente invenção. A proteína quimérica exemplificativa (PD-1-Fc-OX40L) forma naturalmente um hexâmero (devido a interações eletrostáticas entre os domínios OX40L e dimerização por domínios Fc). No entanto, na ausência dos efeitos de controle da ligação dissulfeto entre os domínios Fc, em condições reduzidas para a proteína PD-1-Fc-OX40L e

devido à ausência de domínios Fc na PD-1-Sem Fc-OX40L, estas últimas proteínas quiméricas formam concatâmeros.

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

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

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

*Exemplo 15: Produção de Proteínas Quiméricas Adicionais Contendo CSF1R, Contendo Domínios Extracelulares de Outras Proteínas do Tipo II*

[241] Neste exemplo, são descritas proteínas quiméricas adicionais da presente invenção. Tais proteínas quiméricas adicionais serão feitas de forma semelhante à forma como as proteínas quiméricas CSF1R-Fc-CD40L foram feitas, por exemplo, como descrito acima na Descrição Detalhada e em U.S. 62/464.002, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

[242] Estas proteínas quiméricas adicionais terão a

fórmula geral: ECD 1 - Ligante de Junção 1 - Domínio Fc - Ligante de Junção 2 - ECD 2, em que ECD 1 é o domínio extracelular de CSF1R e ECD 2 é o domínio extracelular de uma proteína tipo II, diferente de CD40L. Exemplos de proteínas do tipo II incluem 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL. Estas proteínas quiméricas podem não ter um ou ambos os ligantes de junção.

[243] Estas proteínas quiméricas podem não ter um ou ambos os ligantes de junção. Ligantes de Junção Exemplificativos 1s, Domínios Fc e Ligantes de Junção 2 são descritos acima na Tabela 1; ligantes modulares úteis para a formação de proteínas quiméricas e compreendendo ligantes de junção específicos 1s, domínios de Fc e Ligantes de Junção 2s são mostrados em **FIG. 20**.

[244] Alternativamente, as proteínas quiméricas adicionais serão proteínas de fusão tendo a fórmula geral: terminal N - (a) - (b) - (c) - terminal C, em que (a) é CSF1R, (b) é um ligante compreendendo pelo menos uma porção de um domínio Fc, e (c) é o domínio extracelular de uma proteína de tipo II, diferente de CD40L. Exemplos de proteínas do tipo II incluem 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL.

[245] A sequência de aminoácidos para 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL, respectivamente, compreende SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, 17, 6, 21, e 23. A sequência de aminoácidos para o domínio extracelular de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A e TRAIL, respectivamente, compreende a SEQ ID NO:10, 12, 14, 16, 18, 7, 22 e 24. A sequência de aminoácidos para CSF1R compreende SEQ ID NO: 1 e o domínio extracelular de CSF1R compreende SEQ ID NO: 2. As proteínas quiméricas podem compreender uma variante das sequências acima mencionadas, *por exemplo*, pelo menos cerca de 95% idêntica a uma sequência acima mencionada.

[246] Ligantes exemplificativos são descritos acima na Tabela 1; Ligantes modulares úteis para a formação de proteínas quiméricas e

compreendendo Ligante de Junção específico 1s, Domínios Fc e Ligante de Junção 2s são mostrados em **FIG. 20**.

[247] Por conseguinte, a presente invenção inclui ainda as seguintes proteínas quiméricas adicionais (*por exemplo*, no tratamento de um câncer e/ou tratamento de uma doença inflamatória): CSF1R-Fc-4-1BBL, CSF1R-Fc-CD30L, CSF1R-Fc-FasL, CSF1R-Fc-GITRL, CSF1R-Fc-LIGHT, CSF1R-Fc-OX40L, CSF1R-Fc-TL1A, e CSF1R-Fc-TRAIL.

[248] As proteínas quiméricas adicionais serão caracterizadas como descrito acima para CSF1R-Fc-CD40L nos Exemplos 1 a 13, embora com reagentes (por exemplo, parceiros de ligação, células alvo recombinantes e tipos de células cancerígenas/tumorais) que são específicos para as proteínas quiméricas adicionais, em vez de serem necessários para caracterizar CSF1R-Fc-CD40L. Assim, utilizando CSF1R-Fc-4-1BBL como exemplo, as caracterizações de CSF1R-Fc-4-1BBL, como no Exemplo 2, podem ser realizadas utilizando anticorpos anti-CSF1R, anti-Fc e anti-4-1BBL em vez dos anticorpos anti-CSF1R, anti-Fc e anti-CD40L necessários para CSF1R-Fc-CD40L.

[249] Tal como com as proteínas quiméricas CSF1R-Fc-CD40L, as proteínas quiméricas adicionais serão eficazes no tratamento de um câncer e/ou tratamento de uma doença inflamatória bloqueando CSF1R (que inibe a transmissão de um sinal imunoinibitório) e intensificando, aumentando e/ou estimulando a transmissão de um sinal imunoestimulatório via ativação do receptor/ligando de um de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL. Além disso, as proteínas quiméricas adicionais serão eficazes no tratamento de um câncer e/ou uma doença inflamatória, mas sem a toxicidade resultante de tratamentos que compreendem uma pluralidade de anticorpos, por exemplo, um anticorpo bloqueador de a CSF1 ou IL-34 e um anticorpo agonista para o receptor/ligando de um de 4-1BBL, CD30L, FasL, GITRL, LIGHT, OX40L, TL1A, e TRAIL.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Proteína quimérica heteróloga, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro domínio compreendendo uma porção de receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R) que é capaz de ligar a um ligando CSF1R;

(b) um segundo domínio compreende uma porção de Ligando CD40 (CD40L) que é capaz de ligar um receptor de CD40L; e

(c) um ligante ligando o primeiro domínio ao segundo domínio.

2. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o primeiro domínio compreende substancialmente todo o domínio extracelular de CSF1R e o segundo domínio compreende substancialmente todo o domínio extracelular de CD40L.

3. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de inibir um sinal imunossupressor.

4. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de:

(a) reduzir ou eliminar um sinal imunoinibitório quando a porção de CSF1R estiver ligada ao seu ligando e/ou

(b) aumentar ou ativar um sinal imunoestimulatório quando a porção de CD40L está ligada ao seu receptor.

5. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada** pelo fato de que o ligando CSF1R é CSF1 ou IL-34.

6. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que o receptor

CD40L é CD40.

7. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de se ligar contemporaneamente ao ligando CSF1R e ao receptor CD40L, em que o ligando CSF1R é CSF1 ou IL-34 e o receptor CD40L é CD40.

8. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de se ligar contemporaneamente a CD40 humana recombinante e a CSF1 humana *in vitro*.

9. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica esgota CSF1 e/ou IL-34, opcionalmente no soro.

10. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica exhibe perfis de segurança intensificados e/ou perfis de toxicidade reduzidos em comparação com anticorpos agonistas de CD40 e/ou anticorpos antagonistas de CSF1R.

11. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica exhibe efeitos antitumorais intensificado em comparação com anticorpos agonistas de CD40 e/ou anticorpos antagonistas de CSF1R.

12. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de aumentar ou impedir uma diminuição numa subpopulação de células T CD4+ e/ou CD8+.

13. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de aumentar a atividade de eliminação de tumores por células T.



14. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de proporcionar um efeito imunomodulador sustentado.

15. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de causar ativação de células apresentadoras de antígeno.

16. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de aumentar a capacidade de células apresentadoras de antígeno apresentadoras de antígeno.

17. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica altera a razão de células imunes em favor de células que podem matar um tumor em oposição a células que protegem tumores.

18. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada** pelo fato de que a célula que pode matar um tumor é selecionada de células T, linfócitos T citotóxicos, células T auxiliares, células assassinas naturais (NK), células T assassinas naturais (NKT), macrófagos anti-tumorais (*por exemplo*, macrófagos M1), células B e células dendríticas e em que a célula que protege os tumores é selecionada de células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), células T regulatórias (Tregs); neutrófilos associados a tumores (TANs), macrófagos M2 e macrófagos associados a tumores (TAMs)).

19. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica estimula macrófagos antitumorais e células apresentadoras de antígeno, enquanto evita a indução de MDSC através da inibição de CSF1 e/ou IL-34.

20. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 19, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica aumenta a razão de células T efetoras para células T regulatórias.

21. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica proporciona um efeito de mascaramento sustentado de sinais imunoinibitórios.

22. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica fornece meia-vida no alvo mais longa (*por exemplo*, intratumoral) ( $t_{1/2}$ ) em comparação com  $t_{1/2}$  das proteínas quiméricas.

23. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica reduz as toxicidades em comparação com o tratamento com anticorpos contra CSF1R e CD40.

24. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **caracterizada** pelo fato de que o ligante é um polipeptídeo selecionado de uma seqüência de aminoácidos flexível, uma região de dobradiça de IgG ou uma seqüência de anticorpos.

25. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende domínio de dobradiça-CH2-CH3 Fc derivado de IgG4.

26. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizada** pelo fato de que o domínio dobradiça-CH2-CH3-Fc é derivado de IgG4 humana.

27. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é expressa por uma célula hospedeira de mamífero como uma cadeia polipeptídica simples secretável e funcional.

28. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 27, **caracterizada** pelo fato de que a porção de CSF1R é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2.

29. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, **caracterizada** pelo fato de que a porção de CD40L é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4.

30. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, ou SEQ. ID NO: 27.

31. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende um ou mais ligantes de junção, tais ligantes de junção independentemente selecionados de SEQ ID NOs: 28 a 74.

32. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende dois ou mais ligantes de junção, cada ligante de junção selecionado independentemente de SEQ ID NOs: 28 a 74; em que um ligante de junção é terminal N para o domínio dobradiça-CH2-CH3 Fc e outro ligante de junção é terminal C para o domínio dobradiça-CH2-CH3 Fc.

33. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é uma proteína de fusão recombinante.

34. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, **caracterizada** pelo fato de que a proteína quimérica é capaz de formar uma sinapse estável entre as células.

35. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizada** pelo fato de que a sinapse estável entre as

células proporciona orientação espacial que favorece a redução do tumor.

36. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 34 ou reivindicação 35, **caracterizada** pelo fato de que a orientação espacial posiciona células T para atacar células tumorais e/ou impede estericamente que uma célula tumoral produza sinais negativos, incluindo sinais negativos além daqueles mascarados pela proteína quimérica da invenção.

37. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, **caracterizada** pelo fato de que a ligação de um ou ambos os domínios extracelulares ao seu respectivo parceiro de ligação ocorre com taxas de dissociação ( $K_{off}$ ) lentas, que proporcionam uma longa interação de um receptor e seu ligando.

38. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa fornece um efeito de sinal positivo mais longo.

39. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizada** pelo fato de que o efeito de sinal positivo mais longo permite que uma célula efetora seja adequadamente estimulada para um efeito antitumoral.

40. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 39, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa proporciona proliferação de células T e permite ataque antitumoral.

41. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 40, **caracterizada** pelo fato de que a interação longa permite transmissão de sinal suficiente para proporcionar a liberação de sinais estimulatórios.

42. Proteína quimérica heteróloga, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizada** pelo fato de que o sinal estimulatório é uma citocina.

43. Vetor de expressão, **caracterizado** pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica a proteína quimérica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

44. Célula hospedeira, **caracterizada** pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 43.

45. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína quimérica heteróloga como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

46. Método de tratamento de câncer ou uma doença anti-inflamatória, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz da composição farmacêutica como definida na reivindicação 45 a um sujeito em necessidade da mesma.

47. Método para modular a resposta imune de um paciente, **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar uma quantidade eficaz da composição farmacêutica como definida na reivindicação 45 a um sujeito em necessidade da mesma.

48. Método, de acordo com a reivindicação 46 ou reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que as células T do paciente são ativadas.

49. Método, de acordo com a reivindicação 46 ou reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que o paciente tem um tumor e uma ou mais células tumorais são impedidas de transmitir um sinal imunossupressor.

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

(a) um primeiro domínio compreendendo uma

porção de receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R) que é capaz de ligar a um ligando CSF1R,

(b) um segundo domínio compreende uma porção de ligando CD-40 (CD40L) que é capaz de ligar um receptor de CD40L, e

(c) um ligante ligando o primeiro domínio ao segundo domínio.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado** pelo fato de que as células T do sujeito são ativadas quando ligadas pelo segundo domínio da proteína quimérica heteróloga e:

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

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

(c) o crescimento do tumor é reduzido no sujeito em necessidade ds mesmo, em comparação com um sujeito tratado com anticorpos bloqueadores de CD40 bloqueio e/ou anticorpos bloqueadores de CSF1 ou IL-34.

52. Método, de acordo com a reivindicação 50 ou reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que o método inibe a sinalização de CSF1R e inibe populações de células mieloides supressivas.

53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 52, **caracterizado** pelo fato de que o método estimula a sinalização de CD40 e ativa células apresentadoras de antígeno.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 53, **caracterizado** pelo fato de que o método reduz a quantidade ou atividade de macrófagos associados a tumores (TAMs) em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos direcionando um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

55. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 50 a 54, **caracterizado** pelo fato de que o método reduz a quantidade ou a atividade de macrófagos associados a tumores (TAMs) no microambiente tumoral (TME) em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos direcionando um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o método reduz a quantidade ou atividade de células regulatórias (Tregs) em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos direcionando um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 56, **caracterizado** pelo fato de que o método reduz a quantidade ou atividade de IL-10 e/ou IL-4 em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos direcionando um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

58. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 57, **caracterizado** pelo fato de que o método aumenta a maturação e diferenciação de macrófagos e células dendríticas pró-inflamatórias em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos direcionando um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 58, **caracterizado** pelo fato de que o método aumenta a estimulação das células T efectoras em nódulos linfáticos de drenagem do sujeito em comparação com sujeitos não tratados ou sujeitos direcionado um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

60. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 59, **caracterizado** pelo fato de que o método provoca uma diminuição geral nas células imunossupressoras e uma mudança em direção a um ambiente tumoral mais inflamatório em comparação a sujeito não tratados ou sujeitos direcionando um de CD40/CD40L e CSF1/CSF1R.

61. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizada** pelo fato de que é para uso como

medicamento.

62. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer.

63. Proteína quimérica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença inflamatória.

64. Uso da proteína quimérica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 42, **caracterizado** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento.

65. Proteína de fusão recombinante, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma estrutura geral de:

N terminal – (a) – (b) – (c) – C terminal,

em que:

(a) é um primeiro domínio compreendendo um domínio extracelular de CSF1R que é pelo menos 95% idêntico à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 e é capaz de se ligar a um ligando CSF1R,

(b) é um ligante que liga o primeiro domínio e o segundo domínio e que compreende um domínio de dobradiça-CH2-CH3 Fc derivado de IgG4 humana e, opcionalmente, uma sequência de ligante de junção da SEQ ID 28 a 74, e

(c) é um segundo domínio compreendendo um domínio extracelular do ligando de CD40 (CD40L) que é pelo menos 95% idêntico à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4 e é capaz de se ligar a um receptor de CD40L.

66. Proteína de fusão recombinante, de acordo com a reivindicação 65, **caracterizada** pelo fato de que o ligante compreende uma sequência que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, ou SEQ ID NO: 27.

67. Proteína de fusão recombinante, de acordo com a



reivindicação 65 ou reivindicação 66, **caracterizada** pelo fato de que é para uso como medicamento.

68. Proteína de fusão recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 67, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer.

69. Proteína de fusão recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 65 a 68, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de uma doença inflamatória.

70. Uso da proteína de fusão recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 65 a 69, **caracterizado** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento.

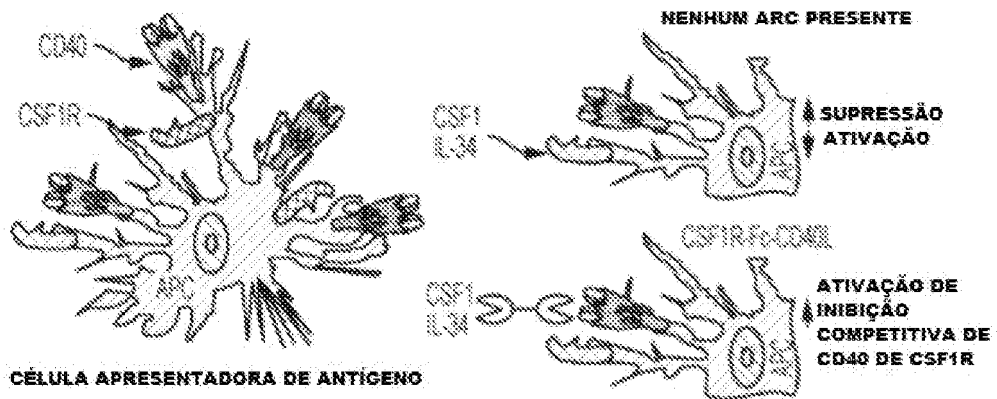


FIG. 1A

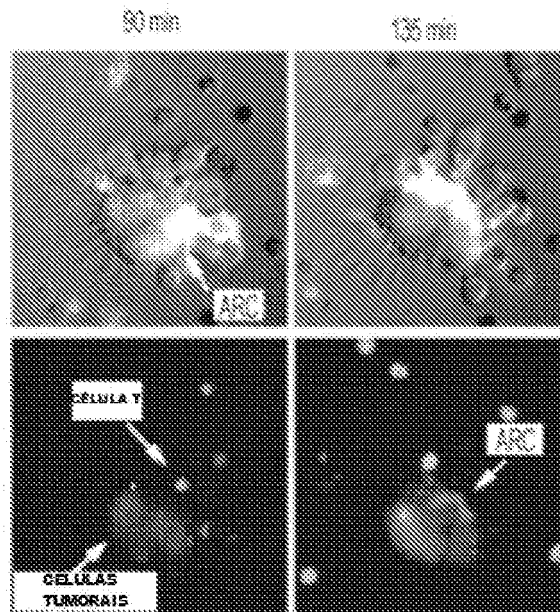


FIG. 1B

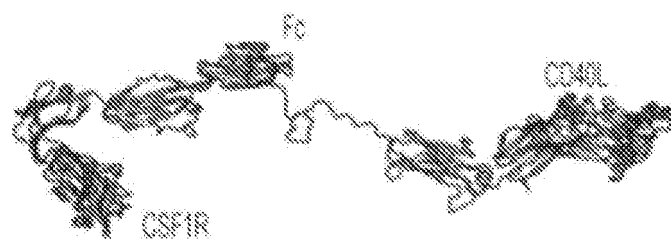


FIG. 1C

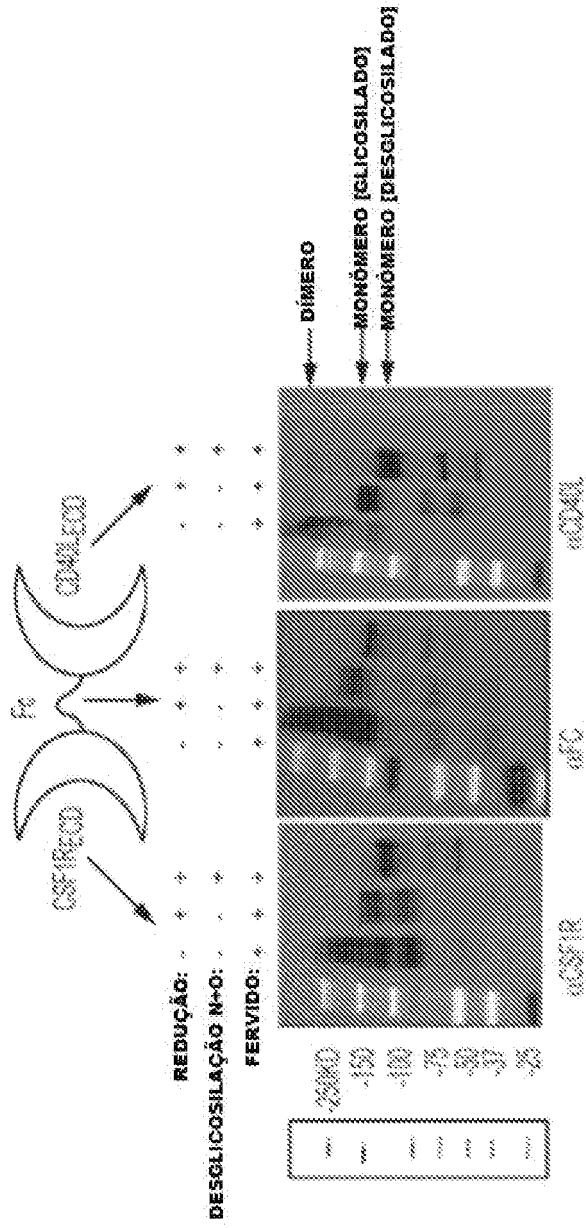
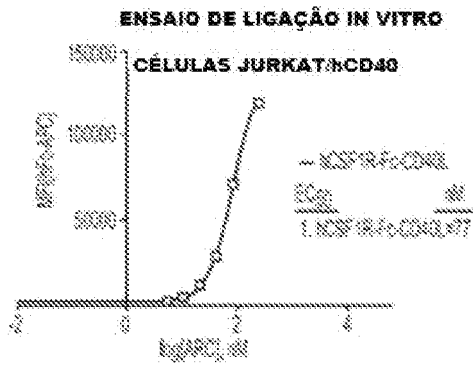
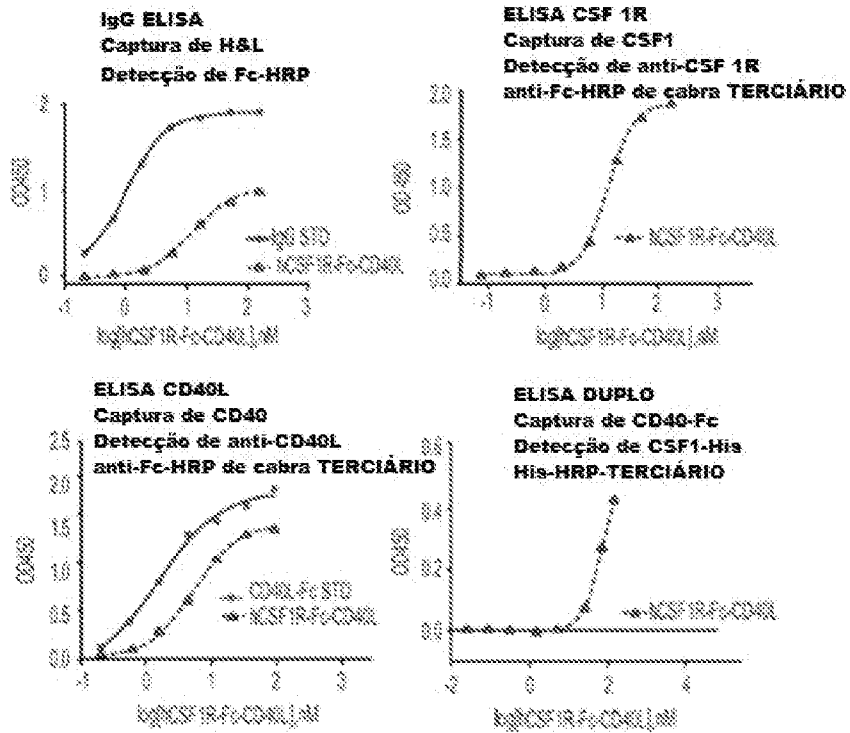
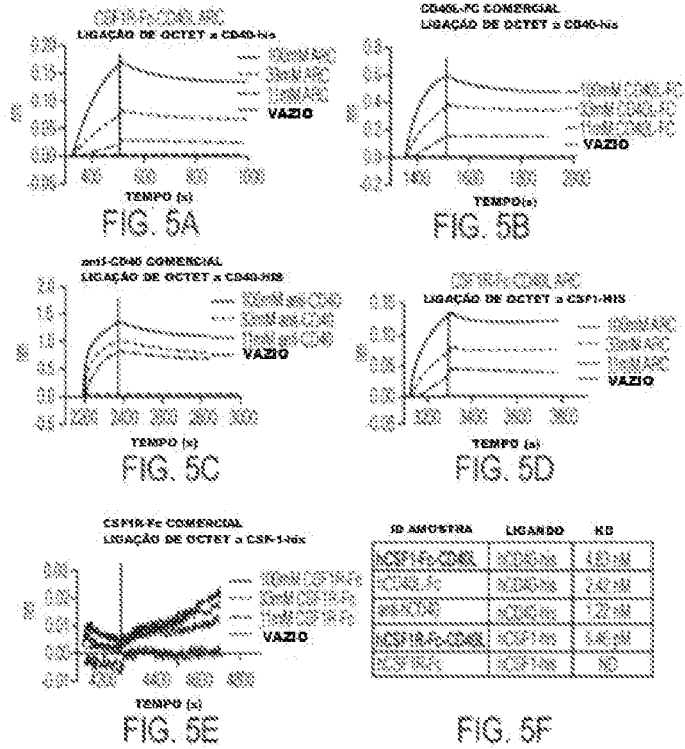


FIG. 2





ID AMOSTRA	LIGANDO	KD
CSF18-PCOM	CD40-PC	1,81 mg
CD46-PC	CD46-PC	1,40 mg
SEM PCOM	CD46-PC	1,27 mg
CSF18-PCOM	CSF18-PC	1,46 mg
SEM PCOM	CSF18-PC	ND

FIG. 5F

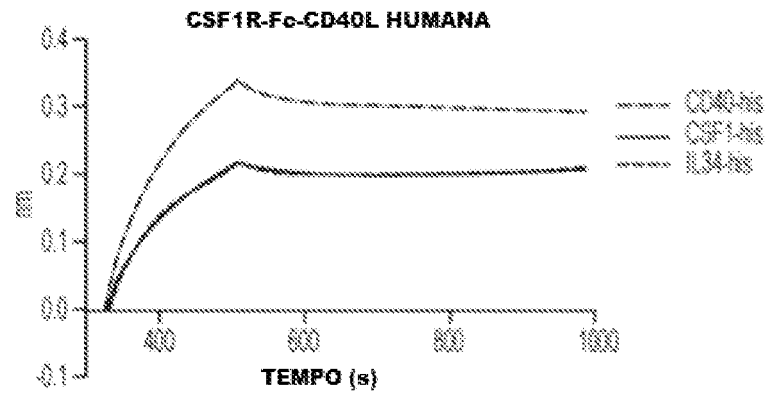


FIG. 6

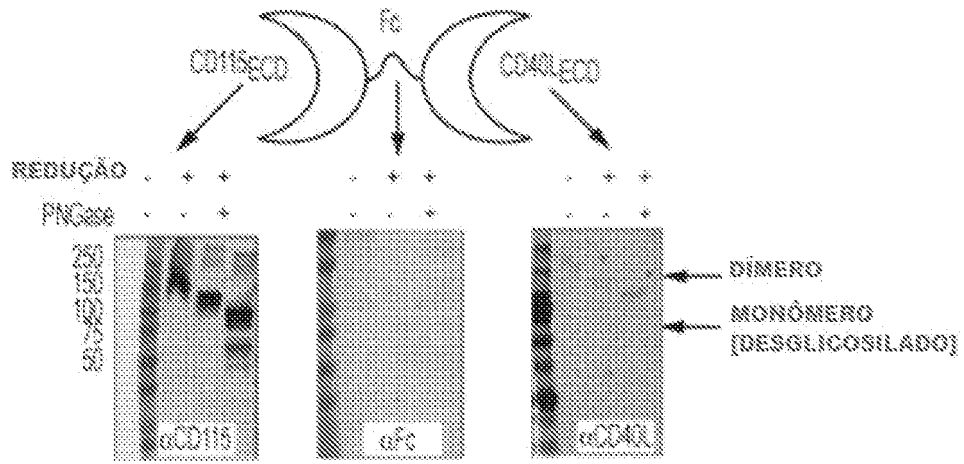
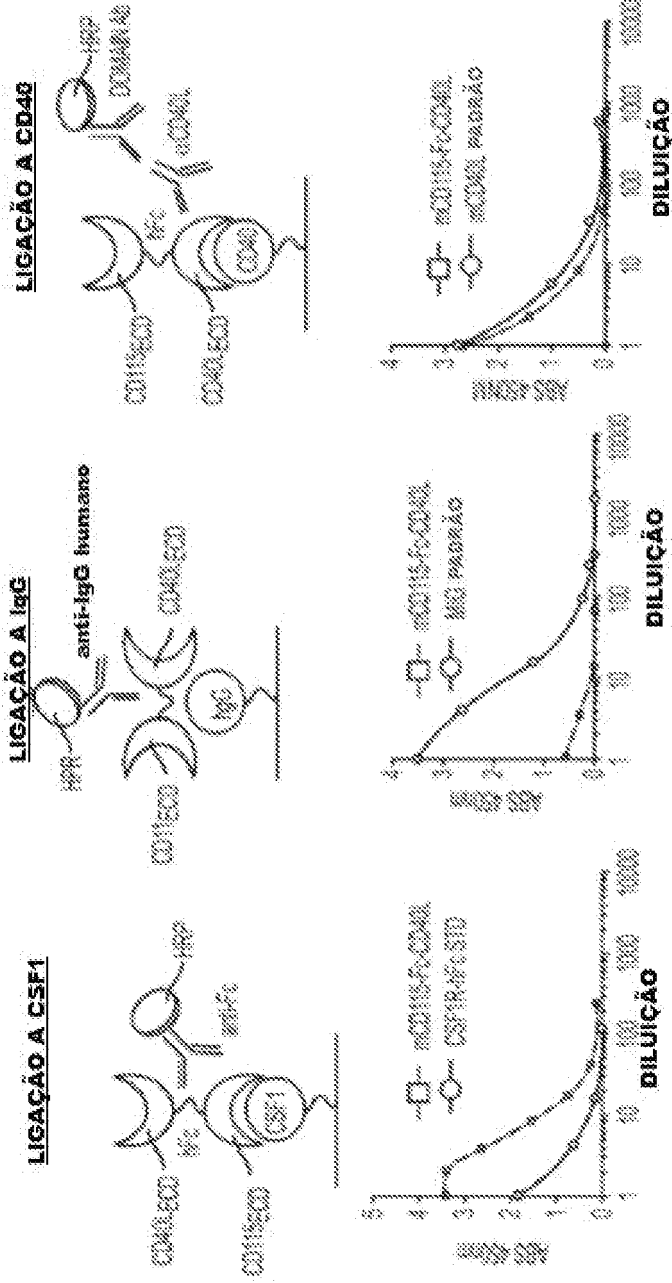


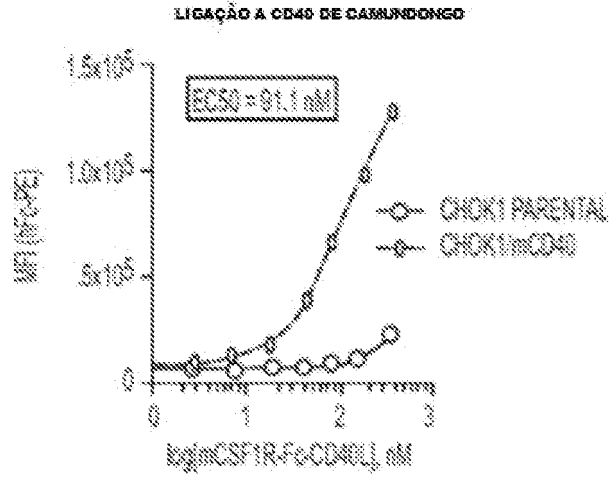
FIG. 7A



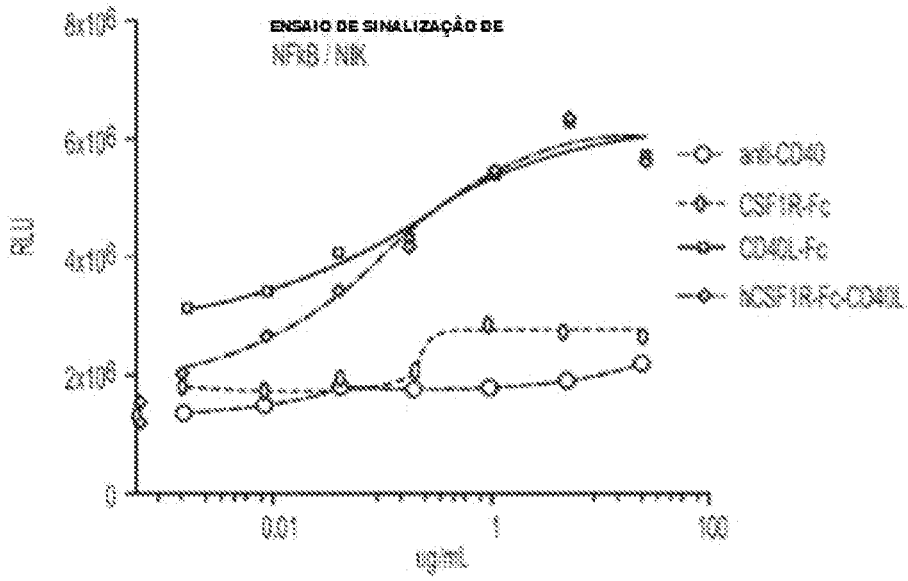


DILUIÇÃO INICIAL PADRÃO 2000 ng/ml. DILUIÇÃO INICIAL PADRÃO 1000 ng/ml. DILUIÇÃO INICIAL PADRÃO 2000 ng/ml.  
 DILUIÇÃO DE AMOSTRA PADRÃO 1:100. DILUIÇÃO DE AMOSTRA PADRÃO 1:200. DILUIÇÃO DE AMOSTRA PADRÃO 1:200.

FIG.7B



**FIG. 8**



**FIG. 9**

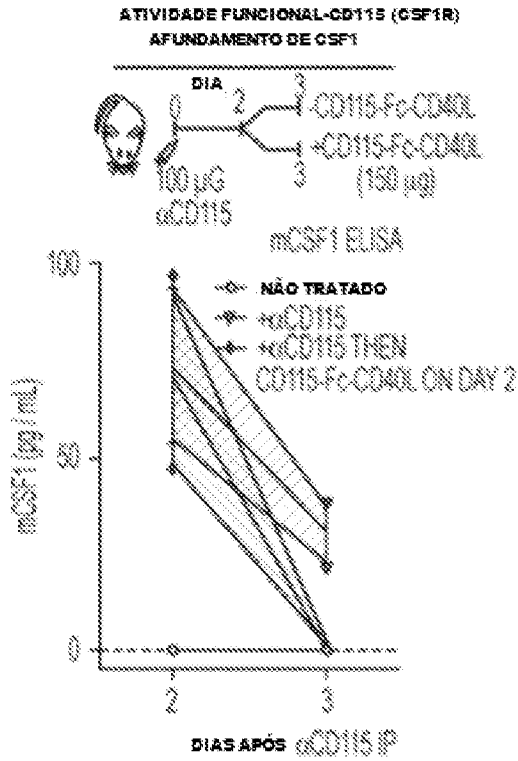


FIG. 10A

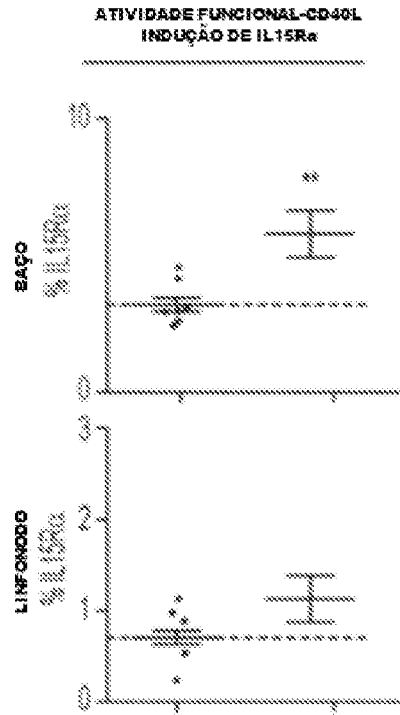


FIG. 10B

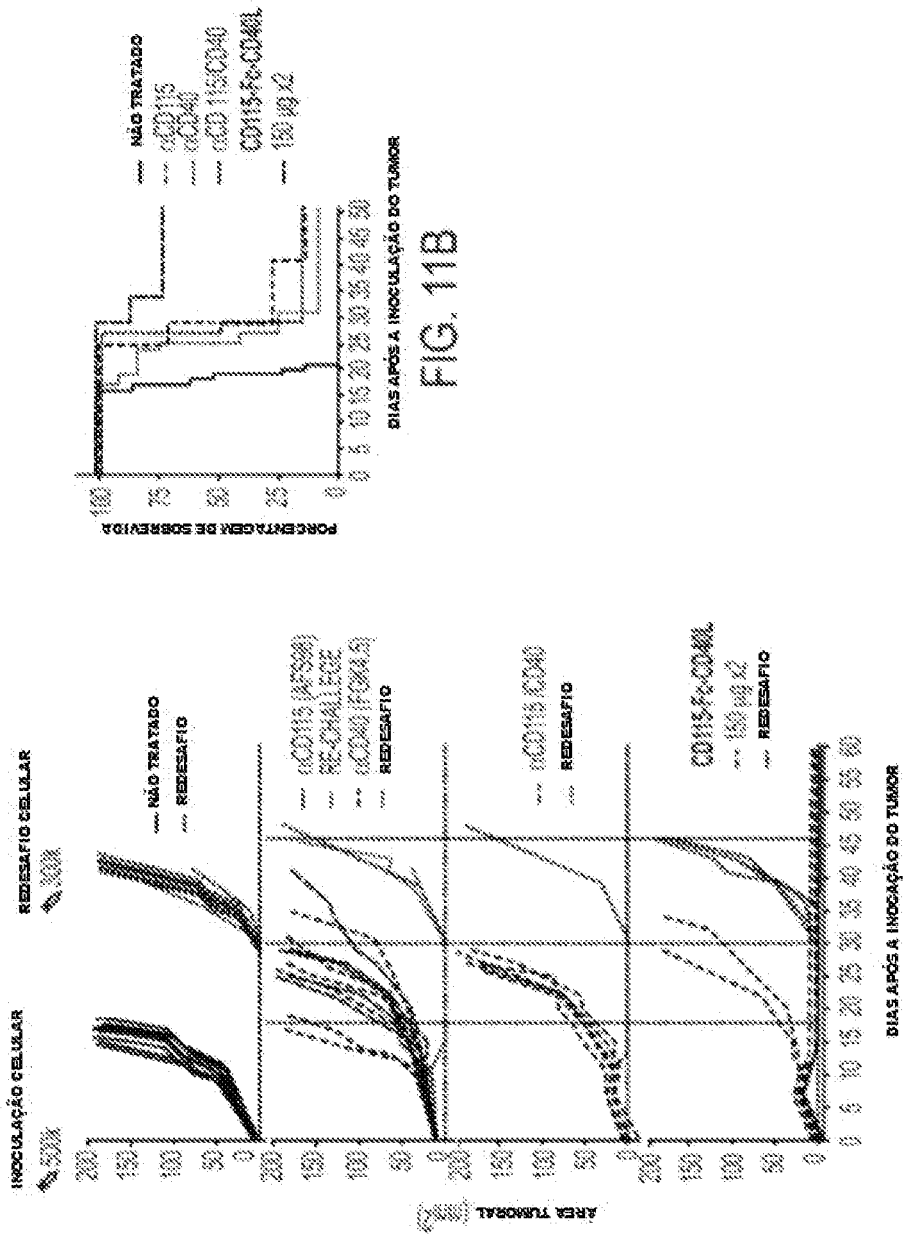
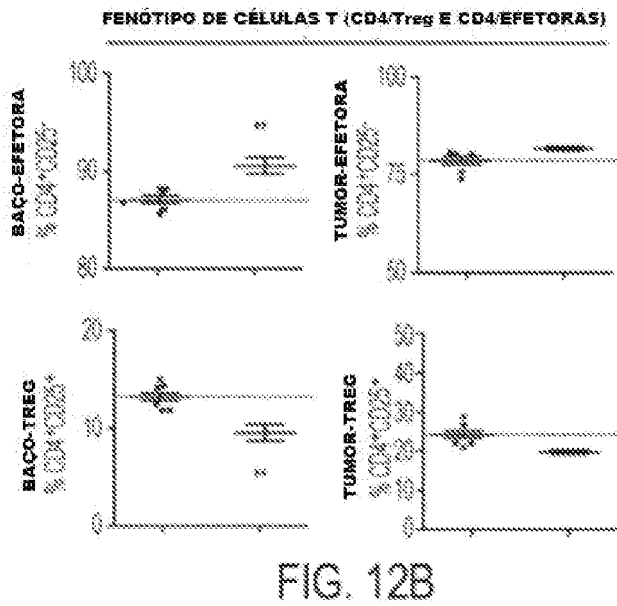
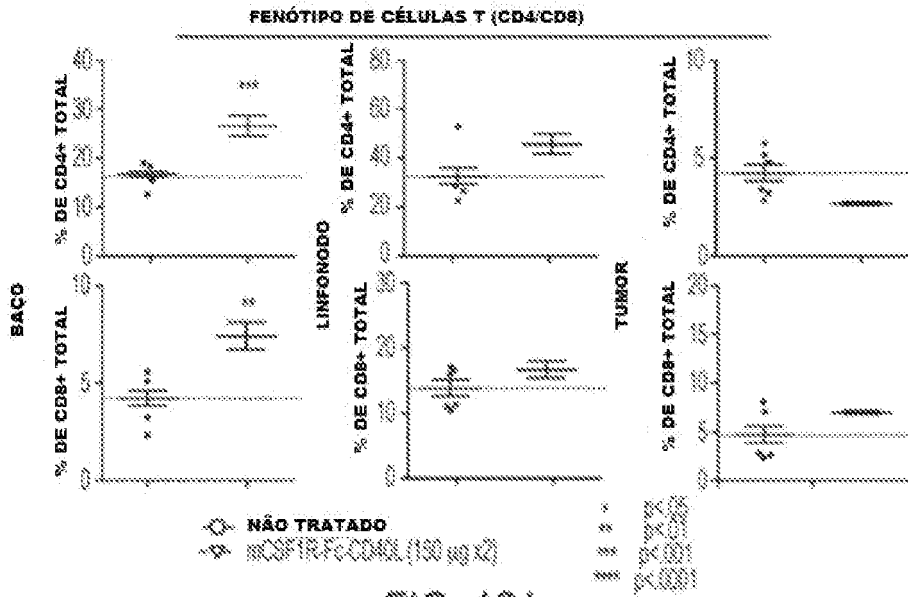


FIG. 11B

FIG. 11A

GRUPO	TOTAL, N	CURTO PRAZO, N (PERFILAGEM IMUNE)	LONGO PRAZO, N (CRESCIMENTO SOBRE VIDA TUMORAL)	% DE REJEIÇÃO (TUMOR PRIMÁRIO)	% DE REJEIÇÃO (REDESAFIO)
<b>NÃO TRATADO</b>	33	12	21	0.0	0.0
αCD115 (AFS98)	7	1	7	14.3	0
αCD40 (FGN4.5)	12	1	12	8.3	0
αCD115/CD40	7	1	7	14.3	0
CD115-Fc-CD40L (150µg x2)	9	2	7	71.4	0

FIG. 11C



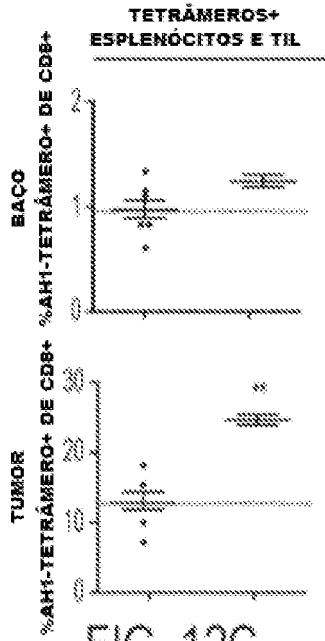


FIG. 12C

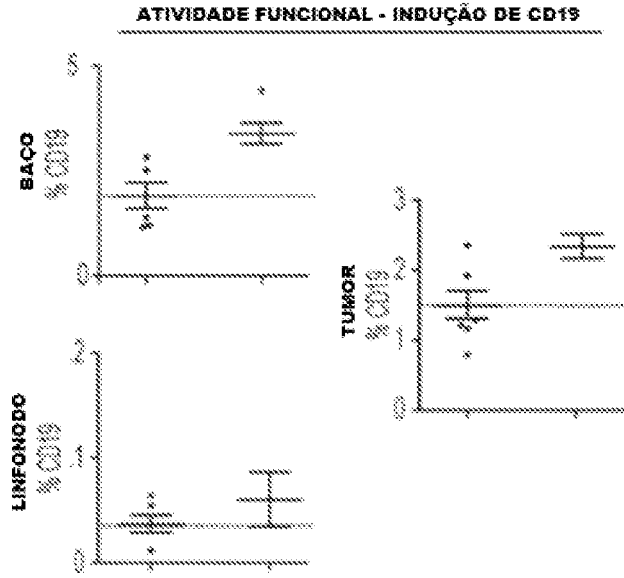


FIG. 12D

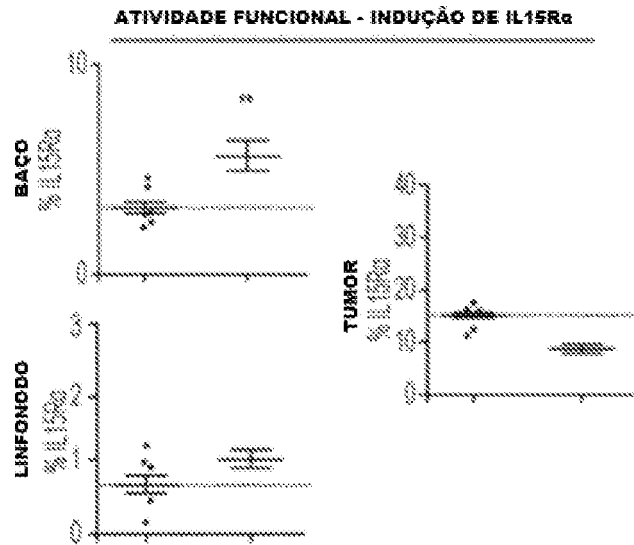


FIG. 12E

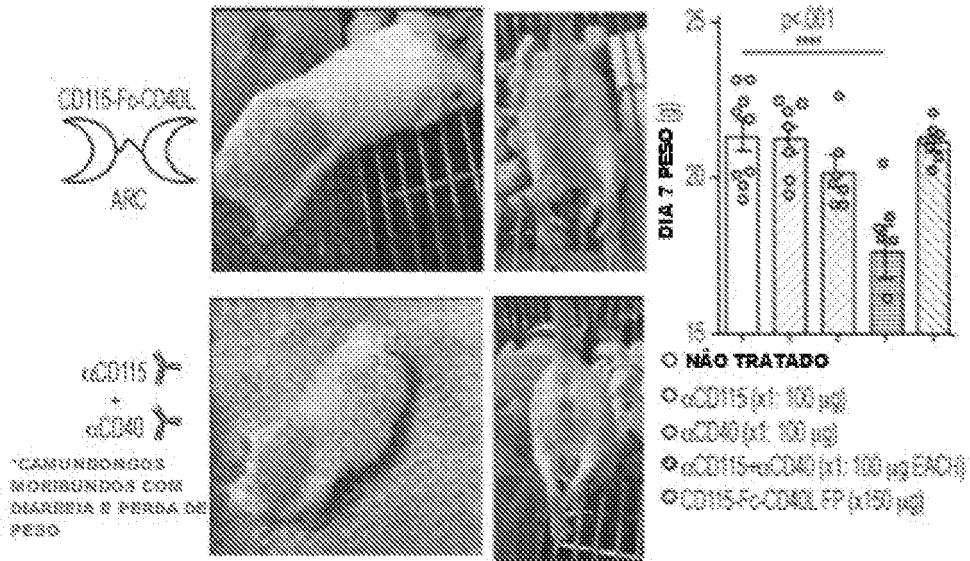


FIG. 13A

FIG. 13B

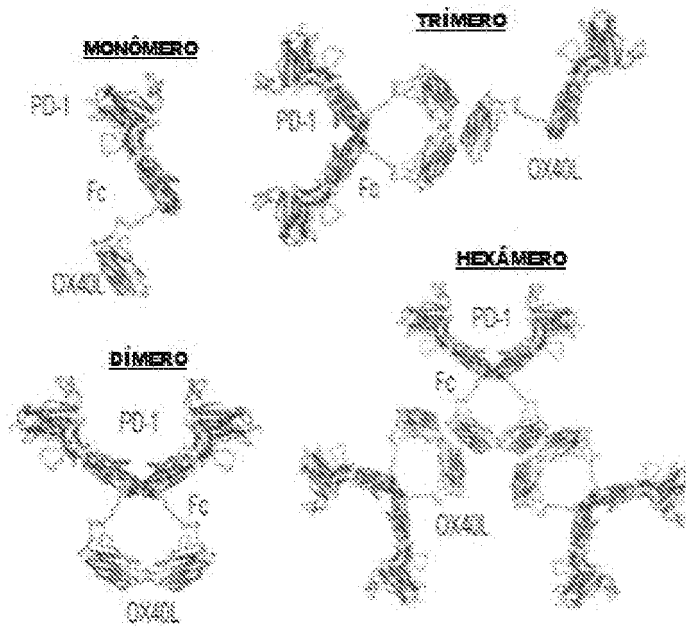


FIG. 14



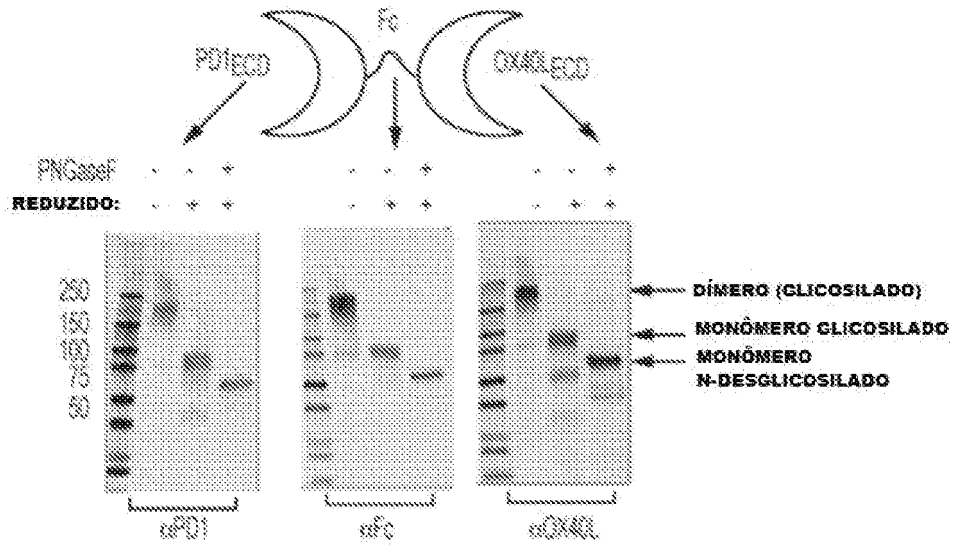


FIG. 15

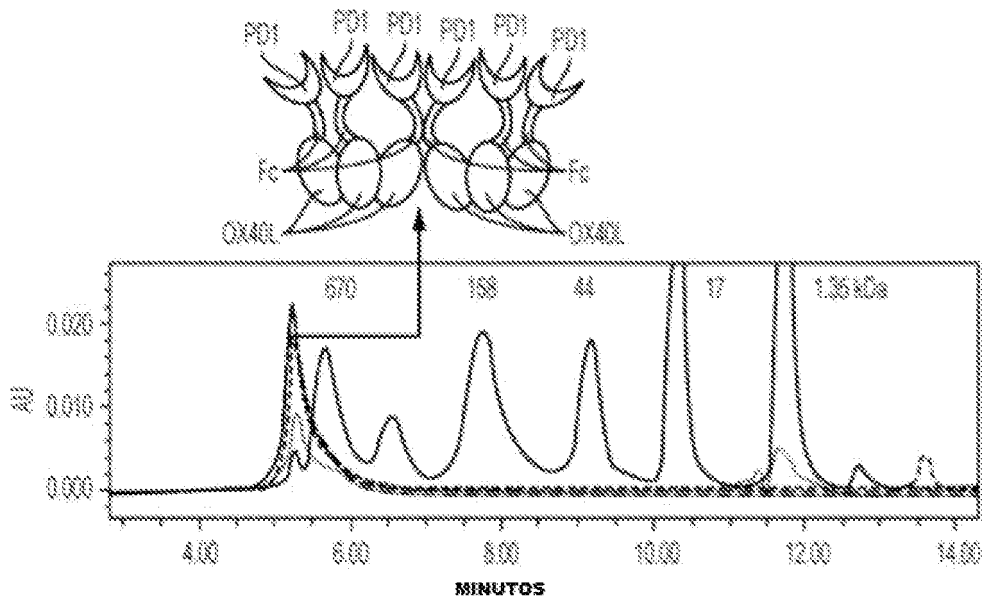


FIG. 16

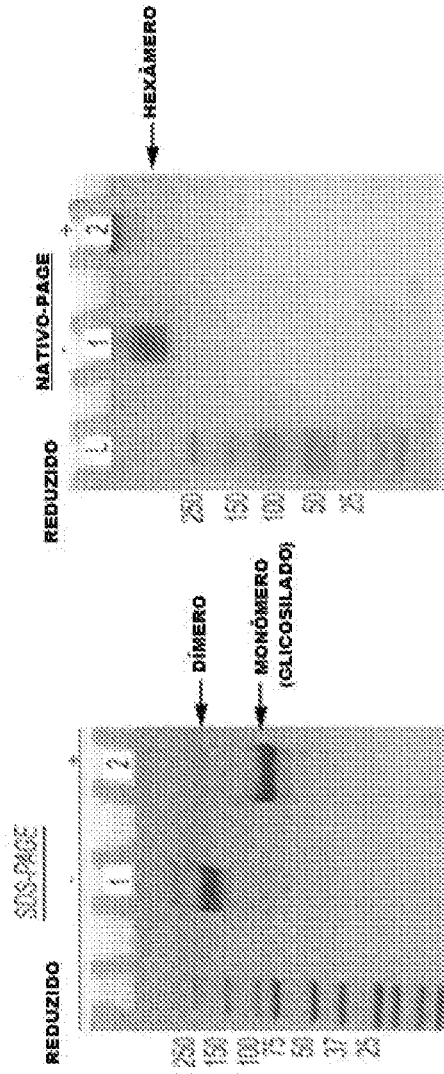


FIG. 17

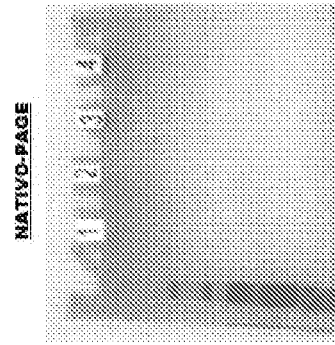


FIG. 18

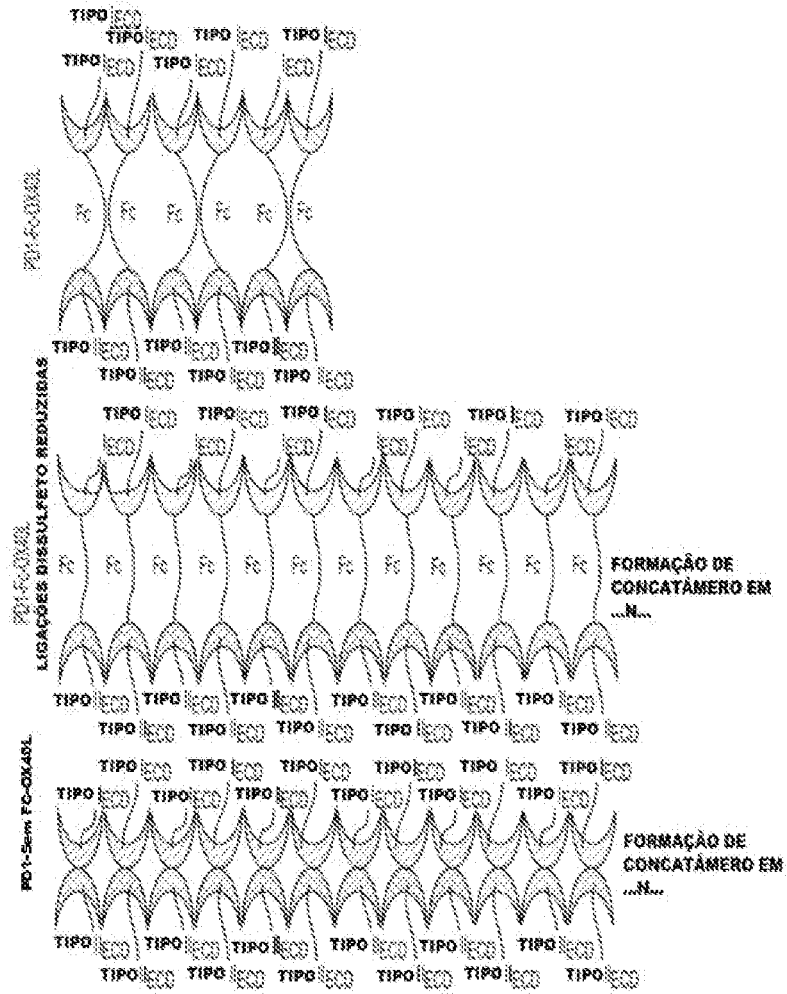


FIG. 19



**RESUMO**

**“PROTEÍNAS QUIMÉRICAS À BASE DE CSF1R”**

A presente invenção refere-se, em parte, a proteínas quiméricas, que incluem o domínio extracelular de um receptor de fator de estimulação de colônias 1 (CSF1R) e seu uso no tratamento de doenças, tais como imunoterapias para câncer e/ou uma doença inflamatória.

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

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 26/08/2019
- Hora de Geração do Código: 12:45:26
- Código de Controle:
  - Campo 1: 631BF6F54813148F
  - Campo 2: E958A21D55203F70