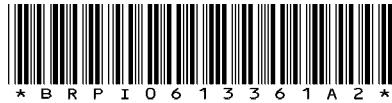




República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0613361-4 A2



* B R P I 0 6 1 3 3 6 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 30/06/2006
(43) Data da Publicação: 04/01/2011
(RPI 2087)

(51) Int.CI.:
C07K 16/28

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, COMPOSIÇÃO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, CAMUNDONGO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA MODULAR UMA RESPOSTA IMUNE NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA INIBIR CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA INFECCIOSA NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA RESPOSTA IMUNE A UM ANTÍGENO NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA NUM INDIVÍDUO E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO ANTI-PD-L1

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2005 US 60/696,426

(73) Titular(es): Medarex, Inc.

(72) Inventor(es): Alan J. Korman, Changyu Wang, David B. Passmore, Haibin Chen, Haichun Huang, Mark J. Selby, Mohan Srinivasan

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT US2006026046 de 30/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/005874de 11/01/2007

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, COMPOSIÇÃO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, CAMUNDONGO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA MODULAR UMA RESPOSTA IMUNE NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA INIBIR CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA INFECCIOSA NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA RESPOSTA IMUNE A UM ANTÍGENO NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA NUM INDIVÍDUO E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO ANTI-PD-L1". A presente descrição provê anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos que ligam-se especificamente a PD-L1 com alta afinidade. Moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da presente descrição, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos da presente descrição são também providos. Imunoconjungados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos da invenção são também providos. A descrição também provê métodos para detectar PD-L1, bem como métodos para tratar diversas doenças, inclusive o câncer e doenças infecciosas, utilizando anticorpos anti-PD-L1.

"ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, COMPOSIÇÃO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, CAMUNDONGO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA MODULAR 5 UMA RESPOSTA IMUNE NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA INIBIR CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA INFECIOSA NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA RESPOSTA IMUNE A UM ANTÍGENO NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA 10 INFLAMATÓRIA NUM INDIVÍDUO E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO ANTI-PD-L1".

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

O receptor de morte programada 1 (PD-1) é um membro da família CD28 de receptores, que inclui CD28, CTLA-4, 15 ICOS, PD-1 e BTLA. Os primeiros membros da família, CD28 e ICOS, foram descobertos pelo efeito funcional de aumentar a proliferação de célula T após a adição de anticorpos monoclonais (Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) 20 Immunogenics 10: 247-260).

Dois ligantes de glicoproteína de superfície celular para PD-1 foram identificados, PD-L1 e PD-L2, e demonstraram regular para baixo ("downregulate") a ativação de célula T e a secreção de citocina quando da ligação a PD-1 (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter et al., (2002), Eur J Immunol 32:634:43; Ohigashi et al., (2005), Clin Cancer Res 11:2947-53). Tanto o PD-L1 (B7-H1) como o PD-L2 (B7-DC) são 25 homólogos de B7 que ligam-se a PD-1, mas que não se ligam a outros membros da família CD28 (Blank et al. (2004)). A expressão de PD-L1 sobre a superfície celular também demonstrou ser regulada para cima através da estimulação de IFN- γ .

30 A expressão de PD-L1 tem sido encontrada em diversos cânceres murinos e humanos incluindo carcinoma de pulmão, ovário e cólon humano e diversos mielomas (Iwai 35

et al. (2002) PNAS 99:12293-7; Ohigashi et al. (2005) Clin Cancer Res 11:2947-53). Sugeriu-se que o PD-L1 desempenha um papel na imunidade tumoral aumentando a apoptose de clones de célula T antígeno-específicos (Dong et al. (2002) Nat Med 8:793-800). Sugeriu-se também que o PD-L1 poderia estar envolvido na inflamação de mucosa intestinal e que a inibição de PD-L1 suprime a doença debilitante associada com colite (Kanai et al. (2003) J Immunol. 171:4156-63).

10 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção provê anticorpos monoclonais isolados, em especial anticorpos monoclonais humanos que ligam-se a PD-L1 e que exibem numerosas propriedades desejáveis. Essas propriedades incluem ligação de alta afinidade a PD-L1 humano. Outrossim, os anticorpos da invenção demonstraram aumentar a proliferação de célula T, secreção de IFN- γ e secreção de IL-2 numa reação linfocitária mista.

Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou a uma porção ligante ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades:

- (a) liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos;
- (b) aumenta a proliferação de célula T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (c) aumenta a produção de interferon- γ num ensaio MLR;
- (d) aumenta a secreção de IL-2 num ensaio MLR;
- (e) estimula as respostas ao anticorpo; e/ou
- (f) reverte o efeito de células T reguladoras sobre células T efetoras e/ou células dendríticas.

Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano, embora em concretizações alternativas o anticorpo possa ser, por exemplo, um anticorpo murino, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado.

35 Em concretizações específicas, o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $5 \times 10^{-8} M$ ou menos, liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-8} M$ ou menos, liga-se a PD-L1

humano com um K_D de $5 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $5 \times 10^{-9}M$ ou menos, ou liga-se a PD-L1 humano com um K_D de entre $1 \times 10^{-8}M$ e $1 \times 10^{-10} M$.

Em outra concretização, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo faz competição cruzada para ligar-se a PD-L1 com um anticorpo de referência compreendendo:

(a) a região variável de cadeia pesada humana que 10 compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10; e

(b) a região variável de cadeia leve humana que 15 compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20.

Em diversas concretizações, o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a 20 seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:11; ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a 25 seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:12; ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a 30 seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:3; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13; ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a 35 seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:14;

ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15;

ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 6; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 16;

ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 17;

ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:8; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 18;

ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:19;

ou o anticorpo de referência compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:20.

Em outro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou a uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene V_H 1-18 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo,

compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-69 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado ou

5 uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-3 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma

10 porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 3-9 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao

15 antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L6 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo,

20 compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L15 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo

25 uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K A27 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. A invenção provê ainda um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de

30 cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L18 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

Numa concretização especialmente preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção

35 ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 1-18 humano; e

(b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6 humano;
sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.
Em outra concretização preferida, a invenção provê um
5 anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao
antígeno do mesmo, compreendendo:
(a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 1-
69 humano; e
(b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6
10 humano;
sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.
Em outra concretização preferida, a invenção provê um
anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao
antígeno do mesmo, compreendendo:
15 (a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 1-
3 humano; e
(b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L15
humano;
sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.
20 Em outra concretização preferida, a invenção provê um
anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao
antígeno do mesmo, compreendendo:
(a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 1-
69 humano; e
25 (b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K A27
humano;
sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.
Em outra concretização preferida, a invenção provê um
anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao
30 antígeno do mesmo, compreendendo:
(a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-
9 humano; e
(b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L15
humano;
35 sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.
Em outra concretização preferida, a invenção provê um
anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao

antígeno do mesmo, compreendendo:

(a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-9 humano; e

5 (b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L18 humano;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

Em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo:

10 uma região variável de cadeia pesada que compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3;

e uma região variável de cadeia leve que compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

15 (a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, e suas modificações conservativas;

20 (b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80, e suas modificações conservativas; e

25 (c) o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1 humano.

Preferivelmente, a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38,

30 39 e 40, e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 61, 62, 63,

35 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70, e suas modificações conservativas. Preferivelmente, a seqüência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24,

40 25, 26, 27, 28, 29 e 30 e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR1 da região variável de

cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 e suas modificações conservativas.

5 Em outro aspecto ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

10 (a) a região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüência de aminoácido do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10;

15 (b) a região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; e

(c) o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos.

20 Numa concretização preferida, os anticorpos adicionalmente compreendem pelo menos uma das seguintes propriedades:

(a) o anticorpo aumenta a proliferação de célula T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);

25 (b) o anticorpo aumenta a produção de interferon- γ num ensaio de MLR; ou

(c) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 num ensaio de MLR.

Em concretizações preferidas, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26,

35 27, 28, 29 e 30;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do

grupo consistindo de SEQ ID NOS:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40;

5 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüênciade aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüênciade aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 10 57, 58, 59 e 60;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüênciade aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70; e

15 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüênciade aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

20 Uma combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 21;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:31;

25 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 41;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:51;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve 30 compreendendo SEQ ID NO:61; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:71.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada 35 compreendendo SEQ ID NO: 22;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:32;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 42;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:52;

5 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:62; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:72.

Outra combinação preferida compreende:

10 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 23;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:33;

15 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 43;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:53;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:63; e

20 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:73.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 24;

25 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:34;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 44;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:54;

30 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:64; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:74.

35 Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 25;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:35;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 45;

5 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:55;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:65; e

10 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:75.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 26;

15 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:36;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 46;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:56;

20 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:66; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:76.

Outra combinação preferida compreende:

25 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 27;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:37;

30 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 47;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:57;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:67; e

35 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:77.

Outra combinação preferida compreende:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 28;
- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 38;
- 5 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 48;
- (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 58;
- (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
10 compreendendo SEQ ID NO: 68; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 78.

Outra combinação preferida compreende:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
15 compreendendo SEQ ID NO: 29;
- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 39;
- (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 49;
- 20 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 59;
- (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 69; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
25 compreendendo SEQ ID NO: 79.

Outra combinação preferida compreende:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 30;
- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
30 compreendendo SEQ ID NO: 40;
- (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 50;
- (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 60;
- 35 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 70; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO:80.

Outros anticorpos preferidos da invenção ou porções ligantes ao antígeno dos mesmos compreende:

5 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, e 10; e

10 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

Uma combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e

15 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:11.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2; e .

20 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:12.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:3; e

25 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4; e

30 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:14.

Outra combinação preferida compreende:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e

35 (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15.

Outra combinação preferida compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6; e
(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:16.
- 5 Outra combinação preferida compreende:
(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7; e
(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:17.
- 10 Outra combinação preferida compreende:
(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:8; e
(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:18.
- 15 Outra combinação preferida compreende:
(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9; e
(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:19.
- 20 Outra combinação preferida compreende:
(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10; e
(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:20.
- 25 Em outro aspecto da presente descrição, são providos os anticorpos ou as porções ligantes ao antígeno dos mesmos, que competem para ligar-se ao PD-L1 com qualquer um dos anticorpos anteriormente citados.
- Os anticorpos da presente descrição podem, por exemplo,
30 ser anticorpos de extensão completa, como por exemplo um isótipo IgG1 ou IgG4. Alternativamente, os anticorpos podem ser fragmentos de anticorpo, tais como os fragmentos Fab ou Fab'2, ou anticorpos de cadeia simples.
- A presente descrição também provê um imunoconjungado
35 compreendendo um anticorpo da invenção, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, ligado a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou um isótopo

radioativo. A invenção também provê uma molécula biespecífica, compreendendo um anticorpo, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, da invenção, ligado a uma segunda porção funcional que possui uma especificidade de

5 ligação diferente da de dito anticorpo, ou da porção ligante ao antígeno do mesmo.

Composições compreendendo um anticorpo, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, ou imunoconjungado ou molécula biespecífica da presente descrição e um portador

10 farmaceuticamente aceitável são também providos.

Moléculas de ácido nucleico codificando os anticorpos, ou porções ligantes ao antígeno dos mesmos, da invenção, são também abrangidas pela invenção, bem como os vetores de expressão compreendendo tais ácidos nucleicos e células

15 hospedeiras compreendendo tais vetores de expressão. Além disso, a invenção provê um camundongo transgênico compreendendo transgenes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana, sendo que o camundongo expressa um anticorpo da invenção, bem como hibridomas preparados de

20 tal camundongo, sendo que o hibridoma produz o anticorpo da invenção.

Em outro aspecto ainda, a invenção provê um método para modular uma resposta imune num indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo o anticorpo ou porção ligante ao

25 antígeno do mesmo, da invenção, de forma que a resposta imune no indivíduo seja modulada. Preferivelmente, o anticorpo da invenção intensifica, estimula ou aumenta a resposta imune no indivíduo.

Num outro aspecto, a invenção provê um método para inibir

30 o crescimento de células tumorais num indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-L1, ou porção ligante ao antígeno do mesmo. Os anticorpos da invenção são preferidos para uso no método, embora outros

35 anticorpos anti-PD-L1 possam ser usados em seu lugar (ou em combinação com um anticorpo anti-PD-L1 da invenção). Por exemplo, um anticorpo anti-PDL1 quimérico, humanizado

ou totalmente humano pode ser usado no método para inibir o crescimento de tumor.

Num outro aspecto, a invenção provê um método para tratar uma doença infecciosa num indivíduo, compreendendo administrar a um indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-L1 ou de uma porção ligante ao antígeno do mesmo. Os anticorpos da invenção são preferidos para uso no método, embora outros anticorpos anti-PD-L1 possam ser usados em seu lugar (ou em combinação com um anticorpo anti-PD-L1 da invenção). Por exemplo, um anticorpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado ou totalmente humano pode ser usado no método para tratar uma doença infecciosa.

Outrossim, a invenção provê um método para intensificar uma resposta imune a um antígeno num indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo: (i) o antígeno; e (ii) um anticorpo anti-PD-L1, ou porção ligante ao antígeno do mesmo, de forma que uma resposta imune ao antígeno seja aumentada no indivíduo. O antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno de um patógeno. Os anticorpos da invenção são preferidos para uso no método, embora outros anticorpos anti-PD-L1 possam ser usados em seu lugar (ou em combinação com um anticorpo anti-PD-L1 da invenção). Por exemplo, pode-se utilizar um anticorpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado ou totalmente humano no método para intensificar uma resposta imune a um antígeno num indivíduo.

A invenção também provê métodos para preparar anticorpos anti-PD-L1 de "segunda geração" com base nas seqüências dos anticorpos anti-PD-L1 providos na presente invenção. Por exemplo, a invenção provê um método para preparar um anticorpo anti-PD-L1 compreendendo:

(a) prover: (i) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, uma

seqüência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40; e uma seqüência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50;

5 ou (ii) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60, uma seqüência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 61, 62,

10 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, e 70 e uma seqüência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80;

(b) alterar pelo menos um resíduo aminoácido dentro de pelo menos uma seqüência de anticorpo de região variável,

15 dita seqüência sendo selecionada da seqüência de anticorpo de região variável de cadeia pesada e da seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve, para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterado; e

20 (c) expressar a seqüência de anticorpo alterado como proteína.

Outras características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição e exemplos detalhados a seguir que não devem ser interpretados como restritivos. Os conteúdos de todas as referências, registros no Genbank, patentes e pedidos de patentes publicados citados em toda a descrição são expressamente incorporados por referência nesta patente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

30 A Figura 1A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:81) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:1) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 3G10. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:31) e CDR3 (SEQ ID NO:41) e

35 indicadas as derivações de linha germinal V, D e J; A Figura 1B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:91) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:11) da

região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 3G10. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:61) e CDR3 (SEQ ID NO:71) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

5 A Figura 2A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:82) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:2) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 12A4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:22), CDR2 (SEQ ID NO:32) e CDR3 (SEQ ID NO:42) e
10 indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 2B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:92) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:12) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12A4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:52), CDR2 (SEQ ID NO:62) e CDR3 (SEQ ID NO:72) e
15 indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 3A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:83) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:3) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 10A5. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:23), CDR2 (SEQ ID NO:33) e CDR3 (SEQ ID NO:43) e
20 indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 3B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:93) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:13) da
25 região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 10A5. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:53), CDR2 (SEQ ID NO:63) e CDR3 (SEQ ID NO:73) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 4A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:84) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:4) da
30 região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 5F8. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:24), CDR2 (SEQ ID NO:34) e CDR3 (SEQ ID NO:44) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

35 A Figura 4B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:94) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:14) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal

humano 5F8. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:64) e CDR3 (SEQ ID NO:74) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

5 A Figura 5A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:85) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:5) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 10H10. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:25), CDR2 (SEQ ID NO:35) e CDR3 (SEQ ID NO:45) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

10 A Figura 5B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:95) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:15) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 10H10. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:55), CDR2 (SEQ ID NO:65) e CDR3 (SEQ ID NO:75) e 15 indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 6A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:86) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:6) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 1B12. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:26), CDR2 (SEQ ID NO:36) e CDR3 (SEQ ID NO:46) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;.

A Figura 6B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:96) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:16) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 1B12. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:56), CDR2 (SEQ ID NO:66) e CDR3 (SEQ ID NO:76) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 7A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:87) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:7) da 30 região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 7H1. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:27), CDR2 (SEQ ID NO:37) e CDR3 (SEQ ID NO:47) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 7B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:97) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:17) da 35 região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 7H1. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:57),

CDR2 (SEQ ID NO:67) e CDR3 (SEQ ID NO:77) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 8A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:88) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:8) da 5 região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 11E6. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:38) e CDR3 (SEQ ID NO:48) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 8B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID 10 NO:98) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:18) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 11E6. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:58), CDR2 (SEQ ID NO:68) e CDR3 (SEQ ID NO:78) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

15 A Figura 9A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:89) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:9) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 12B7. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:29), CDR2 (SEQ ID NO:39) e CDR3 (SEQ ID NO:49) e 20 indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 9B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID 25 NO:99) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:19) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12B7. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:59), CDR2 (SEQ ID NO:69) e CDR3 (SEQ ID NO:79) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 10A mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID 30 NO:90) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:10) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 13G4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:40) e CDR3 (SEQ ID NO:50) e indicadas as derivações de linha germinal V e J;

A Figura 10B mostra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID 35 NO:100) e a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:20) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 13G4. São descritas as regiões CDR1 (SEQ ID NO:60), CDR2 (SEQ ID NO:70) e CDR3 (SEQ ID NO:80) e

- indicadas as derivações de linha germinal V e J;
- A Figura 11 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 3G10 com a seqüência de aminoácido V_H 1-18 (SEQ ID No.101) da linha germinal humana;
- A Figura 12 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 12A4 com a seqüência de aminoácido V_H 1-69 (SEQ ID No.102) da linha germinal humana;
- 10 A Figura 13 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 10A5 com a seqüência de aminoácido V_H 1-3 (SEQ ID No.103) da linha germinal humana;
- A Figura 14 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 5F8 com a seqüência de aminoácido V_H 1-69 (SEQ ID No.102) da linha germinal humana;
- 15 A Figura 15 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 10H10 com a seqüência de aminoácido V_H 3-9 (SEQ ID No.104) da linha germinal humana;
- A Figura 16 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 1B12 com a seqüência de aminoácido V_H 1-69 (SEQ ID No.102) da linha germinal humana;
- 20 A Figura 17 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 7H1 com a seqüência de aminoácido V_H 1-69 (SEQ ID No.102) da linha germinal humana;
- 25 A Figura 18 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 11E6 com a seqüência de aminoácido V_H 1-69 (SEQ ID No.102) da linha germinal humana;
- A Figura 19 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 12B7 com a seqüência de aminoácido V_H 1-69 (SEQ ID No.102) da linha germinal humana;

A Figura 20 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 13G4 com a seqüência de aminoácido V_H 3-9 (SEQ ID No.104) da linha germinal humana;

5 A Figura 21 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 3G10 com a seqüência de aminoácido V_K L6 (SEQ ID No.105) da linha germinal humana;

10 A Figura 22 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 12A4 com a seqüência de aminoácido V_K L6 (SEQ ID No.105) da linha germinal humana;

15 A Figura 23 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 10A5 com a seqüência de aminoácido V_K L15 (SEQ ID No.106) da linha germinal humana;

20 A Figura 24 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 5F8 com a seqüência de aminoácido V_K A27 (SEQ ID No.107) da linha germinal humana;

A Figura 25 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 10H10 com a seqüência de aminoácido V_K L15 (SEQ ID No.106) da linha germinal humana;

25 A Figura 26 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 1B12 com a seqüência de aminoácido V_K L6 (SEQ ID No.105) da linha germinal humana;

30 A Figura 27 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 7H1 com a seqüência de aminoácido V_K L6 (SEQ ID No.105) da linha germinal humana;

35 A Figura 28 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 11E6 com a seqüência de aminoácido V_K A27 (SEQ ID No.107) da linha germinal humana;

A Figura 29 mostra o alinhamento da seqüência de

aminoácido da região variável de cadeia leve de 11E6a (SEQ ID NO:109) com a seqüência de aminoácido V_K A27 (SEQ ID No.107) da linha germinal humana;

5 A Figura 30 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 12B7 com a seqüência de aminoácido V_K L6 (SEQ ID No.105) da linha germinal humana;

A Figura 31 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 13G4 com 10 a seqüência de aminoácido V_K L18 (SEQ ID No.108) da linha germinal humana;

As Figuras 32A-C mostraram os resultados dos experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5 e 12A4 dirigidos contra 15 PD-L1 humano, ligam-se à superfície celular de células CHO transfectadas com PD-L1 humano de extensão completa.

(A) Gráfico de citometria de fluxo para 3G10 (B) Gráfico de citometria de fluxo para 10A5 (C) Gráfico de citometria de fluxo para 12A4;

20 A Figura 33 mostra os resultados de experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5 e 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano ligam-se à superfície celular de células CHO transfectadas com PD-L1 humano de extensão completa numa 25 forma dependente de concentração;

A Figura 34 mostra os resultados de experimentos ELISA demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5 e 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, ligam-se à proteína de fusão PD-L1-Fc;

30 A Figura 35 mostra os resultados de experimentos demonstrando a titulação de HuMaB em células T CD4+ humanas estimuladas;

A Figura 36 mostra os resultados de experimentos demonstrando a titulação de HuMaB em PBMC cinomolgo 35 estimulado;

As Figuras 37A-C mostram os resultados de experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos

monoclonais humanos 3G10, 10A5 e 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, liga-se a PD-L1 sobre a superfície celular de células T ativadas. (A) gráfico de Citometria de Fluxo para 3G10 (B) gráfico de Citometria de Fluxo para 10A5
5 (C) gráfico de Citometria de Fluxo para 12A4;
A Figura 38 demonstra a ligação de HuMabs a células ES-2. As Figuras 39A-D mostram os resultados de experimentos demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos contra PD-L1 humano promovem a proliferação de célula T,
10 secreção de IFN- γ e secreção de IL-2 num ensaio de reação linfocitária mista. A Figura 39A é um gráfico de barras mostrando a proliferação de células T dependente de concentração utilizando HuMAb 10A5; A Figura 39B é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN- γ
15 dependente de concentração utilizando HuMAb 10A5; A Figura 39C é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN- γ utilizando HuMabs 3G10 e 12A4; a Figura 39D é um gráfico de barras mostrando a secreção de IL-2 dependente de concentração utilizando HuMAb 10A5;
20 A Figura 40 demonstra o efeito do anticorpo anti-PD-L1 humano sobre a proliferação e secreção de IFN- γ na MLR utilizando células dendríticas alogeneicas e células T (células T efetoras CD4+) e células dendríticas;
As Figuras 41A-B mostram os resultados de experimentos
25 demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos contra PD-L1 humano promovem a proliferação de célula T e a secreção de IFN- γ na MLR contendo células T reguladoras. A Figura 41A é um gráfico de barras mostrando a proliferação de célula T dependente de concentração
30 utilizando HuMAb 10A5; A Figura 41B é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN- γ dependente de concentração utilizando HuMAb 10A5;
A Figura 42 demonstra os resultados de anticorpos anti-PD-L1 sobre a proliferação celular numa Reação
35 Linfocitária Mista na presença de células T reguladoras;
A Figura 43 demonstra os resultados de anticorpos anti-PD-L1 sobre a produção de citocinas numa Reação

Linfocitária Mista na presença de células T reguladoras; A Figura 44 demonstra os resultados de anticorpos anti-PD-L1 sobre a secreção de PBMC IFN- γ humano estimulado por lisado de CMV;

- 5 A Figura 45 mostra os resultados de experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos contra PD-L1 humano bloqueiam a ligação de PD-L1 a células CHO transfectadas expressando PD-L1;
- 10 A Figura 46 mostra que os anticorpos anti-PD-L1 bloqueiam a ligação de PD-1 a células ES-2 tratadas com IFN- γ ; e A Figura 47 mostra o efeito de anticorpos anti-PD-L1 sobre o crescimento tumoral *in vivo*.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 Em um aspecto, a presente descrição refere-se a anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos que ligam-se especificamente a PD-L1. Em certas concretizações, os anticorpos da invenção exibem uma ou mais das propriedades funcionais 20 desejáveis, tais como ligação de alta afinidade a PD-L1, a capacidade de aumentar a proliferação de célula T, secreção de IFN- γ e/ou IL-2 em reações linfocitárias mistas, a capacidade de inibir a ligação de PD-L1 ao receptor PD-1, a capacidade de estimular respostas a 25 anticorpo e/ou a capacidade de reverter a função supressora de células T reguladoras. Adicionalmente ou alternativamente, os anticorpos da invenção são derivados de seqüências de linha germinal de cadeia pesada e leve específicas e/ou compreendem características estruturais 30 específicas tais como regiões CDR compreendendo seqüências de aminoácido específicas.

A presente descrição provê, por exemplo, anticorpos isolados, métodos para preparar tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas compreendendo 35 tais anticorpos e composições farmacêuticas contendo os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção.

Em outro aspecto, a descrição refere-se a métodos para inibir o crescimento de células tumorais num indivíduo utilizando anticorpos anti-PD-L1. A invenção também refere-se a métodos para utilizar os anticorpos para modificar uma resposta imune, bem como para tratar doenças tais como câncer ou doença infecciosa, ou para estimular uma resposta autoimune protetora ou para estimular respostas imunes antígeno-específicas (ex: através de coadministração de anti-PD-L1 com um antígeno de interesse).

Para que a presente descrição possa ser prontamente compreendida, serão primeiramente definidos certos termos. Definições adicionais são citadas em toda a descrição detalhada.

O termo "resposta imune" refere-se à ação, por exemplo, de linfócitos, células apresentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulócitos, e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta em dano seletivo a, destruição ou eliminação de patógenos invasores do corpo humano, células ou tecidos infectados com patógenos, células cancerosas, ou, em casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

Uma "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção de uma célula. Conforme aqui utilizado, a expressão "receptor de superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão de tal sinal através da membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor de superfície celular" da presente invenção é o receptor PD-L1.

O termo "anticorpo", conforme aqui citado, inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento ligante ao

antígeno (ou seja, "porção ligante ao antígeno") ou cadeias simples dos mesmos. Um "anticorpo" refere-se a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo. Cada cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada compreende três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve compreende um único domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e de quatro FRs, dispostas de terminal amino para terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias leves e pesadas contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo diversas células do sistema imune (ex: células efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

O termo "porção ligante ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), conforme aqui utilizado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que mantém a capacidade de ligar-se especificamente a um antígeno (ex: PD-L1). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada através de fragmentos de um anticorpo de extensão completa. Exemplos de fragmentos ligantes abrangidos pelo termo "porção ligante ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab,

um fragmento monovalente consistindo dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobra ("hinge");

5 (iii) um fragmento Fd consistindo dos domínios V_H e C_H ; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de um domínio V_H ; (vi) um região determinante de complementaridade isolada (CDR). Além disso, embora os

10 dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos utilizando métodos recombinantes, através de um ligante sintético que permite que sejam preparados como uma cadeia de

15 proteína simples na qual as regiões V_L e V_H emparelham-se para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia simples Fv (scFv); vide, por exemplo, Bird et al(1988) Science 242:423-426; e Huston et al.(1988) Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883). Tais anticorpos de

20 cadeia simples também pretendem ser abrangidos pelo termo "porção ligante ao antígeno" de um anticorpo. Esses fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando-se técnicas convencionais conhecidas pelos habilitados na técnica, e os fragmentos são identificados quanto à

25 utilidade da mesma forma que os anticorpos intactos.

Um "anticorpo isolado", conforme aqui utilizado, pretende se referir a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo especificidades antigênicas diferentes (ex: um anticorpo isolado que especificamente

30 liga-se a PD-L1 é substancialmente livre de anticorpos que ligam-se especificamente a抗ígenos que não o PD-L1). Um anticorpo isolado que liga-se especificamente a PD-L1 pode, porém, ter reatividade cruzada a outros抗ígenos, tais como moléculas de PD-L1 de outras

35 espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou substâncias químicas.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" conforme aqui utilizados, referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular simples. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma especificidade de ligação simples e afinidade por um epítopo específico.

O termo "anticorpo humano", conforme aqui utilizado, pretende incluir anticorpos que possuem regiões variáveis nas quais tanto as regiões estruturais como as regiões CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Além disso, se o anticorpo tiver uma região constante, a região constante também é derivada de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos aminoácido não codificados por seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana (ex: mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específicas *in vitro* ou através de mutação somática *in vivo*). Porém, o termo "anticorpo humano", conforme aqui utilizado, não pretende incluir anticorpos nos quais as seqüências CDR derivadas da linha germinal de outras espécies mamíferas, tal como um camundongo, foram enxertadas em seqüências estruturais humanas.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos que exibem uma especificidade de ligação simples que possuem regiões variáveis nas quais tanto as regiões estruturais como as regiões CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Em uma concretização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não-humano transgênico, como por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene humano de cadeia pesada e um transgene de cadeia leve humano fundido com uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo recombinante humano", conforme aqui utilizado, inclui todos os anticorpos humanos que são

preparados, expressados, criados ou isolados através de meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (ex: um camundongo), que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou 5 um hibridoma preparado com o mesmo (descrito abaixo), (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o antícorpo humano, como por exemplo, de um transfecoma, (c) anticorpos isolados de um banco de antícorpo humano combinatorial recombinante, e (d) 10 anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados através de quaisquer outros meios que envolvem alinhamento de seqüências gênicas de imunoglobulina humana com outras seqüências de DNA. Tais anticorpos recombinantes humanos possuem regiões variáveis nas quais 15 as regiões estruturais e CDR são derivadas de seqüências de imunoglobulina de linha germinal humana. Em certas concretizações, porém, tais anticorpos recombinantes humanos podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou quando for utilizado um animal transgênico para 20 seqüências Ig humana, mutagênese somática *in vivo*) e assim as seqüências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas de e relacionadas com seqüências V_H e V_L de linha germinal humana, não podem existir naturalmente no 25 repertório de linha germinal de anticorpo humano *in vivo*. Conforme aqui utilizado, "isótipo" refere-se à classe de anticorpo (ex: IgM ou IgG1) que é codificada pelos genes da região constante de cadeia pesada.

As expressões "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e 30 "um anticorpo específico para um antígeno" são utilizadas reciprocamente na presente invenção com o termo "um anticorpo que liga-se especificamente a um antígeno". O termo "derivados de anticorpo humano" refere-se a qualquer forma modificada do anticorpo humano, como por 35 exemplo, um conjugado do anticorpo e outro agente ou anticorpo.

O termo "anticorpo humanizado" pretende referir-se a

anticorpos nos quais as seqüências CDR derivadas da linha germinal de outra espécie mamífera, tal como um camundongo, foram enxertadas em seqüências estruturais humanas. Modificações adicionais da região estrutural 5 podem ser feitas nas seqüências estruturais humanas.

O termo "anticorpo quimérico" pretende se referir a anticorpos nos quais as seqüências de região variável são derivadas de uma espécie e as seqüências de região constante são derivadas de outra espécie, tal como um 10 anticorpo no qual as seqüências de região variável são derivadas de um anticorpo de camundongo e as seqüências de região constante são derivadas de um anticorpo humano. Conforme aqui utilizado, um anticorpo que "liga-se 15 especificamente a PD-L1 humano" pretende referir-se a um anticorpo que liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos, mais preferivelmente $5 \times 10^{-8} M$ ou menos, mais preferivelmente $1 \times 10^{-8} M$ ou menos, ainda mais preferivelmente entre $5 \times 10^{-9} M$ ou menos, ainda mais preferivelmente entre $1 \times 10^{-8} M$ e $1 \times 10^{-10} M$ ou menos.

20 O termo " K_{assoc} " OU " K_a ", conforme aqui utilizado, pretende se referir à taxa de associação de uma interação anticorpo-antígeno específica, ao passo que o termo " K_{dis} " ou " K_d " conforme aqui utilizado, pretende se referir à taxa de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno 25 específica. O termo " K_D " conforme aqui utilizado, pretende se referir à constante de dissociação, que é obtida da relação de K_D para K_a (ou seja, K_D/K_a) e é expressada como uma concentração molar (M). Valores K_D para anticorpos podem ser determinados utilizando-se 30 métodos estabelecidos no estado da técnica. Um método preferido para determinar o K_D de um anticorpo consiste em utilizar ressonância de plásmon de superfície, preferivelmente utilizar um sistema biosensor tal como um sistema Biacore®.

35 Conforme aqui utilizado, o termo "alta afinidade" por um anticorpo IgG refere-se a um anticorpo com um K_D de $10^{-8} M$ ou menos, mais preferivelmente $10^{-9} M$ ou menos e ainda

mais preferivelmente $10^{-10}M$ ou menos para um antígeno alvo. Porém, a ligação de "alta afinidade" pode variar para outros isótipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "alta afinidade" por um isótipo IgM refere-se a um anticorpo com um K_D de $10^{-7}M$ ou menos, mais preferivelmente $10^{-8}M$ ou menos, ainda mais preferivelmente $10^{-9}M$ ou menos.

Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" inclui qualquer animal humano ou não-humano. O termo "animal não-humano" inclui todos os vertebrados, como por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não-humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, frangos, anfíbios, répteis, etc.

Diversos aspectos do relatório são descritos em maiores detalhes nas subseções seguintes.

Anticorpos Anti-PD-L1

Os anticorpos da invenção são caracterizados por características ou propriedades funcionais específicas dos anticorpos. Por exemplo, os anticorpos ligam-se especificamente a PD-L1 humano. Preferivelmente, um anticorpo da invenção liga-se a PD-L1 com alta afinidade, por exemplo, com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos. Os anticorpos anti-PD-L1 da invenção preferivelmente exibem uma ou mais das seguintes características:

- 25 (a) liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7}M$ ou menos;
- (b) aumenta a proliferação de célula T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (c) aumenta a produção de interferon- γ num ensaio MLR;
- (d) aumenta a secreção de IL-2 num ensaio MLR;
- 30 (e) estimula as respostas ao anticorpo; e/ou
- (f) reverte o efeito de células T reguladoras sobre células T efetoras e/ou células dendríticas.

Preferivelmente, o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $5 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-8}M$ ou menos, liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $5 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $4 \times 10^{-9}M$ ou menos, liga-se a PD-L1 humano com um K_D de 2

x 10⁻⁹M ou menos ou liga-se a PD-L1 humano com um K_D de entre 1 x 10⁻⁹M e 1 x 10⁻¹⁰ M.

Ensaios padrão para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos a PD-L1 são conhecidos no estado da técnica, 5 incluindo, por exemplo, ELISAs, Western Blots e RIAs. Ensaios apropriados são descritos em detalhes nos Exemplos. A cinética de ligação (ex: afinidade de ligação) dos anticorpos também pode ser avaliada através de ensaios padrão conhecidos no estado da técnica, tal 10 como a análise Biacore®.

Anticorpos Monoclonais 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4.

Anticorpos preferidos da invenção são os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 15 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4, isolados e estruturalmente caracterizados conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. As seqüências de aminoácido V_H de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, respectivamente. 20 As seqüências de aminoácido V_L de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20, respectivamente.

Dado que cada um desses anticorpos podem ligar-se a PD-L1, as seqüências V_H e V_L podem ser "mistas e combinadas" 25 para criar outras moléculas de ligação a anti-PD-L1 da invenção. A ligação a PD-L1 de tais anticorpos "mistos e combinados" pode ser testada utilizando-se os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (ex: ELISAs). 30 Preferivelmente, quando as cadeias V_H e V_L são mistas e combinadas, uma seqüência V_H de um emparelhamento V_H/V_L específico é substituída por uma seqüência V_H de estrutura similar. Da mesma forma, preferivelmente uma seqüência V_L de um emparelhamento V_H/V_L específico é 35 substituída por uma seqüência V_L de estrutura similar. Conseqüentemente, num aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao

antígeno do mesmo compreendendo:

- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 5 10; e
- (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1, 10 preferivelmente PD-L1 humano. Combinações preferidas de cadeia pesada e leve incluem:
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de 15 aminoácido de SEQ ID NO:11; ou
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:2, e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:12; ou
- 20 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:3; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13; ou
- 25 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:4; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:14; ou
- 30 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:5; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:15; ou
- 35 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:16; ou
- (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7 e (b) uma região

variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:17; ou

5 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:8; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:18.

10 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:9; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:19.

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:10; e (b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:20.

15 Em outro aspecto, a invenção provê anticorpos que compreendem a cadeia pesada e a cadeia leve CDR1s, CDR2s e CDR3s de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 ou suas combinações. As seqüências de aminoácido de CDR1s V_H de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 20 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, respectivamente. As seqüências de aminoácido das CDR2s V_H de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 25 36, 37, 38, 39 e 40, respectivamente. As seqüências de aminoácido de CDR3s V_H de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, respectivamente. As seqüências de aminoácido das CDR1s V_K 30 de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60, respectivamente. As seqüências de aminoácido de CDR2s V_K de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70, respectivamente. As seqüências de aminoácido das CDR3s V_K de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e

13G4 são mostradas nas SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80, respectivamente. As regiões CDR são delineadas utilizando o sistema Kabat (Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Dado que cada um desses anticorpos podem ligar-se a PD-L1 e que a especificidade de ligação a antígeno é provida principalmente pelas regiões CDR1, CDR2 e CDR3, as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_H e as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_K podem ser "misturadas e combinadas" (ou seja, as CDRs de anticorpos diferentes podem ser misturadas e combinadas, embora cada antícorpo deva conter uma CDR1, CDR2 e CDR3 V_H e uma CDR1, CDR2 e CDR3 V_K) para criar outras moléculas ligantes ao anti-PD-L1 da invenção. A ligação a PD-L1 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada utilizando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (ex: ELISAs, análise Biacore®). Preferivelmente, quando as seqüências CDR V_H são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_H específica é substituída por uma seqüência(s) CDR de estrutura similar. Da mesma forma, quando seqüências CDR V_K são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_K específica é preferivelmente substituída por uma seqüência (s) CDR de estrutura similar. Será evidente para o habilitado na técnica que seqüências V_H e V_L novas podem ser criadas substituindo-se uma ou mais seqüências da região CDR V_H e/ou V_L por seqüências de estrutura similar das seqüências CDR aqui descritas para os anticorpos monoclonais 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada

compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30;

5 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40;

10 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50;

15 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60;

20 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70; e

25 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1,
25 preferivelmente PD-L1 humano.

Numa concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 21;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
30 compreendendo SEQ ID NO: 31;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 41;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 51;

35 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 61; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 71.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 22;

5 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 32;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 42;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
10 compreendendo SEQ ID NO: 52;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 62; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 72.

15 Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 23;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 33;

20 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 43;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 53;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
25 compreendendo SEQ ID NO: 63; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 73.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
30 compreendendo SEQ ID NO: 24;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 34;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 44;

35 (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 54;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 64; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 74.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

5 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 25;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 35;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
10 compreendendo SEQ ID NO: 45;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 55;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 65; e

15 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 75.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 26;

20 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 36;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 46;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
25 compreendendo SEQ ID NO: 56;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 66; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 76.

30 Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 27;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 37;

35 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 47;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 57;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 67; e

5 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 77.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 28;

10 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 38;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 48;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 58;

15 (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 68; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 78.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

20 (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 29;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 39;

25 (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 49;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 59;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 69; e

30 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 79.

Em outra concretização preferida, o anticorpo comprehende:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 30;

35 (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 40;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 50;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 60;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 70; e

5 (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve
compreendendo SEQ ID NO: 80.

É bastante conhecido no estado da técnica que o domínio
CDR3, independentemente do(s) domínio(s) CDR1 e/ou CDR2,
10 isoladamente pode determinar a especificidade de ligação
de um anticorpo por um antígeno cognato e que anticorpos
múltiplos podem previsivelmente ser gerados tendo a mesma
especificidade de ligação baseada numa seqüência CDR3
comum. Vide, por exemplo, Klimka et al., British J. of
15 Cancer 83(2):252-260 (2000) (descrevendo a produção de um
anticorpo anti-CD30 humanizado utilizando apenas o
domínio variável de cadeia pesada CDR3 de anticorpo anti-
CD30 murino Ki-4); Beiboer et al., J.Mol.Biol. 296:833-849
(2000) (descrevendo anticorpos de glicoproteína-2
20 epitelial recombinante (EGP-2) utilizando apenas a
seqüência CDR3 de cadeia pesada do anticorpo anti-EGP-2
MOC-31 murino parental); Rader et al.,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 95:8910-8915 (1998) (descrevendo
um painel de anticorpos $\alpha\beta 3$ anti-integrina humanizados
25 utilizando um domínio CDR3 variável de cadeia leve e
pesada de um anticorpo LM609 $\alpha\beta 3$ anti-integrina murino,
sendo que cada anticorpo membro comprehende uma seqüência
distinta fora do domínio CDR3 e capaz de ligar o mesmo
epítopo como o anticorpo murino parental com afinidades
30 tão altas ou mais altas que o anticorpo murino parental);
Barbas et al., J.Am.Chem.Soc. 116:2161-2162 (1994)
(revelando que o domínio CDR3 provê a contribuição mais
significativa para ligação ao antígeno); Barbas et al.,
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92:2529-2533 (1995)
35 (descrevendo o enxerto de seqüências CDR3 de cadeia
pesada de três Fabs (SI-1, SI-40 e SI-32) contra DNA
placentário humano sobre a cadeia pesada de um Fab

toxóide anti-tetânico, substituindo assim a CDR3 de cadeia pesada existente e demonstrando que o domínio CDR3 isoladamente conferiu a especificidade de ligação); e Ditzel et al., J.Immunol., 157-739-749 (1996) 5 (descrevendo estudos de enxerto em que a transferência apenas de CDR3 de cadeia pesada de um Fab LNA3 poliespecífico parental para uma cadeia pesada de um anticorpo Fab p313 ligante ao toxóide tetânico IgG monoespecífico foi suficiente para reter a especificidade de ligação do Fab parental). Cada uma dessas referências é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Conseqüentemente, em certos aspectos, a presente invenção provê anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo 10 não-humano, tal como anticorpo de camundongo ou de rato, sendo que o anticorpo monoclonal é capaz de ligar-se especificamente a PD-L1. Em algumas concretizações, tais anticorpos inventivos compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo não- 15 humano (a) são capazes de competir para ligação com; (b) mantém as características funcionais; (c) ligam-se ao mesmo epítopo; e/ou (d) possuem uma afinidade de ligação similar à do anticorpo parental não-humano correspondente. 20 Em outros aspectos, a presente invenção provê anticorpos monoclonais compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve de um primeiro anticorpo humano, tal como, por exemplo, um anticorpo humano obtido de um animal não-humano, sendo que o primeiro anticorpo humano 25 é capaz de ligar-se especificamente a PD-L1 e sendo que o domínio CDR3 do primeiro anticorpo humano substitui um domínio CDR3 num anticorpo humano no qual falta especificidade de ligação para PD-L1 para gerar um segundo anticorpo humano que seja capaz de ligar-se 30 especificamente a PD-L1. Em algumas concretizações, os anticorpos da presente descrição compreendendo um ou mais domínios CDR3 de cadeia pesada e/ou leve do primeiro 35

anticorpo humano (a) são capazes de competir para ligar-se com; (b) mantém as características funcionais; (c) ligam-se ao mesmo epítopo; e/ou (d) possuem uma afinidade de ligação similar à do primeiro anticorpo humano parental correspondente.

5 Anticorpos com Seqüências de Linha Germinal Específicas
Em certas concretizações, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene de imunoglobulina de cadeia pesada de linha germinal 10 específico e/ou uma região variável de cadeia leve de um gene de imunoglobulina de cadeia leve de linha germinal específico.

Por exemplo, numa concretização preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção 15 ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-18 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de 20 cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-69 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um 25 anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-3 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização 30 preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 3-9 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra 35 concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de

cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L6, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção 5 ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K L15 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, 10 ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto de ou derivada de um gene V_K A27 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, 15 ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve, que é o produto de ou derivada de um gene V_K L18 humano, sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1. Em outra concretização preferida ainda, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao 20 antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo:
(a) compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto de ou derivada de um gene V_H 1-18, 1-69, 1-3 ou 3-9 humano (que codifica as seqüências de aminoácido estabelecidas nas SEQ ID NOS: 101, 102, 103 e 104, respectivamente);
(b) compreende uma região variável de cadeia leve que é o 25 produto de ou derivada de um gene V_K L6, L15, A27 ou L18 (que codifica as seqüências de aminoácido estabelecidas nas SEQ ID NOS: 105, 106, 107 e 108, respectivamente); e
(c) liga-se especificamente a PD-L1, preferivelmente a 30 PD-L1 humano.

Um exemplo de anticorpo tendo V_H e V_K de V_H 1-18 e V_K L6, respectivamente é o 3H10. Exemplos de anticorpos tendo V_H 35 e V_K de V_H de 1-69 e V_K L6, respectivamente, 12A4, 1B12, 7H1 e 12B7. Um exemplo de anticorpo tendo V_H e V_K de V_H 1-3 e V_K L15, respectivamente é 10A5. Exemplos de

anticorpos tendo V_H e V_K de V_H 1-69 e V_K A27, respectivamente, são 5F8, 11E6 e 11E6a. Um exemplo de anticorpo tendo V_H e V_K de V_H 3-9 e V_K L15, respectivamente, é o 10H10. Um exemplo de anticorpo tendo 5 V_H e V_K de V_H 1-3 e V_K L15, respectivamente, é o 10A5. Um exemplo de anticorpo tendo V_H e V_K de V_H 3-9 e V_K L18, respectivamente, é o 13G4.

Conforme aqui utilizado, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de linha germinal específica se as regiões variáveis do anticorpo forem obtidas de um sistema que utiliza genes de imunoglobulina de linha germinal humana. Tais sistemas incluem imunizar um camundongo transgênico portando genes 10 de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou identificar um banco de gene de imunoglobulina humana exibido no fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de imunoglobulina de linha germinal humana pode 15 ser identificado como tal comparando-se a seqüência de aminoácido do anticorpo humano com as seqüências de aminoácido de imunoglobulinas de linha germinal humanas e selecionando-se a seqüência de imunoglobulina de linha germinal humana que está mais próxima em seqüência (ou 20 seja, com a maior % de identidade) da seqüência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma seqüência de imunoglobulina de linha germinal humana específica pode conter diferenças 25 de aminoácido se comparada com a seqüência de linha germinal, devido, por exemplo, a mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação sítio-dirigida. Porém, um anticorpo humano selecionado é tipicamente pelo menos 90% idêntico em seqüência de aminoácidos a uma seqüência de aminoácido codificada por 30 um gene de imunoglobulina de linha germinal humana e contém resíduos aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as 35

seqüências de aminoácido de imunoglobulina de linha germinal de outras espécies (ex: seqüências de linha germinal murina). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95%, ou ainda pelo menos 96%, 97%, 5 98%, ou 99% idêntico em seqüência de aminoácido à seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal. Em certas concretizações, um anticorpo humano derivado de uma seqüência de linha germinal humana específica exibirá não 10 mais que 10 diferenças de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal humana. Em certas concretizações, o anticorpo humano pode exibir não mais que 5, ou ainda não 15 mais que 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal.

Anticorpos Homólogos

Em outra concretização ainda, um anticorpo da invenção compreende regiões variáveis de cadeia pesada e leve 20 compreendendo seqüências de aminoácido que são homólogas às seqüências de aminoácido dos anticorpos preferidos aqui descritos, e sendo que os anticorpos mantém as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-PD-L1 da invenção.

25 Por exemplo, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, sendo que:

(a) a região variável de cadeia pesada compreende uma 30 seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10;

(b) a região variável de cadeia leve compreende uma 35 seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19 e 20;

(c) o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos;

5 (d) o anticorpo aumenta a proliferação de células T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);

(e) o anticorpo aumenta a produção de interferon- γ num ensaio MLR;

(f) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 num ensaio MLR,

10 (g) o anticorpo estimula as respostas ao anticorpo; e

(h) reverte o efeito de células T reguladoras sobre as células T efetoras e/ou células dendríticas.

Em outras concretizações, as seqüências de aminoácido V_H e/ou V_L podem ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogas às seqüências acima citadas. Um anticorpo tendo regiões V_H e V_L com alta homologia (ou seja, de 80% ou mais) com as regiões V_H e V_L das seqüências acima citadas, pode ser obtido através de mutagênese (ou seja, mutagênese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico codificando SEQ ID NOS: 25, 26, 27, 28, 29 e 30, seguido de teste do anticorpo codificado alterado quanto à função retida (ou seja, as funções citadas de (c) a (h) acima) utilizando os ensaios funcionais aqui descritos.

25 Conforme aqui utilizada, a homologia percentual entre as seqüências de aminoácido é equivalente à identidade percentual entre as duas seqüências. A identidade percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas 30 seqüências (ou seja, % homologia = # de posições idênticas/total de # de posições x 100), levando em consideração o número de espaços ("gaps") e a extensão de cada espaço, que precisam ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas seqüências. A comparação de 35 seqüências e a determinação da identidade percentual entre as duas seqüências pode ser realizada utilizando-se um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos

não restritivos abaixo.

A identidade percentual entre as duas seqüências de aminoácido pode ser determinada utilizando-se o algoritmo de E.Meyers e W.Miller (Comput. Appl.Biosci.4:11-17(1988)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) utilizando a tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de extensão de espaço de 12 e uma penalidade por inserção de espaço de 4. Além disso, a identidade percentual entre as duas seqüências de aminoácido pode ser determinada utilizando-se o algoritmo de Needleman e Wunsch (J.Mol.Biol.48:444-453 (1970)) que foi incorporado ao programa GAP no pacote de software CGC (disponível em www.gcg.com), utilizando ou uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso de espaço de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de extensão de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

Em certos casos, as seqüências de proteína da presente descrição podem ser ainda utilizadas como "seqüência de pesquisa/consulta ("query")" para realizar uma busca em bancos de dados públicos para, por exemplo, identificar seqüências relacionadas. Tais buscas podem ser efetuadas utilizando-se o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al.(1990) J.Mol.Biol.215:403-10. As buscas BLAST de proteína podem ser efetuadas com o programa XBLAST, escore=50, extensão de palavra=3 para obter seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de anticorpo da invenção. Para obter alinhamentos com espaço para fins de comparação, o "Gapped BLAST" pode ser utilizado conforme descrito em Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e "Gapped BLAST", podem ser utilizados os parâmetros de valor padrão dos respectivos programas (ex: XBLAST e NBLAST). Vide www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticorpos com Modificações Conservativas

Em certas concretizações, um anticorpo da invenção 35 comprehende uma região variável de cadeia pesada comprendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve comprendendo seqüências CDR1,

CDR2 e CDR3, sendo que uma ou mais dessas seqüências CDR compreendem seqüências de aminoácido especificadas com base nos anticorpos preferidos aqui descritos (ex: 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4) ou suas modificações conservativas, e sendo que os anticorpos mantém as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-PD-L1 da invenção. Conseqüentemente, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

(a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, e suas modificações conservativas;

(b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüência de aminoácido de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 79 e 80 e suas modificações conservativas;

(c) o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos;

(d) o anticorpo aumenta a proliferação de célula T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);

(e) o anticorpo aumenta a produção de interferon- γ num ensaio MLR;

(f) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 num ensaio MLR;

(g) o anticorpo estimula as respostas ao anticorpo; e

(h) reverte o efeito de células T reguladoras sobre células T efetoras e/ou células dendríticas.

Numa concretização preferida, a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,

38, 39 e 40 e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70 e suas modificações conservativas. Em outra concretização preferida, a seqüência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 e suas modificações conservativas.

Conforme aqui utilizado, o termo "modificações conservativas de seqüência" pretende se referir a modificações de aminoácido que não afetam nem alteram significativamente as características de ligação do anticorpo contendo a seqüência de aminoácido. Tais modificações conservativas incluem substituições, adições e deleções de aminoácido. As modificações podem ser introduzidas num anticorpo da invenção através de técnicas padrão conhecidas no estado da técnica, tais como mutagênese sítio-dirigida e mutagênese mediada por PCR. Substituições conservativas de aminoácido são aquelas em que o resíduo aminoácido é substituído por um resíduo aminoácido que possui uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos aminoácido com cadeias laterais similares foram definidas no estado da técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (ex: lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (ex: ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (ex: glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não-polares (ex: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina,

metionina), cadeias laterais com ramificação beta (ex: treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (ex: tirosina, fenilalanina, triptofato, histidina). Assim, um ou mais resíduos aminoácido dentro das regiões CDR de um anticorpo da invenção podem ser substituídos por outros resíduos aminoácido da mesma família de cadeia lateral e o anticorpo alterado pode ser testado quanto à função retida (ou seja, a função estabelecida de (c) a (h) acima) utilizando os ensaios funcionais aqui descritos.

Anticorpos que Ligam-se ao mesmo Epítopo como Anticorpos Anti-PD-L1 da Invenção

Em outra concretização, a invenção provê anticorpos que ligam-se ao mesmo epítopo em PD-L1 humano como qualquer um dos anticorpos monoclonais PD-L1 da invenção (ou seja, anticorpos que possuem a capacidade de fazer competição cruzada para ligar-se a PD-L1 com qualquer um dos anticorpos monoclonais da invenção). Em concretizações preferidas, o anticorpo de referência para estudos de competição cruzada pode ser o anticorpo monoclonal 3G10 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 1 e 11, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 12A4 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 2 e 12, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 10A5 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 3 e 13, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 10A5 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 3 e 13, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 5F8 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 4 e 14, respectivamente) ou o anticorpo monoclonal 10H10 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 5 e 15, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 1B12 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 6 e 16, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 7H1 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS: 7 e 17, respectivamente), ou o

anticorpo monoclonal 11E6 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS 8 e 18, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 12B7 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado em SEQ ID NOS 9 e 19, respectivamente) ou o anticorpo monoclonal 13G4 (tendo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOS 10 e 20, respectivamente). Tais anticorpos de competição cruzada podem ser identificados com base em sua capacidade de fazer competição cruzada com 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4 em ensaios padrão de ligação a PD-L1. Por exemplo, a análise BIACore®, ensaios ELISA ou a citometria de fluxo podem ser usados para demonstrar a competição cruzada com os anticorpos da presente invenção. A capacidade de um anticorpo de teste inibir a ligação, por exemplo, de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4 a PD-L1 humano demonstra que o anticorpo de teste pode competir com 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4 para ligar-se a PD-L1 humano e assim liga-se ao mesmo epítopo em PD-L1 humano como 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4. Numa concretização preferida, o anticorpo que liga-se ao mesmo epítopo em PD-L1 humano como 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4 é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados conforme descrito nos Exemplos.

Anticorpos Construídos e Modificados

Um anticorpo da invenção pode ser ainda preparado utilizando-se um anticorpo que possua uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_L aqui descritas pode ser usado como material de partida para construir um anticorpo modificado que pode ter propriedades alteradas em relação ao anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser construído modificando-se um ou mais resíduos dentro de uma ou de ambas as regiões variáveis(ou seja, V_H e/ou V_L), por exemplo, dentro de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de

uma ou mais regiões estruturais. Adicionalmente, ou alternativamente, um anticorpo pode ser construído modificando-se resíduos dentro da região(s) constante(s), por exemplo, para alterar a função(ões) efetoras do anticorpo.

Outro tipo de construção em região variável que pode ser realizado é o enxerto em CDR. Os anticorpos interagem com os抗ígenos alvo predominantemente através de resíduos aminoácido que estão localizados nas seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada e leve. Por essa razão, as seqüências de aminoácido dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que as seqüências fora das CDRs. Uma vez que as seqüências de CDR são responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitem as propriedades de anticorpos específicos de ocorrência natural construindo-se vetores de expressão que incluem seqüências CDR do anticorpo específico de ocorrência natural enxertado nas seqüências estruturais de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. vide U.S.A. 86:10029-10033; Patente americana 5.225.539 a Winter, e patentes americanas Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 a Queen et al.).

Conseqüentemente, outra concretização refere-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou a uma porção ligante ao抗ígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que compreende seqüências CDR1, CDR2, e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40, e SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, e 50, respectivamente, e uma região variável de cadeia leve compreendendo seqüências

CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma seqüência de aminoácido do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60, SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70, e SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80, respectivamente. Assim, tais anticorpos contém as seqüências CDR V_H e V_L de anticorpos monoclonais 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 ou 13G4, podendo ainda conter seqüências estruturais diferentes desses anticorpos.

10 Tais seqüências estruturais podem ser obtidas de bancos de dados públicos de DNA ou de referências publicadas que incluem seqüências gênicas de anticorpo de linha germinal. Por exemplo, as seqüências de DNA de linha germinal para genes humanos da região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas no banco de dados de seqüência de linha germinal humana "VBase" (disponível na internet no www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), bem como em Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J.Mol.Biol.227:776-798; e Cox, J.P.L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H segments Reveals a Strong Bias in Their Usage" Eur.J.Immunol.24:827-836; cujo conteúdo de cada um foi aqui expressamente incorporado por referência.

As seqüências de proteína de anticorpo são comparadas contra um banco de dados compilado de seqüência de proteínas utilizando um dos métodos de busca por similaridade de seqüência denominado Gapped BLAST (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402) que é bastante conhecido no estado da técnica.

35 BLAST é um algoritmo heurístico em que um alinhamento estatisticamente significativo entre a seqüência do anticorpo e a seqüência do banco de dados provavelmente

contém pares de segmentos de alta classificação (HSP) de palavras alinhadas. Os pares de segmentos cujas pontuações não podem ser melhoradas por extensão ou adaptação são denominados "hit" (resultado).

- 5 Resumidamente, as seqüências de nucleotídeos de origem VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) são traduzidas e a região entre e incluindo a região estrutural de FR1 a FR3 fica retida. As seqüências de banco de dados possuem uma extensão média de 98 resíduos.
- 10 Seqüências em duplicata que são combinações exatas por toda a extensão da proteína são removidas. Uma busca BLAST por proteínas utilizando o programa blastp com valor padrão, parâmetros padrão com exceção do filtro de baixa complexidade que é desativado, e a matriz de substituição de BLOSUM62, filtra as combinações de seqüência produzindo os 5 primeiros resultados ("hits").
- 15 As seqüências de nucleotídeo são traduzidas em todas as seis estruturas e a estrutura sem códons de parada no segmento combinante da seqüência do banco de dados é considerada o resultado ("hit") em potencial. Isso é confirmado utilizando o programa tblastx BLAST que traduz a seqüência de anticorpo em todas as seis estruturas e compara essas traduções com as seqüências de nucleotídeos VBASE dinamicamente traduzidas em todas as seis estruturas.

- 20 As identidades são pares exatos de aminoácido entre a seqüência de anticorpo e o banco de dados de proteína por toda a extensão da seqüência. Os positivos (identidades + par de substituição) não são idênticos mas sim substituições de aminoácido orientadas pela matriz de substituição BLOSUM62. Se a seqüência de anticorpo combinar duas das seqüências do banco de dados com a mesma identidade, o resultado com mais positivos seria decidido como o resultado de seqüência combinante.
- 25 Seqüências estruturais preferidas para uso nos anticorpos da invenção são estruturalmente similares às seqüências estruturais utilizadas por anticorpos selecionados da

invenção, como por exemplo, similares às seqüências estruturais V_H 1-18 (SEQ ID NO:101) e/ou as seqüências estruturais V_H 1-69 (SEQ ID NO:102) e/ou as seqüências estruturais V_H 1-3 (SEQ ID NO:103) e/ou as seqüências estruturais V_H 3-9 (SEQ ID NO:104) e/ou as seqüências estruturais V_K L6 (SEQ ID NO:105), e/ou as seqüências estruturais V_K L15 (SEQ ID NO:106), e/ou as seqüências estruturais V_K A27 (SEQ ID NO:107), e/ou as seqüências estruturais V_K L18 (SEQ ID NO:107) utilizadas por anticorpos monoclonais preferidos da invenção. As seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_H e as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 V_K podem ser enxertadas em regiões estruturais que possuam a seqüência idêntica à encontrada no gene de imunoglobulina de linha germinal do qual deriva a seqüência estrutural, ou as seqüências de CDR podem ser enxertadas em regiões estruturais que contenham uma ou mais mutações se comparadas com as seqüências de linha germinal. Por exemplo, descobriu-se que em certos casos, é benéfico mutar resíduos dentro das regiões estruturais para manter ou aumentar a capacidade de ligação do anticorpo ao antígeno (vide, por exemplo, as patentes americanas 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen et al.).

Outro tipo de modificação na região variável consiste em mutar resíduos aminoácido dentro das regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 V_H e/ou V_K para assim melhorar uma ou mais das propriedades de ligação (ex: afinidade) do anticorpo de interesse. A mutagênese sítio-dirigida ou a mutagênese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a(s) mutação(ões) e o efeito sobre a ligação ao anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliado em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, conforme aqui descrito e fornecido nos Exemplos. São introduzidas modificações conservativas preferidas (conforme discutido acima). As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácido, porém, são preferivelmente substituições. Além disso, tipicamente são alterados não

mais que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos dentro de uma região CDR.

Conseqüentemente, em outra concretização, a invenção provê anticorpos monoclonais anti-PD-L1 isolados, ou porções ligantes ao antígeno dos mesmos, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo: (a) uma região CDR1 V_H compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com as SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 24, 26, 27, 28, 29 e 30; (b) uma região CDR2 V_H compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40, ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com as SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40; (c) uma região CDR3 V_H compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, e 50, ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido se comparada com SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50; (d) uma região CDR1 V_K compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60, ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido se comparada com SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60; (e) uma região CDR2 V_K compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70 ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70; e (f) uma região

CDR3 V_K compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80, ou uma seqüência de aminoácido tendo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições, deleções ou adições de aminoácido, se comparada com SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80.

Anticorpos construídos da invenção incluem aqueles cujas modificações foram efetuadas em resíduos estruturais em V_H e/ou V_K, como por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente, tais modificações estruturais são feitas para reduzir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, um método consiste em fazer retro-mutação ("backmutate") em um ou mais resíduos estruturais para a seqüência de linha germinal correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que tiver sido submetido à mutação somática poderá conter resíduos estruturais que diferem da seqüência da linha germinal da qual deriva o anticorpo. Tais resíduos podem ser identificados comparando-se as seqüências estruturais do anticorpo com as seqüências de linha germinal da qual deriva o anticorpo.

Por exemplo, conforme descrito abaixo, diversas alterações de aminoácido nas regiões estruturais dos anticorpos anti-PD-L1 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 que diferem da seqüência de linha germinal parental. Para retornar as seqüências de região estrutural à sua configuração de linha germinal, as mutações somáticas podem ser retro-mutadas ("backmutated") para a seqüência de linha germinal, por exemplo, através de mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR. O alinhamento da região V_H para 3G10 contra a seqüência V_H 1-18 da linha germinal parental é mostrado na Figura 11. O alinhamento da região V_H para 12A4 contra a seqüência V_H 1-69 da linha germinal parental é mostrado na Figura 12. O alinhamento da região V_H para 10A5 contra a seqüência V_H 1-3 da linha germinal

parental é mostrado na Figura 13. O alinhamento da região V_H para 5F8 contra a seqüência V_H 1-69 da linha germinal parental é mostrado na Figura 14. O alinhamento da região V_H para 10H10 contra a seqüência V_H 3-9 da linha germinal parental é mostrado na Figura 15. O alinhamento da região V_H para 1B12 contra a seqüência V_H 1-69 da linha germinal parental é mostrado na Figura 16. O alinhamento da região V_H para 7H1 contra a seqüência V_H 1-69 da linha germinal parental é mostrado na Figura 17. O alinhamento da região V_H para 11E6 contra a seqüência V_H 1-69 da linha germinal parental é mostrado na Figura 18. O alinhamento da região V_H para 12B7 contra a seqüência V_H 1-69 da linha germinal parental é mostrado na Figura 19. O alinhamento da região V_H para 13G4 contra a seqüência V_H 3-9 da linha germinal parental é mostrado na Figura 20.

Por exemplo, para 3G10, o resíduo aminoácido #79 (dentro de FR3) de V_H é uma valina sendo que este resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-18 correspondente é uma alanina. Para retornar as seqüências de região estrutural para à configuração de linha germinal, as mutações somáticas podem ser retro-mutadas ("backmutated") para a seqüência de linha germinal, por exemplo, através de mutagênese sítio-dirigida ou mediada por PCR (ex: resíduo #79(resíduo #13 de FR3) de V_H de 3G10 podem ser retro-mutadas de valina para alanina).

Como outro exemplo, para 12A4, o resíduo aminoácido #24 (dentro de FR1) de V_H é uma treonina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 é uma alanina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #24 do V_H de 12A4 pode ser retro-mutado ("backmutated") de treonina para alanina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 12A4, o resíduo aminoácido #27 (dentro de FR1) de V_H é um ácido aspártico sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 é uma

glicina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #27 de V_H de 12A4 pode ser retro-mutado de ácido aspártico para glicina. Tais anticorpos retro-mutados 5 também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 12A4, o resíduo aminoácido #95 (dentro de FR3) de V_H é uma fenilalanina sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 é uma tirosina. Para retornar as seqüências da região 10 estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #95 (resíduo #29 de FR3) de V_H de 12A4 pode ser retro-mutado de fenilalanina para tirosina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos 15 pela invenção.

Como outro exemplo, para 5F8, o resíduo aminoácido #24 (dentro de FR1) é uma valina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma alanina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o 20 resíduo #24 de V_H de 5F8 pode ser retro-mutado de valina para alanina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 5F8, o resíduo aminoácido #28 (dentro de FR1) é uma isoleucina, sendo que esse resíduo 25 na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma treonina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #28 de V_H de 5F8 pode ser retro-mutado de isoleucina para treonina. Tais anticorpos retro- 30 mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 10H10, o resíduo aminoácido #24 (dentro de FR1) é uma valina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 3-9 correspondente é uma alanina. Para retornar as seqüências da região estrutural 35 à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #24 de V_H de 10H10 pode ser retro-mutado de valina para alanina. Tais anticorpos retro-mutados também

pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 10H10, um aminoácido pode ser inserido após o resíduo aminoácido #97 (dentro de FR3). Esse aminoácido é uma valina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o aminoácido inserido após o resíduo #97 de V_H de 10H10 pode ser retro-mutado para deletar essa valina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

10 Como outro exemplo, para 1B12, o resíduo aminoácido #24 (dentro de FR1) é uma treonina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 é uma alanina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo 15 #24 de V_H de 1B12 pode ser retro-mutado de treonina para alanina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 1B12, o resíduo aminoácido #27 (dentro de FR1) é um ácido aspártico, sendo que esse 20 resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma glicina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #27 de V_H de 1B12 pode ser retro-mutado de ácido aspártico para glicina. Tais 25 anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 1B12, o resíduo aminoácido #95 (dentro de FR3) é uma fenilalanina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 30 correspondente é uma tirosina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #95 (resíduo # 29 de FR3) de V_H de 1B12 pode ser retro-mutado de fenilalanina para tirosina. Tais anticorpos retro-mutados 35 também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 7H1, o resíduo aminoácido #24 (dentro de FR1) é uma treonina, sendo que esse resíduo na

seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma alanina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #24 de V_H de 7H1 pode ser retro-mutado de 5 treonina para alanina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 7H1, o resíduo aminoácido #77 (dentro de FR3) é uma treonina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma 10 serina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #72 (resíduo #11 de FR3) de V_H de 7H1 pode ser retro-mutado de treonina para serina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela 15 invenção.

Como outro exemplo, para 11E6, o resíduo aminoácido #78 (dentro de FR3) é uma alanina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma treonina. Para retornar as seqüências da região 20 estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #78 (resíduo 12 de FR3) de V_H de 11E6 pode ser retro-mutado de alanina para treonina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

25 Como outro exemplo, para 12B7, o resíduo aminoácido #13 (dentro de FR1) é um ácido glutâmico, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma lisina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha 30 germinal, por exemplo, o resíduo #13 de V_H de 12B7 pode ser retro-mutado de ácido glutâmico para lisina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 12B7, o resíduo aminoácido #30 (dentro de FR1) é uma asparagina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma 35 serina. Para retornar as seqüências da região

estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #30 de V_H de 12B7 pode ser retro-mutado de asparagina para serina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

5 Como outro exemplo, para 12B7, o resíduo aminoácido #77 (dentro de FR3) é uma asparagina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma serina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por
10 exemplo, o resíduo #377 (resíduo #11 de FR3) de V_H de 12B7 pode ser retro-mutado de asparagina para serina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

Como outro exemplo, para 12B7, o resíduo aminoácido #82 (dentro de FR3) é um ácido aspártico, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é um ácido glutâmico. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #82 (resíduo #16 de FR3) de V_H de 12B7 pode ser retro-mutado de ácido aspártico para ácido glutâmico. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela invenção.

20 Como outro exemplo, para 13G4, o resíduo aminoácido #27 (dentro de FR1) é uma isoleucina, sendo que esse resíduo na seqüência de linha germinal V_H 1-69 correspondente é uma fenilalanina. Para retornar as seqüências da região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo #27 de V_H de 12B7 pode ser retro-mutado de isoleucina para fenilalanina. Tais anticorpos retro-mutados também pretendem ser abrangidos pela
30 invenção.

Outro tipos de modificação estrutural envolve mutar um ou mais resíduos dentro da região estrutural, ou até mesmo dentro de uma ou mais regiões CDR, para remover os epítocos de célula T para assim reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Esse método é também designado "desimunização" e é descrito em maiores detalhes na

publicação de patente americana No. 20030153043 por Carr et al.

Adicionalmente ou alternativamente às modificações efetuadas dentro das regiões estruturais ou CDR, os 5 anticorpos da invenção podem ser construídos para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como a meia-vida sérica, fixação de complemento, ligação a receptor Fc, e/ou citotoxicidade celular 10 antígeno-dependente. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (ex: uma ou mais porções químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou modificado para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma 15 dessas concretizações é descrita em maiores detalhes abaixo. A numeração dos resíduos na região Fc é a do índice EU de Kabat.

Em uma concretização, a região de dobra de CH1 é modificada de forma tal que o número de resíduos cisteína 20 na região de dobra é alterado, como por exemplo, aumentado ou reduzido. Esse método é descrito mais detalhadamente na patente americana No. 5.677.425 de Bodmer et al. O número de resíduos cisteína na região de dobra de CH1 é alterado, por exemplo, para facilitar a 25 montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou reduzir a estabilidade do anticorpo.

Em outra concretização, a região de dobra Fc de um anticorpo é mutada para reduzir a meia-vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de 30 aminoácido são introduzidas na região interfacial de domínio CH2-CH3 do fragmento de dobra-Fc, até que o anticorpo tenha danificado a ligação da proteína A estafilocócica (SpA) em relação à ligação a SpA de domínio de dobra Fc nativo. Esse método é descrito mais 35 detalhadamente na patente americana No. 6.165.745 de Ward et al.

Em outra concretização, o anticorpo é modificado para

aumentar sua meia-vida biológica. Diversos métodos são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, conforme descrito na patente americana No. 6.277.375 de 5 Ward. Alternativamente, para aumentar a meia-vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou C_L para conter um epítopo ligante ao receptor de resgate tomado de dois laços de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nas patentes americanas Nos. 5.869.046 e 6.121.022, de Presta et al.

Em outras concretizações ainda, a região Fc é alterada substituindo-se pelo menos um resíduo aminoácido por um resíduo aminoácido diferente para alterar a(s) função(ões) efetoras do anticorpo. Por exemplo, um ou 10 mais aminoácidos selecionados de resíduos aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 podem ser substituídos por um resíduo aminoácido diferente, de forma que o anticorpo tenha uma afinidade alterada por um ligante efetor, mas que mantenha a capacidade de ligação ao 15 antígeno do anticorpo parental. O ligante efetor no qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente C1 de complemento. Esse método é descrito com maiores detalhes nas patentes americanas Nos. 5.624.821 e 5.648.260, ambas de Winter et al.

20 Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados de resíduos aminoácido 329, 331 e 322 podem ser substituídos por um resíduo aminoácido diferente, de forma que o anticorpo altere a ligação a C1q e/ou reduza ou anule a citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Esse 25 método é descrito com maiores detalhes na patente americana No. 6.194.551 de Idusogie et al.

Em outro exemplo, um ou mais resíduos aminoácido nas 30 posições de aminoácido 231 e 239 são alterados para assim alterar a capacidade de o anticorpo fixar o complemento.

35 Esse método é descrito na publicação PCT WO 94/29351 de Bodmer et al.

Em outro exemplo ainda, a região Fc é modificada para

aumentar a capacidade de o anticorpo mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo por um receptor Fc γ modificando um ou mais aminoácidos nas seguintes 5 posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 10 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439. Esse método é descrito mais detalhadamente na Publicação PCT WO 00/42072 de Presta. Além disso, os sítios de ligação em IgG1 humana para 15 Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII e FcRn foram mapeados e as variantes com ligação melhorada foram descritas (vide Shields, R.L. et al. (2001) J.Biol.Chem 276:6591-6604). Mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 demonstraram melhorar a ligação a Fc γ RIII. Além disso, os seguintes mutantes de combinação demonstraram 20 melhorar a ligação a Fc γ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e S298A/E333A/K334A.

Em outra concretização, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, pode-se preparar um anticorpo aglicosilado (ou seja, o anticorpo carece de 25 glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo pelo antígeno. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando-se um ou mais sítios de glicosilação dentro da seqüência do anticorpo. Por 30 exemplo, podem ser feitas uma ou mais substituições de aminoácido que resultem em eliminação de um ou mais sítios de glicosilação na estrutura da região variável para assim eliminar a glicosilação naquele sítio. Essa aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo pelo 35 antígeno. Tal método é descrito mais detalhadamente nas patentes americanas Nos. 5.714.350 e 6.350.861 de Co et al.

Em certas outras concretizações, pode-se preparar um anticorpo que tenha um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos fucosila ou um anticorpo com 5 estruturas GlcNac bisegmentantes aumentadas. Tais padrões de glicosilação alterada demonstraram aumentar a capacidade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser efetuadas, por exemplo, expressando-se o anticorpo numa célula hospedeira com maquinário de glicosilação alterada. As células com maquinário de glicosilação alterada foram descritas no estado da técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais são expressados os anticorpos recombinantes da invenção, para assim produzir um 10 anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhagens celulares Ms704, Ms705 e Ms709 carecem do gene de fucosiltransferase, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferase), de forma que os anticorpos expressados nas linhagens celulares Ms704, Ms705, e Ms709 15 carecem de fucose em seus carboidratos. As linhagens celulares Ms704, Ms705, e Ms709 FUT8 foram criadas pelo rompimento direcionado do gene FUT8 em células CHO/DG44 utilizando dois vetores de substituição (vide Publicação de patente americana No. 20040110704 de Yamana et al e 20 Yamame-Ohnuki et al (2004) Biotechnol Bioeng. 87:614-22). Outro exemplo, EP 1.176.195 de Hanai et al. descreve uma linhagem celular com um gene FUT8 funcionalmente rompido, que codifica uma fucosil transferase, de forma que os 25 anticorpos expressados em tal linhagem celular exibem hipofucosilação mediante redução ou eliminação da enzima relacionada à ligação alfa 1,6. Hanai et al. também descrevem as linhagens celulares que possuem baixa atividade enzimática para adicionar fucose à N-acetylglucosamina que liga-se à região Fc do anticorpo ou 30 que não possuem a atividade enzimática, por exemplo a linhagem celular de mieloma de rato YB2/0 (ATCC CRL 1662). A Publicação PCT WO 03/035835 de Presta descreve uma 35

linhagem celular CHO variante, células Lec13, com capacidade reduzida de ligar fucose a carboidratos ligados a Asn(297), o que também resulta em hipofucosilação de anticorpos expressados naquela célula hospedeira (vide também Shields, R.L. et al (2002) J.Biol.Chem. 277:26733-26740). A publicação PCT WO 99/54342 de Umana et al., descreve linhagens celulares construídas para expressar glicosil transferases modificadoras de glicoproteína (ex: beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII) de forma que os anticorpos expressados nas linhagens celulares construídas exibam estruturas GlcNAc bisegmentantes aumentadas, o que resulta em atividade aumentada de ADCC dos anticorpos (vide também Umana et al. (1999) Nat. Biotech.17:176-180). Alternativamente, os resíduos fucose do anticorpo podem ser clivados utilizando-se uma enzima fucosidase. Por exemplo, a fucosidase alfa-L-fucosidase remove resíduos fucosila de anticorpos (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23).

Outra modificação dos anticorpos prevista na presente invenção é a peg-glicosilação ("pegylation"). Um anticorpo pode ser submetido à peg-glicosilação para, por exemplo, aumentar a meia-vida biológica (ex: sérica) do anticorpo. Para tratar com peg-glicosilação o anticorpo, o anticorpo ou o fragmento do mesmo é tipicamente reagido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado de aldeído de PEG, sob condições nas quais um ou mais grupos PEG ficam ligados ao anticorpo ou ao fragmento de anticorpo. Preferivelmente, a peg-glicosilação é conduzida via reação de acilação ou reação de alquilação com uma molécula de PEG reativo (ou um polímero reativo análogo solúvel em água). Conforme aqui utilizado, o termo "polietileno glicol" pretende abranger qualquer uma das formas de PEG que tenha sido utilizada para derivatizar outras proteínas, tais como mono(C1-C10)alcoxi- ou ariloxi-polietileno glicol ou polietileno-glicol-maleimida. Em certas concretizações, o anticorpo a

ser tratado com PEG é um anticorpo aglicosilado. Métodos para tratar proteínas com PEG-glicosilação são conhecidos no estado da técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide, por exemplo, EP 0 154 316 de Nishimura et al. e EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Métodos para Construir Anticorpos

Conforme discutido acima, os anticorpos anti-PD-L1 tendo seqüências V_H e V_K aqui descritos podem ser usados para criar novos anticorpos anti-PD-L1 modificando-se as seqüências V_H e/ou V_K , ou a(s) região(ões) constantes a elas ligadas. Assim, em outro aspecto da invenção, as características estruturais de um anticorpo anti-PD-L1 da invenção, por exemplo, 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, ou 13G4, são usadas para criar anticorpos anti-PD-L1 estruturalmente relacionados que retenham pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como ligação a PD-L1 humano. Por exemplo, uma ou mais regiões CDR de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, ou 13G4, ou suas mutações, podem ser combinadas recombinantemente com regiões estruturais conhecidas e/ou com outras CDRs conhecidas para criar anticorpos anti-PD-L1 adicionais recombinantemente construídos da invenção, conforme discutido acima. Outros tipos de modificações incluem as descritas na seção anterior. O material de partida para o método de construção é uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_K aqui providas, ou uma ou mais de suas regiões CDR. Para criar o anticorpo construído, não é necessário efetivamente preparar (ou seja, expressar como proteína) um anticorpo tendo uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_K aqui providas, ou uma ou mais de suas regiões CDR. Em vez disso, as informações contidas na(s) seqüência(s) são utilizadas como o material de partida para criar uma seqüência(s) de "segunda geração" derivada(s) da seqüência(s) original e então a seqüência(s) de "segunda geração" é preparada e expressada como uma proteína. Conseqüentemente, em outra concretização, a invenção

provê um método para preparar um anticorpo anti-PD-L1 compreendendo:

- (a) prover: (i) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, uma seqüência CDR2 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40 e/ou uma seqüência CDR3 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 10 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50; e/ou (ii) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência CDR1 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 15 59 e 60, uma seqüência CDR2 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70 e/ou uma seqüência CDR3 selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80;
- (b) alterar pelo menos um resíduo aminoácido dentro da seqüência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e/ou da seqüência de anticorpo da região variável de cadeia leve para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterado; e
- (c) expressar a seqüência de anticorpo alterado como uma proteína.

Técnicas padrão de biologia molecular podem ser usadas para preparar e expressar a seqüência de anticorpo alterado.

Preferivelmente, o anticorpo codificado pela(s) 30 seqüência(s) de anticorpo alterado(s) é aquele que retém uma, algumas ou todas as propriedades funcionais dos anticorpos anti-PD-L1 aqui descritos, cujas propriedades funcionais incluem, porém não se restringem a:

(i) ligar-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos;

35 (ii) aumentar a proliferação de célula T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);

(iii) aumentar a produção de interferon- γ num ensaio MLR;

- (iv) aumentar a secreção de IL-2 num ensaio MLR;
(v) estimular as respostas ao anticorpo; e/ou
(vi) reverter o efeito de células T reguladoras sobre células T efetoras e/ou células dendríticas.
- 5 As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas utilizando-se ensaios padrão disponíveis no estado da técnica e/ou aqui descritos, tais como os estabelecidos nos Exemplos (ex: citometria de fluxo, ensaios de ligação).
- 10 Em certas concretizações dos métodos para construir anticorpos da invenção, mutações podem ser introduzidas aleatória ou seletivamente ao longo de toda ou de parte de uma seqüência de codificação de anticorpo anti-PD-L1 e os anticorpos anti-PD-L1 modificados resultantes podem ser identificados quanto à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais conforme aqui descrito. Métodos mutacionais foram descritos no estado da técnica. Por exemplo, a publicação PCT WO 02/092780 de Short descreve métodos para criar e identificar mutações de 15 anticorpos utilizando mutagênese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação dos mesmos.
- 20 Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 de Lazar et al., descreve métodos para utilizar métodos computacionais de identificação para otimizar as 25 propriedades fisioquímicas dos anticorpos.
- Moléculas de Ácido Nucleico que Codificam Anticorpos da Descrição
- Outro aspecto da descrição refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da invenção. Os 30 ácidos nucleicos podem estar presentes em células completas, num lisado de células, ou numa forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando purificado separadamente de outros 35 componentes celulares ou outros contaminantes, como por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, através de técnicas padrão, incluindo o tratamento

- alcalino/SDS, bandeamento CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outros bastante conhecidos no estado da técnica. Vide, F.Ausubel et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Um ácido nucleico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter seqüências intrônicas. Numa concretização preferida, o ácido nucleico é uma molécula de cDNA.
- 5 Os ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos utilizando-se técnicas padrão de biologia molecular. Para anticorpos expressados por hibridomas (ex: hibridomas preparados a partir de camundongos transgênicos portando genes de imunoglobulina humana conforme descrito logo 10 abaixo) cDNAs codificando as cadeias leve e pesada do anticorpo produzido pelo hibridoma podem ser obtidos através de técnicas de amplificação PCR padrão de clonagem de cDNA. Para anticorpos obtidos de um banco de gene de imunoglobulina (ex: utilizando técnicas de 15 exibição de fago), um ou mais ácidos nucleicos codificadores o anticorpo podem ser recuperados do banco. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda, porém o mais preferivelmente é 20 uma região constante kappa.
- 25 Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA codificadores de VH e VL são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligante flexível, como por exemplo, que codifica a seqüência de aminoácido (Gly₄-Ser)₃, de forma tal que as seqüências VH e VL 30 possam ser expressadas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões VL e VH unidas pelo ligante flexível (vide, por exemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., 35 (1990) *Nature* 348:552-554).

Produção de Anticorpos Monoclonais da Invenção

Os anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção

podem ser produzidos através de uma variedade de técnicas, inclusive a metodologia convencional de anticorpo monoclonal, como por exemplo, a técnica padrão de hibridação de célula somática de Kohler e Milstein
5 (1975) Nature 256:495. Embora os procedimentos de hibridação de célula somática sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produzir anticorpo monoclonal podem ser empregadas, como por exemplo, a transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

10 O sistema animal preferido para preparar hibridomas é o sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos e técnicas de imunização para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos no estado da
15 técnica. Pares de fusão (ex: células de mieloma murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na seqüência de um anticorpo monoclonal murino preparado conforme acima
20 descrito. O DNA que codifica as imunoglobulinas de cadeia leve e pesada pode ser obtido do hibridoma murino de interesse e construído para conter seqüências de imunoglobulina não-murina (ex: humana) utilizando as
25 técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo químérico, regiões murinas variáveis podem ser ligadas a regiões humanas constantes utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, a patente americana No. 4.816.567 de Cabilly et al.). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR
30 murinas podem ser inseridas numa estrutura humana utilizando os métodos conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, a patente americana No. 5.225.539 de Winter, e as patentes americanas Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen et al.).
35 Moléculas de ácidos nucleicos preferidas da invenção são as que codificam seqüências VH e VL dos anticorpos monoclonais 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1,

11E6, 12B7 e 13G4. As seqüências de DNA que codificam as seqüências VH de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 e 90, respectivamente. As 5 seqüências de DNA que codificam as seqüências VL de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e 100, respectivamente.

Uma vez obtidos os fragmentos que codificam os segmentos 10 VH e VL, esses fragmentos de DNA podem ser ainda manipulados através de técnicas padrão de DNA recombinante, por exemplo, para converter os genes de região variável em genes de cadeia de anticorpo de extensão completa, em genes de fragmento Fab ou num gene 15 scFv. Nessas manipulações, um fragmento de DNA codificador de VL e VH é operativamente ligado a outro fragmento de DNA que codifica outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. O termo "operativamente ligado" conforme usado neste 20 contexto, pretende significar que os dois fragmentos de DNA são unidos de forma que as seqüências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permaneçam na estrutura ("in-frame").

O DNA isolado que codifica a região V_H pode ser 25 convertido num gene de cadeia pesada de extensão completa ligando-se operativamente o DNA codificador de VH a outra molécula de DNA que codifica as regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências de genes humanos de região constante de cadeia pesada são 30 conhecidas no estado da técnica (vide, por exemplo, Kabat et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e fragmentos de DNA abrangendo essas regiões podem ser obtidos através 35 de amplificação PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, porém, o mais preferivelmente

é uma região constante IgG1 ou IgG4. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA codificador de V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA que codifica apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado que codifica a região V_L pode ser convertido num gene de cadeia leve de extensão completa (bem como um gene de cadeia leve Fab) ligando-se operativamente o DNA codificador de V_L a outra molécula de DNA que codifica a região constante de cadeia leve, CL. As seqüências de genes humanos da região constante de cadeia leve são conhecidos no estado da técnica (vide, por exemplo, Kabat, E.A. et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 10 U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e fragmentos de DNA abrangendo essas regiões podem ser obtidos através de amplificação PCR padrão.

Numa concretização preferida, os anticorpos da invenção 20 são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra PD-L1 podem ser gerados utilizando camundongos transgênicos ou transcromossômicos que carregam partes do sistema imune humano em vez do sistema camundongo. Esses camundongos

25 transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos designados como camundongos HuMAb e KM miceTM (camundongo KM), respectivamente, e são coletivamente designados na presente invenção como "camundongos contendo Ig humana".

O camundongo HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contém 30 minilocais ("miniloci") de gene de imunoglobulina humana que codificam seqüências de imunoglobulina humana não rearranjadas de cadeia pesada (μ e γ) e leve κ , juntamente com mutações direcionadas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógena (vide, por exemplo, Lonberg, et al. 35 (1994) Nature 368(6474):856-859). Conseqüentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo e, em resposta à imunização, os transgenes

humanos de cadeia pesada e leve introduzidos sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgG κ de alta afinidade (Lonberg, N. et al. (1994), supra; revisado em Lonberg, N. (1994) 5 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg N. e Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). A preparação e uso de camundongos HuMAb bem como as modificações genômicas carregadas por tais camundongos, 10 são ainda descritas em Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J.H. et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuailion et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO 15 J. 12:821-830; Tuailion et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6:579-591; e Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, cujos conteúdos foram aqui incorporados especificamente por referência em sua 20 totalidade. Vide, ainda, as patentes americanas Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todos de Lonberg e Kay; patente americana No. 5.545.807 25 de Surani et al.; Publicação PCT Nos. WO 92/03918, WO93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todos de Lonberg e Kay; e Publicação PCT No. WO 01/14424 de Korman et al.

Em outra concretização, os anticorpos humanos da invenção podem ser produzidos utilizando um camundongo que carrega 30 seqüências de imunoglobulina humana em transgenes e transcromossomos, tal como um camundongo que carrega um transgene humano de cadeia pesada e um transcromossomo humano de cadeia leve. Tais camundongos, aqui designados camundongos "KM mice™" são descritos detalhadamente na 35 Publicação PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Os sistemas animais transgênicos alternativos expressando genes de imunoglobulina humana estão disponíveis no

estado da técnica e podem ser usados para produzir anticorpos anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo designado Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos, por exemplo, nas patentes americanas Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos expressando genes de imunoglobulina humana estão disponíveis no estado da técnica e podem ser usados para produzir anticorpos anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, camundongos carregando tanto um transcromossomo humano de cadeia pesada como um transcromossomo humano de cadeia leve, designados como "camundongos TC" podem ser usados; tais camundongos são descritos em Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, vacas portando os transcromossomos humanos de cadeia leve e pesada foram descritas no estado da técnica (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) e podem ser usadas para produzir anticorpos anti-PD-L1 da invenção.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparados utilizando métodos de exibição de fago para identificar bancos de genes de imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição de fago para isolar anticorpos humanos são estabelecidos no estado da técnica. Vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 de Ladner et al; Patentes americanas Nos. 5.427.908 e 5.580.717 de Dower et al.; Patentes Americanas Nos. 5.9698.108 e 6.172.197 de McCafferty et al.; e patentes americanas Nos. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915, e 6.593.081 de Griffiths et al.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparados utilizando camundongos SCID nos quais as células imunes humanas foram reconstituídas de forma que uma resposta a anticorpo humano possa ser gerada quando da imunização. Tais camundongos são

descritos, por exemplo, nas patentes americanas NOS. 5.476.996 e 5.698.767 de Wilson et al.

Imunização de Camundongos com Ig Humana

Quando camundongos com Ig humana são utilizados para produzir anticorpos humanos da invenção, tais camundongos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno PD-L1 e/ou PD-L1 recombinante, ou uma proteína de fusão PD-L1, conforme descrito por Lonberg N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; 10 Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; e publicação PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. Preferivelmente, os camundongos terão de 6-16 semanas de vida quando da primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50 μ g) de 15 antígeno PD-L1 pode ser utilizada para imunizar o camundongo com Ig humana intraperitonealmente.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para PD-L1 são descritos no Exemplo 1 abaixo. A experiência cumulativa com 20 diversos抗ígenos tem demonstrado que os camundongos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno em adjuvante de Freund completo, seguido de imunizações IP semana sim, semana não, (até um total de 6) com antígeno em adjuvante 25 de Freund incompleto. Porém, adjuvantes outros que não o de Freund também se mostraram eficazes. Além disso, células completas na ausência de adjuvante demonstraram ser altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorada durante o curso do protocolo de imunização com 30 amostras de plasma sendo obtidas por sangramentos retroorbitais. O plasma pode ser identificado através de teste ELISA (conforme descrito abaixo) e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-Pd-L1 podem ser usados para as fusões. Os camundongos podem 35 receber antígeno intravenosamente 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Espera-se que 2-3 fusões para cada imunização precisem ser realizadas. Entre 6 e

24 camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Geralmente, são utilizadas tanto as cepas HCo7 como HCo12. Além disso, tanto o transgene HCo7 como o HCo12 podem ser produzidos juntos num único camundongo
5 que tenha dois transgenes humanos diferentes de cadeia pesada (HCo7/HCo12). Alternativamente, ou adicionalmente, a cepa do KM MouseTM pode ser usada, conforme descrito no Exemplo 1.

Geração de Hibridomas que Produzem Anticorpos Monoclonais
10 Humanos da Descrição

Para gerar hibridomas que produzam os anticorpos monoclonais humanos da invenção, esplenócitos e/ou células de nódulos linfáticos de camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos a uma linhagem celular
15 imortalizada apropriada, tal como uma linhagem celular de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser identificados quanto à produção de anticorpos antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões celulares simples de linfócitos esplênicos de camundongos
20 imunizados podem ser fundidas até um sexto do número de células de mieloma de camundongo não-secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com PEG a 50%.

As células são plaqueadas a aproximadamente 2×10^5 em placa de microtitulação de fundo plano, seguido de incubação por duas semanas em meio seletivo contendo soro fetal Clone Serum a 20%, meios condicionados "653" a 18%, 5% origem (IGEN), 4mM L-glutamina, 1mM piruvato de sódio, 5mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptopetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml estreptomicina, 50
30 mg/ml de gentamicina, e 1X HAT (Sigma; HAT é adicionado 24 horas após fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio no qual HAT é substituído por HT. As cavidades individuais podem então ser identificadas através de ELISA quanto aos anticorpos monoclonais humanos IgM e IgG. Ocorrido o crescimento extensivo do hibridoma, o meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas

secretores de anticorpos podem ser replaqueados, identificados novamente, e se ainda forem positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes limitando-se a diluição. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

Para purificar os anticorpos monoclonais humanos, hibridomas selecionados podem ser crescidos em frascos tipo "spinner" de dois litros para purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia por afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). A IgG eluída pode ser examinada através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS e a concentração pode ser determinada por OD 280 utilizando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Geração de Anticorpos Monoclonais Produtores de Transfectomas da Descrição

Os anticorpos da invenção podem também ser produzidos num transfectoma de célula hospedeira utilizando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção gênica conforme é conhecido no estado da técnica (ex: Morrison, S.(1985) Science 229:1202).

Por exemplo, para expressar anticorpos, ou os fragmentos de anticorpos dos mesmos, os DNAs que codificam cadeias leves e pesadas de extensão parcial ou completa, podem ser obtidos através de técnicas padrão de biologia molecular (ex: amplificação PCR ou clonagem cDNA) utilizando um hibridoma que expresse o anticorpo de interesse) e os DNAs podem ser inseridos em vetores de expressão de forma que os genes sejam operativamente

ligados às seqüências de controle transcricionais e translacionais. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" pretende significar que um gene de anticorpo é ligado num vetor de forma que as seqüências de controle 5 transcricionais e translacionais dentro do vetor realizem sua função pretendida de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são selecionados para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo pode ser inserido em vetor separado ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão através de 10 métodos padrão (ex: ligação de sítios de restrição complementares no fragmento de gene de anticorpo e vetor, ou ligação da extremidade enfraquecida ("blunt-end ligation") se nenhum sítio de restrição estiver presente). As regiões variáveis de cadeia leve e pesada 15 dos anticorpos aqui descritos podem ser utilizadas para criar genes de anticorpo de extensão completa de qualquer isótopo de anticorpo inserindo-os em vetores de expressão que já codificam regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve do isótopo desejado, de forma que o segmento 20 V_H seja operativamente ligado ao(s) segmento(s) C_H dentro do vetor e o segmento V_L seja operativamente ligado ao segmento C_L dentro do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode 25 codificar um peptídeo sinal que facilite a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de forma que o peptídeo sinal seja ligado na estrutura ("in-frame") ao terminal amino do gene de cadeia de anticorpo. 30 O peptídeo sinal pode ser um peptídeo sinal de imunoglobulina ou um peptídeo sinal heterólogo (ou seja, um peptídeo sinal de uma proteína não de imunoglobulina). 35 Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de

expressão recombinantes da invenção carregam seqüências regulatórias que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. O termo "seqüência regulatória" pretende incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (ex: sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Tais seqüências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado pelos habilitados na técnica que o desenho do vetor de expressão, incluindo a seleção de seqüências regulatórias, podem depender de fatores tais como a seleção da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. As seqüências regulatórias preferidas para expressão de célula hospedeira de mamífero incluem os elementos virais que dirigem altos níveis de expressão de proteína em células de mamífero, tais como os promotores e/ou intensificadores derivados de citomagalovírus (CMV), Vírus Símio (SV40), adenovírus (ex: o promotor tardio maior do adenovírus (AdMLP)e poliomá. Alternativamente, as seqüências regulatórias não-virais podem ser usadas, tal como o promotor de ubiquitina ou promotor de β -globina. Outrossim, os elementos regulatórios compostos de seqüências de fontes diferentes, tal como o sistema promotor SR α , que contém seqüências do promotor precoce SV40 e o terminal de repetição longa do vírus de leucemia de célula T humana do tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol Cell Biol.8:466-472).

Além dos genes de cadeia de anticorpo e das seqüências regulatórias, os vetores de expressão recombinante da invenção podem carregar seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (ex:origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi

introduzido (vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todos de Axel et al.). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, tais como 5 G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene de dihidrofolato reductase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o neo gene 10 (para seleção de G418).

Para expressão das cadeias leve e pesada, o(s) vetor(es) de expressão que codificam as cadeias leve e pesada é transfetado numa célula hospedeira através de técnicas padrão. As diversas formas do termo "transfecção" 15 pretendem abranger uma ampla variedade de técnicas comumente utilizadas para a introdução de DNA exógeno dentro de uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, como por exemplo, eletroporação, precipitação cálcio-fosfato, transfecção DEAE-dextrano e 20 similares. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, a expressão de anticorpos em células eucarióticas, e o mais preferivelmente em 25 células hospedeiras de mamífero, é a mais preferida pois tais células eucarióticas e, em especial, células de mamífero, têm mais probabilidade de montar e secretar um anticorpo adequadamente revelado e imunologicamente ativo do que as células procarióticas. A expressão procariótica 30 de genes de anticorpo foi reportada como ineficaz para produção de altos rendimentos de anticorpo ativo (Boss, M.A. e Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Células hospedeiras de mamífero preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (incluindo 35 células CHO dhfr-, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) Proc. Natl.Acad.Sci. USA 77:16-4220, utilizadas com um marcador selecionável DHFR, como por exemplo, conforme

descrito em R.J.Kaufman e P.A.Sharp (1982) J.Mol.Biol.159:601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em especial, para uso com células de mieloma NSO, outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão gênica GS descrito em WO 87/04462 (Wilson), WO 89/01036 (a Bebbington) e EP 338.841. Quando os vetores de expressão recombinante codificando genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando-se as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são crescidas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura utilizando-se métodos padrão de purificação de proteína.

Caracterização de Ligação do Anticorpo a Antígeno
Os anticorpos da invenção podem ser testados quanto à ligação a PD-L1, por exemplo, através de ELISA padrão. Resumidamente, placas de microtitulação são revestidas com PD-L1 purificado a 0,25 μ g/ml em PBS, e então bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. As diluições de anticorpo (ex: diluições de plasma de camundongos imunizados com PD-L1) são adicionadas a cada cavidade e incubadas durante 1-2 horas a 37°C. As placas são lavadas com PBS/Tween e então incubadas com reagente secundário (ex: para anticorpos humanos, um reagente policlonal Fc-específico IgG anti-humano de cabra) conjugado a fosfatase alcalina durante 1 hora a 37°C. Após lavagem, as placas são desenvolvidas com substrato pNPP (1 mg/ml) e analisadas em OD de 405-650. Preferivelmente, os camundongos que desenvolverem as titulações mais altas serão usados nas fusões. Um ensaio ELISA, conforme acima descrito, pode também ser usado para identificar hibridomas que mostram reatividade positiva com imunógeno PD-L1. Hibridomas que ligam-se com alta avidez a PD-L1 são subclonados e então

caracterizados. Um clone de cada hibridoma, que retém a reatividade das células parentais (através de ELISA) pode ser selecionado para preparar um banco de células de 5-10 frascos armazenado a -140°C e para purificação de anticorpo.

Para purificar anticorpos anti-PD-L1, hibridomas selecionados podem ser crescidos em frascos tipo "spinner" de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia Piscataway, NJ). A IgG eluída pode ser verificada através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para garantir a pureza. A solução tampão pode ser trocada por PBS e a concentração pode ser determinada por OD 280 utilizando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 selecionados ligam-se a epítopos inéditos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes disponíveis no mercado (Pierce, Rockford, IL). Os estudos de competição utilizando anticorpos monoclonais não marcados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser conduzidos utilizando-se placas ELISA revestidas com PD-L1 conforme acima descrito. A ligação a mAb biotinilado pode ser detectada com uma sonda de estrepavidina-fosfatase alcalina.

Para determinar o isótipo de anticorpos purificados, ensaios ELISA de isótipo podem ser conduzidos utilizando reagentes específicos para anticorpos de um isótipo específico. Por exemplo, para determinar o isótipo de um anticorpo monoclonal humano, cavidades de placas de microtitulação podem ser revestidas com 1 μ g/ml de imunoglobulina anti-humana da noite para o dia a 4°C. Após bloqueio com BSA 1%, as placas são reagidas com 1 μ g/ml ou menos de anticorpos monoclonais de teste ou controles de isótipos purificados, à temperatura ambiente

por uma ou duas horas. As cavidades podem então ser reagidas com IgG1 humana ou sondas de conjugado de fosfatase alcalina IgM-específica humana. As placas são desenvolvidas e analisadas conforme descrito acima.

- 5 IgGs anti-PD-L1 humanas podem ainda ser testadas quanto à reatividade com o antígeno PD-L1 através do método Western Blot. Resumidamente, o PD-L1 pode ser preparado e submetido à eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida. Após eletroforese, os抗ígenos
- 10 separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro fetal bovino a 10%, e sondadas com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação a IgG humana pode ser detectada utilizando fosfatase alcalina de IgG anti-humana e desenvolvida com
- 15 comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem.Cp., St.Louis, Mo).

Propriedades Físicas do Anticorpo

- Os anticorpos da presente invenção podem ser ainda caracterizados pelas várias propriedades físicas dos
- 20 anticorpos anti-PD-L1. Diversos ensaios podem ser usados para detectar e/ou diferenciar diferentes classes de anticorpos com base nessas propriedades físicas.

Em algumas concretizações, os anticorpos da presente invenção podem conter um ou mais sítios de glicosilação na região variável de cadeia leve ou pesada. A presença de um ou mais sítios de glicosilação na região variável pode resultar em imunogenicidade aumentada do anticorpo ou numa alteração do pK do anticorpo devido à ligação ao antígeno alterado (Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala FA e Morrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al. (1988), J.Exp Med 168:1099-109; Spiro RG (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al.(2000) Mol Immunol. 37:697-706). Sabe-se que a glicosilação ocorre em padrões contendo uma seqüência N-X-S/T. A glicosilação em região variável pode ser testada utilizando um ensaio Glycoblot que cliva o anticorpo para produzir um Fab, e

que então testa a glicosilação utilizando um ensaio que mede a oxidação de periodato e a formação de base Schiff. Alternativamente, a glicosilação em região variável pode ser testada utilizando-se cromatografia de luz Dionex 5 (Dionex-LC) que cliva sacarídeos de um Fab em monossacarídeos e analisa o teor de sacarídeo individual. Em alguns casos, é preferido ter um anticorpo anti-PD-L1 que não contenha glicosilação na região variável. Isso pode ser obtido selecionando-se anticorpos que não 10 contêm o padrão de glicosilação na região variável ou mutando-se resíduos dentro do padrão de glicosilação utilizando técnicas padrão conhecidas no estado da técnica.

Numa concretização preferida, os anticorpos da presente 15 invenção não contém sítios de isomerismo de asparagina. Um efeito de desamidação ou de ácido isoaspártico pode ocorrer em seqüências N-G ou D-G, respectivamente. O efeito de desamidação ou de ácido isoaspártico resulta na criação de ácido isoaspártico que reduz a estabilidade de 20 um anticorpo, criando uma estrutura dobrada fora de um terminal carboxi de cadeia lateral ao invés de na cadeia principal. A criação de ácido isoaspártico pode ser medida utilizando-se um ensaio iso-quant que utiliza uma HPLC de fase reversa para testar o ácido aspártico.

25 Cada anticorpo terá um ponto isoelétrico inédito (pI), mas geralmente os anticorpos enquadram-se na faixa de pH de 6 e 9,5. O pI para um anticorpo IgG1 enquadra-se tipicamente na faixa de pH de 7-9,5 e o pI para um anticorpo IgG4 enquadra-se tipicamente na faixa de pH de 30 6-8. Os anticorpos podem ter um pI que esteja fora dessa faixa. Embora os efeitos sejam geralmente desconhecidos, existe uma especulação de que os anticorpos com um pI fora da faixa normal possam apresentar alguma não-revelação e instabilidade nas condições *in vivo*. O ponto isoelétrico pode ser testado utilizando-se um ensaio de focalização isoelétrica capilar que cria um gradiente de pH e que pode utilizar focalização a laser para aumentar 35

a precisão (Janini et al. (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75:89; Hunt et al. (1998) J.Chromatogr A 800:355-67). Em alguns casos, é preferido ter um anticorpo anti-PD-L1 que contenha um valor de pI enquadrado na faixa normal. Isso pode ser obtido selecionando-se anticorpos com um pI na faixa normal, ou mutando-se resíduos de superfície carregada, utilizando técnicas padrão bastante conhecidas no estado da técnica.

5 10 Cada anticorpo terá uma temperatura de fusão indicativa de estabilidade térmica (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). Uma estabilidade térmica mais alta indica maior estabilidade global do anticorpo *in vivo*. O ponto de fusão de um anticorpo pode ser medido utilizando-se técnicas tais como calorimetria diferencial exploratória (Chen et al. (2003) Pharma Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1990) Immunol Lett 68:47-52). T_{M1} indica a temperatura de não-revelação inicial do anticorpo. T_{M2} indica a temperatura de não-revelação completa do anticorpo. Geralmente, é preferido que a T_{M1} de um anticorpo da presente invenção seja superior a 60°C, preferivelmente superior a 65°C, e ainda mais preferivelmente superior a 70°C. Alternativamente, a estabilidade térmica de um anticorpo pode ser medida utilizando-se dicroismo circular (Murray et al. (2002) J.Chromatogra Sci 40:343-9). A estabilidade térmica de anticorpos anti-PD-L1 aqui descrita está resumida na Tabela 1.

15 20 25

Tabela 1

mAb	T_{M1} (oC)	T_{M2} (oC)
3G10	70	75
5F8	72	74
11E6	64	73
1B12	69	72
12A4	68	72
10A5		71
12B7		70
13G4	66	69
10H10		69

Numa concretização preferida, são selecionados os anticorpos que não se degradam rapidamente. A fragmentação de um anticorpo anti-PD-L1 pode ser medida utilizando-se eletroforese capilar (CE) e MALDI-MS, conforme é entendido no estado da técnica (Alexander AJ e Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

Em outra concretização preferida, são selecionados os anticorpos que possuam efeitos de agregação mínimos. A agregação pode levar à ativação de uma resposta imune indesejada e/ou a propriedades farmacocinéticas alteradas ou desfavoráveis. Geralmente, são aceitáveis os anticorpos com agregação de 25% ou menos, preferivelmente 20% ou menos, ainda mais preferivelmente de 15% ou menos, ainda mais preferivelmente 10% ou menos ou ainda mais preferivelmente 5% ou menos. A agregação pode ser medida através de diversas técnicas bastante conhecidas no estado da técnica, incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com coluna de exclusão por dimensão (SEC) e dispersão de luz para identificar monômeros, dímeros, trímeros ou multímeros.

Imunoconjugados

Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza um anticorpo anti-PD-L1 ou um fragmento do mesmo, conjugado a uma porção terapêutica, tal como uma citotoxina, um fármaco (ex: um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são aqui designados "imunoconjugados". Os imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são designados "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja nocivo (ex: que mate) às células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrostestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, e puromicina e seus análogos ou homólogos.

- Agentes terapêuticos também incluem, por exemplo, antimetabólitos (ex: metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes, (ex: mecloretamina, tioepa
- 5 clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (ex: daunorubicina (anteriormente denominada daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (ex: dactinomicina
- 10 (anteriormente denominada Actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC) e agentes anti-mitóticos (ex:vincristina e vinblastina).
- Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas
- 15 que podem ser conjugadas a um anticorpo da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas, e seus derivados. Um exemplo de conjugado de anticorpo de caliqueamicina está disponível no mercado (Mylotarg®; Wyeth-Ayerst).
- 20 As citotoxinas podem ser conjugadas a anticorpos da invenção utilizando tecnologia de ligante disponível no estado da técnica. Exemplos de tipos de ligante que foram utilizados para conjugar uma citotoxina a um anticorpo incluem, porém não se restringem a hidrazonas, tioéteres,
- 25 ésteres, dissulfetos, e ligantes contendo peptídeo. Pode-se selecionar um ligante que seja, por exemplo, suscetível à clivagem por pH baixo dentro do compartimento lisossômico ou suscetível à clivagem por proteases, tais como proteases preferencialmente expressadas em tecido tumoral tal como catepsinas (ex:
- 30 catepsinas B, C, D).
- Para mais discussão sobre os tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugar agentes terapêuticos a anticorpos, vide também Saito, G. et al.(2003) Adv Drug
- 35 Deliv.Rev. 55:199-215; Trail, P.A.et al.(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne G.(2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat Rev.Cancer 2:750-

763; Pastan, I. e Kreitman, R.J. (2002) Curr.Opin.Investig.Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J. (2001) Adv.Drug Delivery Rev. 53:247-264.

Os anticorpos da presente invenção podem também ser conjugados a um isótopo radioativo para gerar radiofarmacêuticos citotóxicos, também designados radioimunoconjungados. Exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados a anticorpos para uso diagnóstico ou terapêutico incluem, porém não se restringem a iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰ e lutécio¹⁷⁷. O método para preparar radioimunoconjungados são estabelecidos no estado da técnica. Exemplos de radioimunoconjungados estão disponíveis no mercado, inclusive Zevalin®(IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar®(Corixa Pharmaceuticals) e métodos similares podem ser usados para preparar radioimunoconjungados utilizando os anticorpos da invenção.

Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica, e a porção de fármaco não deve ser interpretada como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possua uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou um fragmento ativo da mesma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina de difteria; uma proteína tal como fator de necrose tumoral ou interferon- γ ; ou modificadores de resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6("IL-6"), fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônia de granulócitos ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

Técnicas para conjugar tal porção terapêutica a anticorpos são conhecidas, vide, por exemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" in Monoclonal Antibodies and Cancer

- Therapy, Reisfeld et al.(eds), pp.243-56 (Alan R.Liss, Inc.1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd.ed), Robinson et al.(eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc.1987);
- 5 Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al (eds), pp.475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al.(eds.) pp.303-16 (Academic Press 1985) e Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol.Rev. 62:119-58 (1982).
- 10 15 Moléculas Biespecíficas
Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza moléculas biespecíficas compreendendo um anticorpo anti-PD-L1, ou um fragmento do mesmo, da invenção. Um anticorpo da invenção, ou porções ligantes ao antígeno do mesmo, pode ser derivatizado ou ligado a outra molécula funcional, como por exemplo, a outro peptídeo ou proteína (ex: outro anticorpo ou ligante para um receptor) para gerar uma molécula biespecífica que se ligue pelo menos a dois sítios de ligação diferentes ou a moléculas alvo. O anticorpo da invenção pode, de fato, ser derivatizado ou ligado a mais de uma outra molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais de dois sítios de ligação diferentes e/ou a moléculas alvo; tais moléculas multiespecíficas também pretendem ser abrangidas pelo termo "molécula biespecífica" conforme aqui utilizado. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (ex: por acoplamento químico, fusão genética, associação não-covalente ou de outra forma) a uma ou mais outras moléculas ligantes, tal como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimética de ligação, de forma a resultar numa molécula
- 20 25 30 35

biespecífica.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação para PD-L1 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítopo alvo. Numa concretização específica da invenção, o segundo epítopo alvo é um receptor Fc, como por exemplo, Fc γ RI humano (CD64) ou um receptor Fc α humano (CD89). Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas capazes de ligar-se a células efetoras expressando tanto Fc γ R como Fc α R (ex: monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) e a células alvo expressando PD-L1. Essas moléculas biespecíficas direcionam as células expressando PD-L1 à célula efetora e disparam atividades de célula efetora mediada por receptor Fc, tal como a fagocitose de células expressando PD-L1, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocinas, ou geração de ânion superóxido.

Numa concretização da invenção, na qual a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode ainda incluir uma terceira especificidade de ligação, além de uma especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-PD-L1. Numa concretização, a terceira especificidade de ligação é uma porção de fator anti-intensificador (EF), como por exemplo, uma molécula que se liga a uma proteína superficial envolvida em atividade citotóxica e assim aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A "porção de fator anti-intensificador" pode ser um anticorpo, um fragmento de anticorpo funcional ou um ligante que se liga a uma dada molécula, como por exemplo, um antígeno ou um receptor, e assim resulta numa intensificação no efeito dos determinantes de ligação para o receptor Fc ou para o antígeno de célula alvo. A "porção de fator anti-intensificador" pode ligar-se a um receptor Fc ou a um antígeno de célula alvo. Alternativamente, a porção de

fator anti-intensificador pode ligar-se a uma entidade que seja diferente da entidade à qual a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção de fator anti-intensificador pode ligar-se a uma 5 célula T citotóxica (ex: via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulte numa resposta imune aumentada contra a célula alvo).

Numa concretização, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como especificidade de ligação a 10 pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ou um Fv de cadeia simples. O anticorpo pode também ser um dímero de cadeia leve ou de cadeia pesada, ou qualquer fragmento mínimo do mesmo, tal como um Fv ou um construto 15 de cadeia simples, conforme descrito na patente americana No. 4.946.778 de Ladner et al. cujo conteúdo foi aqui incorporado expressamente por referência.

Numa concretização, a especificidade de ligação para um receptor Fcγ é provida por um anticorpo monoclonal, cuja 20 ligação não é bloqueada pela imunoglobulina G humana (IgG). Conforme aqui utilizado, o termo "receptor de IgG" refere-se a qualquer um dos oito genes de cadeia-γ localizados no cromossomo 1. Esses genes codificam um total de doze isoformas transmembrânicas ou de receptor 25 solúvel que são agrupadas em três classes de receptor Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII(CD32) e FcγRIII (CD16). Numa concretização preferida, o receptor Fcγ é um FcγRI humano de alta afinidade. O FcγRI humano é um molécula de 72 kDa, que mostra alta afinidade pela IgG monomérica (10^8 - 30 10^9 M⁻¹).

A produção e caracterização de certos anticorpos monoclonais anti-Fcγ preferidos são descritas na Publicação PCT WO 88/00052 e na patente americana No. 4.954.617 de Fanger et al., cujos ensinamentos são aqui 35 totalmente incorporados por referência. Esses anticorpos ligam-se a um epítopo de FcγRI, FcγRII ou FcγRIII num sítio que é distinto do sítio de ligação Fcγ do receptor

e, assim, sua ligação não é bloqueada substancialmente por níveis fisiológicos de IgG. Anticorpos anti-Fc γ RI específicos úteis na presente invenção são mAb 22, mAb32, mAB 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma que produz mAb 32 está disponível na American Type Culture Collection, registro ATCC No. HB9469. Em outras concretizações, o anticorpo de receptor anti-Fc γ é uma forma humanizada de anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 é descrita em Graziano, R.F. et al. (1995) J.Immunol 155(10):4996-5002 e Publicação PCT WO 94/10332. A linhagem celular produtora de anticorpo H22 foi depositada no "American Type Culture Collection" sob a designação HA022CL1 e tem o número de registro CRL 11177.

Em outras concretizações preferidas ainda, a especificidade de ligação para um receptor Fc é provida por um anticorpo que se liga a um receptor de IgA humana, como por exemplo, receptor Fc-alfa (Fc α RI(CD89)), cuja ligação é preferivelmente não bloqueada por imunoglobulina A humana (IgA). O termo "receptor de IgA" pretende incluir o produto gênico de um α -gene (Fc α RI) localizado no cromossomo 19. Esse gene é conhecido por codificar diversas isoformas transmembrânicas alternativamente alinhadas de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) é constitutivamente expressado em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, porém não em populações de células não-efetoras. O Fc α RI possui uma afinidade pelo meio ($\sim 5 \times 10^7 M^{-1}$) tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta mediante exposição a citocinas tais como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H.C. et al (1996) Critical Review in Immunology 16: 423-440). Quatro anticorpos monoclonais Fc α RI-específicos, identificados como A3, A59, A62 e A77, que ligam-se a Fc α RI fora do domínio de ligação a ligante IgA, foram descritos (Monteiro, R.C. et al. (1992) J.Immunol.148:1764). Fc α RI e Fc γ RI são receptores de ativação para uso nas moléculas biespecíficas da invenção, pois (1) são

expressados principalmente em células efetoras imunes como por exemplo monócitos, PMNs, macrófagos, e células dendríticas; (2) são expressados em altos níveis (ex: 5.000-100.000 por célula); (3) são mediadores de atividades citotóxicas (ex: ADCC, fagocitose); e (4) mediam a apresentação aumentada de抗ígenos, incluindo os auto-antígenos, a eles direcionados.

Embora os anticorpos monoclonais humanos sejam preferidos, outros anticorpos que podem ser empregados nas moléculas biespecíficas da invenção são anticorpos monoclonais murinos, químéricos e humanizados.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas conjugando-se as especificidades de ligação constituintes, como por exemplo, as especificidades de ligação anti-FcR e anti-PD-L1, utilizando métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e então conjugada entre si. Quando as especificidades de ligação forem proteínas ou peptídeos, uma variedade de agentes acoplantes ou reticuladores podem ser usados para conjugação covalente. Exemplos de agentes reticuladores incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) e sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (vide, por exemplo, Karpovsky et al. (1984) J.Exp.Med 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648). Outros métodos incluem os descritos em Paulus (1985) Behring Ins.Mitt.No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, e Glennie et al. (1987) J.Immunol. 139:2367-2375). Agentes conjugantes preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos da Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação forem anticorpos, eles podem ser conjugados via ligação de

sulfidrila das regiões de dobra de terminal C das duas cadeias pesadas. Numa concretização especialmente preferida, a região de dobra é modificada para conter um número ímpar de resíduos sulfidrila, preferivelmente um,

5 antes da conjugação.

Alternativamente, ambas especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressadas e montadas na mesma célula hospedeira. Esse método é especialmente útil quando a molécula biespecífica for um mAb x mAb, mAb
10 x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x proteína de fusão Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia simples compreendendo um anticorpo de cadeia simples e um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia simples compreendendo
15 dois determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia simples. Métodos para preparar moléculas biespecíficas são descritos, por exemplo, nas patentes americanas Nos. 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513;
20 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; e 5.482.858.

A ligação das moléculas biespecíficas a seus alvos específicos pode ser confirmada, por exemplo, através do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise FACS, bioensaio
25 (ex:inibição de crescimento) ou ensaio Western Blot. Cada um desses ensaios geralmente detecta a presença de complexos proteína-anticorpo de interesse específico empregando um reagente marcado (ex: um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os
30 complexos de anticorpo FcR podem ser detectados utilizando, por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou um fragmento de anticorpo que reconheça e que especificamente ligue-se aos complexos de anticorpo-FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados
35 utilizando-se qualquer um de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser radioativamente marcado e utilizado num radioimunoensaio

(RIA) (vide, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, aqui incorporado por referência). O isótopo radioativo 5 pode ser detectado por meios tal como o uso de contador γ ou um contador de cintilação ou através de autoradiografia.

Composições Farmacêuticas

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma 10 composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção(ões) ligantes ao antígeno dos mesmos, da presente invenção, formulada juntamente com um portador farmaceuticamente aceitável. Tais composições podem 15 incluir um ou uma combinação de (ex: dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficos) que 20 ligam-se a diferentes epítopos no antígeno alvo ou que tenham atividades complementares.

Composições farmacêuticas da invenção podem também ser administradas em terapia de combinação, ou seja, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de 25 combinação pode incluir um anticorpo anti-PD-L1 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente antiinflamatório ou imunossupressor. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados na terapia de combinação são descritos em maiores detalhes abaixo na 30 seção que trata dos usos dos anticorpos da invenção.

Conforme aqui utilizado, "portador farmaceuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e agentes retardantes de 35 absorção, e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o portador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea,

parenteral, espinhal ou epidérmica (ex: por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, ou seja, o anticorpo, imunoconjugado, ou molécula biespecífica, pode ser depositado sobre um material para proteger o composto da ação de ácidos e de outras condições naturais que possam inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parental e que não causa nenhum efeito toxicológico indesejado (vide, por exemplo, Berge, S.M. et al (1977) J.Pharm.Sci. 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem os derivados de ácidos inorgânicos atóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos atóxicos tais como os ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos, ácidos alcanoicos substituídos com fenila, ácido hidroxi alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Sais de adição de base incluem os derivados de sais metálicos alcalinoterrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio, e similares, bem como de aminas orgânicas atóxicas, tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

Uma composição farmacêutica da invenção pode também incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bisulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato,

alfa-tocoferol, e similares; e (3) agentes quelantes metálicos, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e similares.

- 5 Exemplos de portadores aquosos e não-aquosos apropriados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similares), e misturas apropriadas dos mesmos, óleos
10 vegetais, tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, mediante o uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de
15 dispersões, e mediante o uso de surfactantes.

Essas composições podem também conter adjuvantes tais como preservativos, agentes umectantes, agentes emulsificantes, e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microorganismos pode ser garantida tanto
20 pelos procedimentos de esterilização acima citados como pela inclusão de diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol ácido sórbico, e similares. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto
25 de sódio, e similares nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser obtida pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como o monoestearato de alumínio e a gelatina.

- 30 Portadores farmaceuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmaceuticamente ativas é conhecido no
35 estado da técnica. Exceto se qualquer meio ou agente convencional for incompatível com o composto ativo, é previsto o uso dos mesmos nas composições farmacêuticas

da invenção. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados às composições.

As composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada na forma de uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de fármaco. O portador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares) e suas misturas apropriadas. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, mediante o uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e mediante o uso de surfactantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida incluindo-se na composição um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina. Soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas incorporando-se o composto ativo na quantidade requerida num solvente apropriado com um ou uma combinação de 25 ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de microfiltração para esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo num veículo estéril que contenha um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles citados acima. No caso de pós estéreis para a 30 preparação de soluções estéreis injetáveis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e liofilização que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer outro ingrediente desejado de uma solução estéril previamente filtrada do mesmo.

A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma de

dosagem única variará dependendo do indivíduo a ser tratado, e do modo específico de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma de dosagem única será geralmente aquela quantidade da composição que produza um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, essa quantidade variará de cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento do ingrediente ativo, preferivelmente de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, o mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um portador farmaceuticamente aceitável.

Regimes de dosagem são ajustados para prover a resposta ótima desejada (ex: uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolus simples pode ser administrado, diversas doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma unitária de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma unitária de dosagem, conforme aqui utilizada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção são ditadas por e diretamente dependente(s) (a) das características inéditas do composto ativo e o efeito terapêutico específico a ser obtido, e (b) das limitações inerentes à técnica de se combinar tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais usualmente de 0,01 a 5 mg/kg

do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro da faixa 5 de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento representativo envolve a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada três meses, ou uma vez a cada três a 6 meses. Regimes de 10 dosagem preferidos para um anticorpo anti-PD-L1 da invenção incluem 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal via administração intravenosa, com o anticorpo sendo administrado utilizando-se um dos seguintes esquemas de dosagem: (i) a cada quatro semanas 15 para seis dosagens, e então a cada três meses; (ii) a cada três semanas; (iii) 3 mg/kg peso corporal uma vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal a cada três semanas. Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são 20 administrados simultaneamente, e neste caso a dosagem de cada anticorpo administrado enquadra-se nas faixas indicadas. O anticorpo é geralmente administrado em ocasiões múltiplas. Intervalos entre dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanalmente, mensalmente, a cada 25 três meses ou anualmente. Os intervalos podem também ser irregulares conforme indicado medindo-se os níveis sangüíneos de anticorpo em relação ao antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma concentração plasmática de anticorpo de 30 cerca de 1-1000 µg/ml e em alguns métodos de cerca de 25-300 µg/ml.

Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como 35 uma formulação de liberação sustentada, onde é necessária a administração menos freqüente. A dosagem e a freqüência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. Em geral, anticorpos humanos mostram a meia-vida mais longa, seguido dos anticorpos humanizados, anticorpos

quiméricos, e anticorpos não-humanos. A dosagem e freqüência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente não freqüentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento pelo resto da vida. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes necessária até que a progressão da doença seja reduzida ou extinta, e preferivelmente até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Em seguida, o paciente pode receber um regime profilático.

Os níveis efetivos de dosagem dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem variar de forma a se obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração específicos, sem ser tóxica para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições específicas da presente invenção empregadas, ou do éster, sal ou amida das mesmas, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto específico que estiver sendo empregado, da duração do tratamento, de outros fármacos, compostos e/ou materiais utilizados em combinação com as composições específicas empregadas, da faixa etária, do sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico prévio do paciente em tratamento, e fatores similares bastante conhecidos no estado da técnica médica.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-PD-L1 da invenção preferivelmente resulta em redução na severidade dos sintomas da doença, em um aumento na freqüência e duração dos períodos livres de sintomas da doença, ou na prevenção de deficiência ou incapacidade

devido à aflição causada pela doença. Por exemplo, para o tratamento de tumores mediados por PD-L1+, uma "dosagem terapeuticamente eficaz" preferivelmente inibe o crescimento celular ou o crescimento tumoral em cerca de 5 pelo menos 20%, mais preferivelmente em cerca de pelo menos 40%, ainda mais preferivelmente em cerca de pelo menos 60%, e ainda mais preferivelmente em cerca de pelo menos 80% em relação aos indivíduos não tratados. A capacidade de um composto inibir o crescimento tumoral 10 pode ser avaliada num sistema de modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, essa propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando-se a capacidade de o composto inibir o crescimento celular, tal inibição podendo ser medida *in vitro* através de ensaios conhecidos no estado da técnica. 15 Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode reduzir o tamanho do tumor, ou de outra forma melhorar sintomas num indivíduo. Um habilitado na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com 20 base em fatores tais como, tamanho (compleição física) do indivíduo, severidade dos sintomas do indivíduo, e a composição específica ou via de administração escolhida. Uma composição da presente invenção pode ser administrada 25 através de uma ou mais vias de administração utilizando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos no estado da técnica. Conforme será apreciado pelos habilitados na técnica, a via e/ou o modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Vias preferidas de administração para 30 anticorpos da invenção incluem as vias intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras vias parenterais de administração, como por exemplo, através de injeção ou infusão. A expressão "administração parenteral" conforme aqui 35 utilizada significa os modos de administração que não a administração enteral e tópical, geralmente através de injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão

intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide,
5 intraespinhal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser administrado através de uma via não parenteral, tal como a via de administração tópica, epidérmica ou mucosal, por exemplo, por via intranasal, oral, vaginal, retal,
10 sublingual ou tópica.

Os compostos ativos podem ser preparados com portadores que protejam o composto contra liberação rápida, tal como formulação de liberação controlada, incluindo os implantes, adesivos transdérmicos, e sistemas de
15 liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliorthoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou
20 geralmente conhecidos no estado da técnica. Vide, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc.New York, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com
25 dispositivos médicos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, numa concretização preferida, uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos descritos nas patentes americanas Nos.
30 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos úteis na presente invenção incluem: patente americana No. 4.487.603 que descreve uma bomba de micro-infusão implantável para dispensar medicação a uma taxa controlada; a patente americana No. 4.486.194, que descreve um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; a patente americana No.
35

4.447.233, que descreve uma bomba de infusão de medicação para liberar medicação a uma taxa de infusão precisa; a patente americana 4.447.224 que descreve um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para liberação contínua de fármaco; a patente americana No. 4.439.196 que descreve um sistema osmótico de liberação de fármaco tendo compartimentos de câmaras múltiplas; e a patente americana No. 4.475.196, que descreve um sistema osmótico de liberação de fármaco. Essas patentes são aqui incorporadas por referência. Muitos outros desses implantes, sistemas de liberação, e módulos são conhecidos no estado da técnica.

Em certas concretizações, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para garantir a distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hemato-encefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção atravessem a barreira hemato-encefálica (BBB) (se desejado) eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de preparação de lipossomas, vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são seletivamente transportadas para dentro de células ou órgãos específicos, para assim aumentar a liberação direcionada de fármaco (vide, por exemplo, V.V.Ranade (1989) *J.Clin.Pharmacol.*29:685). Porções direcionadoras representativas incluem o folato ou a biotina (vide, por exemplo, a patente americana No. 5.416.016 de Low et al.); manosídeos (Umezawa et al., (1988) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 153:1038); anticorpos (P.G.Bloeman et al.(1995) *FEBS Lett.*357:140; M.Owais et al.(1995) *Antimicrob.Aagents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A de surfactante (Briscoe et al.(1995) *Am.J.Physiol.*1233:134); p120 (Schreier et al.(1994) *J.Biol.Chem.*269:9090); vide também K.Keinanen; M.L.Laukkanen (1994) *FEBS Lett.*346:123; J.J.Killion; I.J.Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos e Métodos da Invenção

Os anticorpos, composições de anticorpos e métodos da presente invenção possuem numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, detecção de PD-L1 ou intensificação da resposta imune através de bloqueio de PD-L1. Numa concretização preferida, os anticorpos da presente invenção são anticorpos humanos. Por exemplo, essas moléculas podem ser administradas a células em cultura, *in vitro* ou *ex vivo*, ou em indivíduos humanos, como por exemplo, *in vivo*, para intensificar a imunidade numa variedade de situações. Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção provê um método para modificar uma resposta imune num indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, da invenção, de forma que a resposta imune no indivíduo seja modificada. Preferivelmente, a resposta é intensificada, estimulada ou regulada para cima.

Conforme aqui utilizado, o termo "indivíduo" pretende incluir animais humanos e não-humanos. Animais não-humanos incluem todos os vertebrados, como por exemplo, mamíferos e não-mamíferos, tais como os primatas não-humanos, carneiros, cães, vacas, cavalos, frangos, anfíbios, e répteis, embora os mamíferos sejam preferidos, tais como primatas não-humanos, carneiros, cães, gatos, vacas e cavalos. Indivíduos preferidos incluem pacientes humanos que precisem de intensificação de uma resposta imune. Os métodos são especialmente apropriados para tratar pacientes humanos que apresentam um distúrbio que possa ser tratado aumentando-se a resposta imune mediada por célula T. Numa concretização específica, os métodos são especialmente apropriados para tratamento de câncer *in vivo*. Para obter a intensificação de imunidade antígeno-específica, os anticorpos anti-PD-L1 podem ser administrados juntamente com um antígeno de interesse. Quando os anticorpos ao PD-L1 são administrados juntamente com outro agente, os dois podem ser administrados em qualquer ordem ou simultaneamente.

A invenção provê ainda métodos para detectar a presença de antígeno a PD-L1 humano numa amostra, ou para medir a quantidade de antígeno ao PD-L1 humano, compreendendo contatar a amostra e uma amostra de controle com um anticorpo monoclonal humano, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, que liga-se especificamente a PD-L1 humano, sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou a porção do mesmo e o PD-L1 humano. A formação de um complexo é então detectada, sendo que a formação de um complexo diferente entre a amostra comparada com a amostra de controle indica a presença de antígeno ao PD-L1 humano na amostra.

Câncer

O bloqueio de PD-L1 por anticorpos pode intensificar a resposta imune a células cancerosas num paciente. O PD-L1 não é expressado em células humanas normais, sendo porém abundante numa variedade de cânceres humanos (Dong et al. (2002) *Nat Med* 8:787-9). A interação entre PD-1 e PD-L1 resulta numa redução de linfócitos infiltrantes de tumor, uma redução na proliferação mediada por receptor de células T e evasão imune pelas células cancerosas (Dong et al. (2003) *J Mol Med* 81:281-7; Blank et al. (2004) *Cancer Immunol. Immunother.* [epub]; Konish et al. (2004) *Clin Cancer Res.* 10:5094-100). A supressão imune pode ser revertida inibindo-se a interação local de PD-L1 com PD-1 e o efeito é aditivo quando a interação de PD-L2 com PD-1 é também bloqueada (Iwai et al. (2002) *PNAS* 99:12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66). Um anticorpo anti-PD-L1 pode ser usado isoladamente para inibir o crescimento de tumores cancerosos. Alternativamente, um anticorpo anti-PD-L1 pode ser usado em conjunto com outros agentes imunogênicos, tratamentos padrão de câncer ou outros anticorpos, conforme descrito abaixo.

Conseqüentemente, em uma concretização, a invenção provê um método para inibir o crescimento de células tumorais num indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-

PD-L1, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo anti-PD-L1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos humanos PD-L1 anti-humanos aqui descritos). Adicionalmente, ou 5 alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-L1 quimérico ou humanizado.

Cânceres preferidos cujo crescimento pode ser inibido utilizando-se os anticorpos da invenção incluem cânceres tipicamente responsivos à imunoterapia. Exemplos não 10 restritivos de cânceres preferidos para tratamento incluem melanoma (ex: melanoma maligno metastático), câncer renal, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de cólon e câncer de pulmão. Exemplos de outros cânceres que podem ser tratados utilizando os métodos da invenção 15 incluem câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer na região anal, câncer de estomago, câncer testicular, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma 20 do endométrio, carcinoma da cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula paratiróide, câncer da glândula 25 adrenal, sarcoma de tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, leucemias crônicas ou agudas incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfooblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, tumores sólidos em crianças, linfoma 30 linfocítico, câncer da bexiga, câncer do rim ou do ureter, carcinoma da pelve renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), linfoma primário do SNC, angiogênese tumoral, tumor do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, adenoma pituitário, sarcoma de Kaposi, 35 câncer epidermóide, câncer de células escamosas, linfoma de células T, cânceres induzidos pelo ambiente, incluindo os induzidos por amianto, e combinações de ditos

cânceres. A presente invenção é também útil no tratamento de câncer metastático, especialmente cânceres metastáticos que expressam PD-L1 (Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17:133-144).

5 Opcionalmente, os anticorpos ao PD-L1 podem ser combinados com um agente imunogênico, tais como células cancerosas,抗ígenos tumorais purificados (incluindo proteínas recombinantes, peptídeos, e moléculas de carboidrato), células, e células transfectadas com genes
10 que codificam citocinas imunoestimulantes (He et al. (2004) J.Immunol.173:4919-28). Exemplos não restritivos de vacinas contra tumor que podem ser usadas incluem peptídeos de抗ígenos de melanoma, tais como peptídeos de gp100,抗ígenos MAGE, Trp-2, MART1 e/ou
15 tirosinase, ou células tumorais transfectadas para expressar a citocina GM-CSF (discutidas mais detalhadamente abaixo).

Em humanos, alguns tumores demonstraram ser imunogênicos, tais como os melanomas. É previsto que ao aumentar o
20 limiar de ativação de célula T através de bloqueio de PD-L1, podemos esperar ativar as respostas ao tumor no hospedeiro.

O bloqueio de PD-L1 é provavelmente o mais eficaz quando combinado com um protocolo de vacinação. Muitas
25 estratégias experimentais para vacinação contra tumores têm sido planejadas (vide Rosenberg, S.2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D-2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K.2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; vide também Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch.61, pp.3023-3043 in DeVita, V. et al.(eds.)1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition). Em uma dessas estratégias, uma vacina é
30 preparada utilizando-se células tumorais autólogas ou alogeneicas. Essas vacinas celulares demonstraram ser as mais eficazes quando as células tumorais são transduzidas
35

para expressar GM-CSF. GM-CSF demonstrou ser um potente ativador de apresentação de antígeno para vacinação contra tumor (Dranogg et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-43).

5 O estudo de expressão gênica e padrões de expressão gênica em larga escala em diversos tumores levou à definição dos denominados antígenos tumor-específicos. (Rosenberg, SA, (1999) Immunity 10:281-7). Em muitos casos, esses antígenos tumor-específicos são antígenos de diferenciação expressados nos tumores e na célula da qual se originou o tumor, como por exemplo, os antígenos malenocitários gp100, antígenos MAGE, e Trp-2. O mais importante é que muitos desses antígenos demonstram poder ser alvos de células T tumor-específicas encontradas no hospedeiro. O bloqueio de PD-L1 pode ser usado em conjunto com uma coleção de proteínas recombinantes e/ou peptídeos expressados num tumor para gerar uma resposta imune a essas proteínas. Essas proteínas são normalmente visualizadas pelo sistema imune como auto-antígenos e são, portanto, tolerantes a eles. O antígeno tumoral pode também incluir a proteína telomerase, que é necessária para a síntese de telômeros de cromossomos e que é expressada em mais de 85% de cânceres humanos e em somente um número limitado de tecidos somáticos (Kim, N et al. (1994) Science 266:2011-2013). (Esses tecidos somáticos podem ser protegidos do ataque imune através de diversos meios). O antígeno tumoral pode também ser um "neo-antígeno" expressado em células cancerosas devido às mutações somáticas que alteram a seqüência de proteína ou que criam proteínas de fusão entre duas seqüências não relacionadas (ou seja, ber-abl no cromossoma Filadélfia) ou idiotípico de células B tumorais.

Outras vacinas contra tumor podem incluir as proteínas de vírus implicados em cânceres humanos tal como o Papiloma Vírus Humano (HPV), Vírus da Hepatite (HBV e HCV) e Herpes Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KHSV). Outra forma de antígeno tumor-específico que pode ser usada

juntamente com o bloqueio de PD-L1 são as proteínas de choque térmico purificadas (HSP) isoladas do próprio tecido tumoral. Essas proteínas de choque térmico contém fragmentos de proteínas das células tumorais e essas HSPs 5 são altamente eficientes na liberação às células apresentadoras de antígeno para produzir imunidade ao tumor (Suot, R & Srivastava, P (1995) Science 269:1585-1588; Tamura, Y. et al. (1997) Science 278:117-120).

Células dendríticas (DC) são células apresentadoras de 10 antígenos potentes que podem ser usadas para produzir respostas antígeno-específicas. As DCs podem ser produzidas ex vivo e carregadas com diversos antígenos de proteína e peptídeo, bem como com extratos de célula tumoral (Nestle, F. et al. (1998) Nature Medicine 4:328-332). As DCs podem também ser transduzidas por meios 15 genéticos para expressar esses antígenos tumorais. As DCs também foram fundidas diretamente em células tumorais para fins de imunização (Kugler, A. et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). Como método de vacinação, a 20 imunização com DC pode ser eficazmente combinada com bloqueio de PD-L1 para ativar respostas anti-tumor mais potentes.

O bloqueio de PD-L1 pode também ser combinado com tratamentos padrão para câncer. O bloqueio de PD-L1 pode 25 ser eficazmente combinado com regimes quimioterapêuticos. Nesses casos, pode ser possível reduzir a dose do reagente quimioterapêutico administrado (Mokyr, M. et al. (1998) Cancer Research 58:5301-5304). Um exemplo de tal combinação é um anticorpo anti-PD-L1 em combinação 30 com decarbazina para o tratamento de melanoma. Outro exemplo de tal combinação é um anticorpo anti-PD-L1 em combinação com interleucina-2 (IL-2) para o tratamento de melanoma. O raciocínio científico a respeito do uso combinado de bloqueio de PD-L1 e quimioterapia é que a 35 morte celular, que é consequência da ação citotóxica da maioria dos compostos quimioterapêuticos, poderia resultar em níveis aumentados antígeno tumoral na via de

apresentação de抗ígenos. Outras terapias de combinação que podem resultar em sinergia com bloqueio de PD-L1 através de morte celular são a radiação, cirurgia, e privação hormonal. Cada um desses protocolos cria uma fonte de抗ígeno tumoral no hospedeiro. Os inibidores de angiogênese podem também ser combinados com bloqueio de PD-L1. A inibição de angiogênese leva à morte das células tumorais que poderiam alimentar o抗ígeno tumoral nas vias de apresentação de抗ígeno no hospedeiro.

Os anticorpos bloqueadores de PD-L1 podem também ser usados em combinação com anticorpos biespecíficos que direcionam células efetoras de expressão de receptor Fc alfa ou Fcγ a células tumorais (vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 5.922.845 e 5.837.243).

Anticorpos biespecíficos podem ser usados para direcionar dois抗ígenos separados. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos de receptor anti-Fc/抗ígeno anti-tumoral (ex: Her-2/neu) têm sido usados para direcionar macrófagos para os sítios do tumor. Esse direcionamento pode ativar de forma mais eficaz as respostas tumor-específicas. O braço de célula T dessas respostas seria aumentado mediante o uso de bloqueio de PD-L1. Alternativamente, o抗ígeno pode ser liberado diretamente às DCs através do uso de anticorpos biespecíficos que ligam-se ao抗ígeno tumoral e a um marcador de superfície celular específico de célula dendrítica.

Os tumores escapam (evasão tumoral) da vigilância imunológica do hospedeiro através de uma ampla variedade de mecanismos. Muitos desses mecanismos podem ser dominados pela inativação de proteínas que são expressadas pelos tumores e que são imunossupressores. Incluem, entre outros, TGF-beta (Kehrl, J. et al. (1986) J.Exp.Med.163:1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) Immunology Today 13:198-200) e ligante Fas (Hahne, M. et al. (1996) Science 274:1363-1365). Os anticorpos contra essas entidades podem ser usados em

combinação com anti-PD-L1 para contrapor-se aos efeitos do agente imunossupressor e favorecer as respostas imunes ao tumor pelo hospedeiro.

Outros anticorpos que podem ser usados para ativar a responsividade imune no hospedeiro podem ser usados em combinação com anti-PD-L1 e incluem moléculas sobre a superfície de células dendríticas que ativam a função DC e apresentação de抗ígenos. Os anticorpos anti-CD40 podem substituir eficazmente a atividade de célula T auxiliar (Ridge, J. et al. (1998) *Nature* 393:474-478) e podem ser usados juntamente com os anticorpos PD-L1 (Ito, N. et al. (2000) *Immunobiology* 201(5)527-40). Os anticorpos ativadores a moléculas co-estimuladoras de célula T tais como OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *Immunol.* 164:2160-2169), 4-1BB (Melero, I et al. (1997) *Nature Medicine* 3:682-685 (1997) e ICOS (Hutloff A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) bem como anticorpos que bloqueiam a atividade de moléculas co-estimuladoras negativas tais como CTLA-4 (ex: patente americana No. 5.811.097) ou BTLA (Watanabe, N. et al. (2003) *Nat Immunol.* 4:670-9), B7-H4 (Sica, GL et al. (2003) *Immunity* 18:849-61) podem também prover níveis aumentados de ativação de célula T.

O transplante de medula óssea está sendo utilizado atualmente para tratar uma variedade de tumores de origem hematopoiética. Embora a doença enxerto versus hospedeiro seja uma consequência desse tratamento, o benefício terapêutico pode ser obtido de respostas enxerto vs. tumor. O bloqueio de PD-L1 pode ser usado para aumentar a eficácia das células T tumor-específicas enxertadas no doador.

Também existem diversos protocolos experimentais de tratamento que envolvem ativação ex vivo e expansão de células T antígeno-específicas e transferência adotiva dessas células para receptores para obter células T antígeno-específicas contra tumor (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285:546-51). Esses métodos

podem também ser usados para ativar as respostas de célula T a agentes infecciosos tais como CMV. Espera-se que a ativação ex-vivo na presença de anticorpos anti-PD-L1 aumente a freqüência e atividade das células T transferidas adotivamente.

Doenças Infecciosas

Outros métodos da invenção são usados para tratar pacientes que foram expostas a toxinas ou patógenos específicos. Conseqüentemente, outro aspetto da invenção provê um método para tratar uma doença infecciosa num indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo um anticorpo anti-PD-L1, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, de forma que o indivíduo seja tratado da doença infecciosa. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano anti-PD-L1 anti-humano (tal como qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 humanos aqui descritos). Adicionalmente, ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

Similar à sua aplicação em tumores, conforme acima discutido, o bloqueio de PD-L1 mediado por anticorpo pode ser usado isoladamente, ou como adjuvante, em combinação com vacinas, para estimular a resposta imune a patógenos, toxinas, e auto-antígenos. Exemplos de patógenos para os quais esse método terapêutico pode ser especialmente útil, incluem patógenos para os quais não existe atualmente nenhuma vacina eficaz, ou patógenos para os quais as vacinas convencionais não são completamente eficazes. Incluem, porém não se restringem a HIV, Hepatite (A, B e C), Gripe, Herpes, Giardia, Malária, Leishmania, *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. O bloqueio de PD-L1 é especialmente útil contra infecções estabelecidas por agentes tais como HIV que apresentam抗ígenos alterados durante o curso das infecções. Esses epítocos novos são reconhecidos como estranhos no momento da administração do PD-L1 anti-humano, provocando assim uma forte resposta de célula T que não é atenuada por sinais negativos através de PD-L1.

Alguns exemplos de vírus patogênicos que causam infecções tratáveis através dos métodos da invenção incluem HIV, hepatite (A, B e C), vírus da herpes (ex: VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II e CMV, vírus Epstein Barr), adenovírus, vírus da gripe (influenza), flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus Coxsackie, cornovírus, vírus sincitial respiratório, vírus de caxumba, rotavírus, vírus de sarampo, vírus da rubéola, parvovírus, vírus da vacínia, vírus HTLV, vírus da dengue, papilomavírus, vírus de molusco, poliovírus, vírus da raiva, vírus JC e vírus de encefalite arboviral.

Alguns exemplos de bactérias patogênicas que causam infecções tratáveis através dos métodos da invenção incluem clamídia, bactéria riquétsia, micobactéria, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos, e conecocos, klebsiela, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétano, botulismo, antrax, peste, leptospirose, e bactérias da doença de Lyme.

Alguns exemplos de fungos patogênicos que causam infecções tratáveis através dos métodos da invenção incluem *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), gênero *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasilienses*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Alguns exemplos de parasitas patogênicos que causam infecções tratáveis através de métodos da invenção incluem *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Em todos os métodos acima citados, o bloqueio de PD-L1 pode ser combinado com outras formas de imunoterapia tal

como tratamento com citocinas (ex: interferons, GM-CSF, G-CSF, IL-2) ou terapia com anticorpo biespecífico, que provê apresentação intensificada de抗ígenos tumorais (vide, por exemplo, Holliger (1993)

5 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448; Poljak (1994)
Structure 2:1121-1123).

Reações Autoimunes

Os anticorpos anti-PD-L1 podem provocar e ampliar as respostas autoimunes. De fato, a indução de respostas anti-tumorais utilizando vacinas de célula tumoral e peptídeo revela que muitas respostas anti-tumorais envolvem anti-auto reatividades (despigmentação observadas em melanoma B16 modificados com anti-CTLA-4 + GM-CSF em van Elsas et al. supra; despigmentação em camundongos vacinados com Trp-2 (Overwijk, W. et al. (1999) Proc. Natl.Acad.Sci. USA 96:2982-2987); prostatite autoimune evocada por vacinas de célula tumoral TRAMP (Hurwitz, A. (2000) supra), vacinação de melanoma com antígeno peptídico e vitiligo observados em ensaios clínicos humanos (Rosenberg, SA e White, DE (1996) J.Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(1)81-4).

Portanto, é possível considerar o uso de bloqueio de anti-PD-L1 em conjunto com diversas auto-proteínas para projetar protocolos de vacinação para eficientemente gerar respostas imunes contra essas auto-proteínas para tratamento de doenças. Por exemplo, a doença de Alzheimer envolve acúmulo inapropriado de peptídeo A β em depósitos amilóides no cérebro; as respostas do anticorpo contra amilóide podem remover (limpar) esses depósitos amilóides (Schenk et al. (1999) Nature 400: 173-177).

Outras auto-proteínas podem também ser usadas como alvos tais como IgE para o tratamento de alergia e asma, e TNF α para artrite reumatóide. Finalmente, as respostas de anticorpo a diversos hormônios podem ser induzidas pelo uso do anticorpo anti-PD-L1. Respostas neutralizantes de anticorpo a hormônios reprodutivos podem ser usadas para contraceção. A resposta neutralizante de anticorpo a

hormônios e outros fatores solúveis necessários para o crescimento de tumores específicos podem também ser considerados como alvos possíveis de vacinação.

Métodos análogos conforme acima descritos para uso de 5 anticorpo anti-PD-L1 podem ser usados para indução de respostas autoimunes terapêuticas para tratar pacientes com acúmulo inapropriado de outros auto-antígenos, tais como depósitos amilóides, incluindo A β em doença de Alzheimer, citocinas tais como TNF α e IgE.

10 Vacinas

Os anticorpos anti-PD-L1 podem ser usados para estimular as respostas imunes antígeno-específicas mediante a coadministração de um anticorpo anti-PD-L1 com um antígeno de interesse (ex: uma vacina). Conseqüentemente, 15 em outro aspecto, a invenção provê um método para intensificar uma resposta imune a um antígeno num indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo: (i) o antígeno; e (ii) um anticorpo anti-PD-L1 ou porção ligante ao antígeno do mesmo, de forma que uma resposta 20 imune ao antígeno seja aumentada no indivíduo. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano PD-L1 anti-humano (tal como qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 humanos aqui descritos). Adicionalmente, ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo 25 químérico ou humanizado. O antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, ou um antígeno de um patógeno. Exemplos não restritivos de tais抗ígenos incluem os discutidos nas seções acima, tais como os抗ígenos 30 tumorais (ou vacinas contra tumor) acima discutidos, ou抗ígenos dos vírus, bactérias ou outros patógenos acima descritos.

Os anticorpos anti-PD-L1 podem também ser usados para abolir efeitos secundários associados com doenças tais 35 como doença debilitante com colite e supressão de célula T (Kanai et al. (2003) J.Immunol. 171:4156-63). Conseqüentemente, em outro aspecto a invenção provê um

método para abolir a infiltração leucocitária, reduzir a produção de IFN- γ , IL-2 e IFN- α através de células T. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano PD-L1 anti-humano (tal como qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 humano anteriormente descritos). Adicionalmente, ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

Os anticorpos anti-PD-L1 podem também ser usados para tratar doenças tais como doenças inflamatórias crônicas, tais como líquen plano, uma doença mucocutânea inflamatória crônica mediada por célula T (Youngnak-Pibooratanakit et al. (2004) Immunol Letters 94:215-22). Conseqüentemente, em outro aspecto a invenção provê um método para abolir a doença inflamatória crônica através de células T. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano PD-L1 anti-humano (tal como qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 humanos aqui descritos). Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

Vias apropriadas de administração das composições de anticorpo (ex: anticorpos monoclonais humanos, moléculas multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção *in vivo* e *in vitro* são bastante conhecidas no estado da técnica e podem ser selecionadas pelos habilitados na técnica. Por exemplo, as composições de anticorpo podem ser administradas através de injeção (ex: intravenosa ou subcutânea). Dosagens apropriadas das moléculas usadas dependerão da idade e do peso do indivíduo e da concentração e/ou formulação da composição de anticorpos.

Conforme previamente descrito, os anticorpos anti-PD-L1 humanos da invenção podem ser coadministrados com um ou outros agentes terapêuticos, como por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressor. O anticorpo pode ser ligado ao agente (na forma de um imunocomplexo) ou pode ser administrado separadamente do agente. No último caso (administração

separada) o anticorpo pode ser administrado antes, após ou concomitantemente com o agente ou pode ainda ser coadministrado com outras terapias conhecidas, como por exemplo, uma terapia anti-câncer, como por exemplo,
5 radiação. Tais agentes terapêuticos incluem, entre outros, agentes anti-neoplásicos tal como doxorubicina (adriamicina), cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, cloramبucil e ciclofosfamida hidroxiuréia que, por si só, são eficazes apenas a níveis tóxicos ou
10 subtóxicos para o paciente. A cisplatina é intravenosamente administrada como uma dose de 100 mg/dose uma vez a cada quatro meses e a adriamicina é administrada intravenosamente como uma dose de 60-75 mg/ml uma vez a cada 21 dias. A coadministração dos
15 anticorpos anti-PD-L1 humanos, ou os fragmentos ligantes ao antígeno dos mesmos, da presente invenção com agentes quimioterapêuticos provê dois agentes anti-câncer que opera através de diferentes mecanismos que produzem um efeito citotóxico nas células tumorais humanas. Tal
20 coadministração pode resolver problemas devido ao desenvolvimento de resistência a fármacos ou a uma alteração na antigenicidade das células tumorais o que poderia torná-las não reativas ao anticorpo.

Também estão incluídos no escopo da presente invenção
25 kits compreendendo as composições de anticorpo da invenção (ex: anticorpos humanos, moléculas biespecíficas ou multiespecíficas ou imunoconjugados) e instruções para uso. O kit pode ainda conter pelo menos um reagente adicional, ou um ou mais anticorpos humanos adicionais da
30 invenção (ex: um anticorpo humano tendo uma atividade complementar que se liga a um epítopo no antígeno PD-L1 diferente do primeiro anticorpo humano). Kits tipicamente incluem um rótulo indicando o uso pretendido do conteúdo do kit. O termo rótulo inclui qualquer texto escrito ou
35 material registrado fornecido no kit, ou que de outra forma acompanhe o kit.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos exemplos a

seguir que não devem ser interpretados como restritivos. O conteúdo de todas as figuras e todas as referências, patentes, e pedidos de patente publicados citados em toda o pedido são aqui expressamente incorporados por
5 referência.

Exemplos

Exemplo 1 : Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos Contra PD-L1

Antígeno

10 Protocolos de imunização utilizados como antígeno (i) uma proteína de fusão recombinante compreendendo a porção extracelular de PD-L1, e (ii) PD-L1 de extensão completa ligado a membrana. Ambos os抗ígenos foram gerados através de métodos de transfecção recombinante numa
15 linhagem de célula CHO.

Camundongo Transgênico (colônia de KM-Mouse®)

Anticorpos monoclonais totalmente humanos contra PD-L1 foram preparados utilizando a cepa KM de camundongos transcromossômicos transgênicos, que expressa os genes de
20 antícorpo humano. Nessa cepa de camundongo, o gene de cadeia leve kappa de camundongo endógeno foi homozigotamente rompido conforme descrito em Chen et al. (1993) EMBO J.12:811-820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno foi homozigotamente rompido conforme
25 descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Além disso, essa cepa de camundongo carrega um transgene de cadeia leve kappa humano, o KCo5, conforme descrito em Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 e um transcromossomo SC20, conforme descrito na Publicação
30 PCT WO 02/43478.

Imunizações de KM-MOUSE®

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos contra PD-L1, um grupo de camundongos da cepa KM-MOUSE® foram imunizados com células CHO transfectadas com PD-L1-
35 Ig e PD-L1. Esquemas gerais de imunização para camundongos HuMab são descritos em Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et

al. (1996) Nature Biotechnology 14;845-851 e publicação PCT WO 98/24884. Os camundongos tinham de 6-16 semanas de vida quando da primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada (5-50 μ g) de antígeno PD-L1-Ig e 5 - 10x10⁶ células foi utilizada para imunizar os camundongos HuMab intraperitonealmente (IP), subcutaneamente (Sc) ou através de injeção na pata.

Os camundongos transgênicos foram imunizados duas vezes com antígeno em adjuvante de Freund completo ou adjuvante de Ribi IP, seguido de 3-21 dias IP (até um total de 11 imunizações) com o antígeno em adjuvante de Freund ou Ribi incompleto. A resposta imune foi monitorada através de sangramentos retroorbitais. O plasma foi examinado através do teste ELISA (conforme descrito abaixo) e os camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-PD-L1 foram usados para as fusões. Os camundongos foram receberam antígeno intravenosamente 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Tipicamente, foram realizadas de 10-35 fusões para cada antígeno.

Diversas dúzias de camundongos foram imunizados para cada antígeno.

Seleção de um KM-MOUSE® Produtor de Anticorpos Anti-PD-L1:

Para selecionar camundongos HuMab produtores de anticorpos que se ligam a PD-L1, os soros de camundongos imunizados foram testados através de um teste ELISA conforme descrito por Fishwild, D. et al. (1996), supra. Resumidamente, as placas de microtitulação foram revestidas com proteína de fusão PD-L1 recombinante purificada de células CHO transfetadas a 1-2 μ g/ml em PBS, 100 μ l/cavidades incubadas a 4°C da noite para o dia e então bloqueadas com 200 μ l/cavidade de soro fetal bovino a 5% em PBS/Tween (0,05%). As diluições de soros de camundongos imunizados contra PD-L1 foram adicionadas a cada cavidade e incubadas durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e então incubadas com um anticorpo policlonal

IgG anti-humano de cabra conjugado com horseradish peroxidase (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22mg/ml) e analisadas através de 5 espectrofotômetro a OD 415-495. Os camundongos que desenvolveram os títulos mais elevados de anticorpos ao anti-PD-L1 foram usados para as fusões. As fusões foram realizadas conforme descrito abaixo e os sobrenadantes de hibridoma foram testados quanto à atividade anti-PD-L1 10 através de teste ELISA.

Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais Humanos contra PD-L1

Esplenócitos de camundongo, isolados de camundongo KM foram fundidos com PEG numa linhagem celular de mieloma 15 de camundongo com base em protocolos padrão. Os hibridomas resultantes foram então examinados quanto à produção de anticorpos antígeno-específicos. Suspensões de células simples de esplenócitos de camundongos imunizados foram fundidas a um quarto do número de 20 células de mieloma de camundongo não-secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com 50% PEG (Sigma). As células foram plaqueadas em aproximadamente 1×10^5 /cavidade em placa de microtitulação de fundo plano, seguido de cerca de duas semanas de incubação em meio seletivo contendo soro fetal 25 bovino a 10%, meio condicionado P388D1 a 10% (ATCC, CRL TIB-63), 3-5% origem (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013 com alta glicose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptopetanol, 50 mg/ml gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as 30 células foram cultivadas em meio no qual HAT foi substituído por HT. Cavidades individuais foram então examinadas através de teste ELISA (descrito acima) para detectar anticorpos IgG monoclonais anti-PD-L1 humanos. Ocorrido o crescimento extensivo do hibridoma, o meio 35 foi monitorado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpo foram replaqueados, novamente examinados e, se ainda positivos para IgG humana, os

anticorpos monoclonais anti-PD-L1 foram subclonados pelo menos duas vezes limitando-se a diluição. Os subclones estáveis foram então cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização posterior.

Os clones de hibridoma 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 foram selecionados para análise adicional.

Exemplo 2 : Caracterização Estrutural de Anticorpos Monoclonais Humanos 3G10, 12A4 e 10A5.

As seqüências de cDNA codificando as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 foram obtidas dos hibridomas 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 respectivamente, utilizando-se as técnicas PCR padrão e foram seqüenciadas utilizando técnicas de seqüenciamento de DNA padrão.

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 3G10 são mostradas na Figura 1A e em SEQ ID NO: 81 e 1, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e de aminoácido da região variável de cadeia leve de 3G10 são mostradas na Figura 1B e em SEQ ID NO: 91 e 11, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 3G10 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 3G10 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-18, um segmento D indeterminado e um segmento J_H de linha germinal humana J_H 6b. O alinhamento da seqüência V_H 3G10 com a seqüência V_H 1-18 de linha germinal é mostrado na Figura 11. Outra análise da seqüência V_H 3G10 utilizando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3, conforme mostrado nas Figuras 1A e 11, e nas SEQ ID NOs: 21, 31, e 41 respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia

leve 3G10 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 3G10 utiliza um segmento V_L de V_K L6 de linha germinal humana e um segmento J_K de linha germinal humana
5 JK 1. O alinhamento da seqüência 3G10 VL com a seqüência V_K L6 de linha germinal é mostrado na Figura 21. Outra análise da seqüência V_L 3G10 utilizando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram
10 as Figuras 1B e 21, e nas SEQ ID NOS: 51, 61 e 71, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 12A4 são mostradas na Figura 2A e na SEQ ID No.82 e na SEQ ID NO:82 e 2,
15 respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e de aminoácido da região variável de cadeia leve de 12A4 são mostradas na Figura 2B e na SEQ ID NO: 92 e 12, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 12A4 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 12A4 utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 3-10, e um segmento J_H da linha germinal humana JH
25 6b. O alinhamento da seqüência 12A4 V_H com a seqüência V_H 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 12. Outra análise da seqüência V_H 12A4 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme
30 mostram as Figuras 2A e 12, e as SEQ ID NOS: 22, 32, e 42, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 12A4 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 12A4 utiliza um segmento V_L da linha germinal humana V_K L6 e um segmento J_K da linha germinal humana JK1. O alinhamento da seqüência V_L 12A4 com a seqüência

de linha germinal V_K L6 é mostrado na Figura 22. Outra análise da seqüência V_L 12A4 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram 5 as Figuras 2B e 22, e as SEQ ID NOS: 52, 62 e 72, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 10A5 são mostradas na Figura 10 3A e nas SEQ ID NO.83 e 3, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 10A5 são mostradas na Figura 3B e SEQ ID NO: 93 e 13, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 10A5 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada 15 de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 10A5 utiliza um segmento V_H da linha germinal humana V_H 1-3, um segmento D da linha germinal humana 4b. O alinhamento da seqüência VH 10A5 com a seqüência V_H 20 1-3 de linha germinal é mostrado na Figura 13. Outra análise da seqüência V_H 10A5 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostrado nas Figuras 3A e 13, e nas SEQ ID NOS: 22, 33, e 25 43, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 10A5 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 10A5 utiliza um segmento V_L de linha germinal 30 humana V_K L15 e um segmento JK de linha germinal humana JK 2. O alinhamento da seqüência V_L 10A5 com a seqüência de linha germinal V_K L15 é mostrado na Figura 23. Outra análise da seqüência V_L 10A5 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das 35 regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 3B e 23, e as SEQ ID NOS: 53, 63 e 73, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 5F8 são mostradas na Figura 4A e nas SEQ ID NOS: 84 e 4, respectivamente.

5 As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 5F8 são mostradas na Figura 4B e nas SEQ ID NOS: 94 e 14, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 5F8 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que
10 a cadeia pesada 5F8 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 6-13, e um segmento J_H de linha germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência V_H 5F8 com a seqüência da linha germinal V_H 1-69 é mostrado na Figura 14. Outra
15 análise da seqüência V_H 5F8 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 nas Figuras 4A e 14, e nas SEQ ID NOS: 24, 34, e 44, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 5F8 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 5F8 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K A27 e um segmento J_K de linha germinal humana JK 1. O alinhamento da seqüência V_L 5F8 com a seqüência V_K A27 de linha germinal é mostrado na Figura 24. Outra
20 análise da seqüência V_L 5F8 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram
25 as Figuras 4B e 24, e as SEQ ID NOS: 54, 64 e 74, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 10H10, são mostradas na Figura 5A e nas SEQ ID NOS: 85 e 5, respectivamente.

35 As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 10H10, são mostradas na Figura 5B e nas SEQ ID NOS: 95 e 15, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia

pesada 10H10 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 10H10 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 3-9, um segmento D da 5 linha germinal humana 4-17, e um segmento J_H de linha germinal humana J_H 4b. O alinhamento da seqüência V_H 10H10 com a seqüência V_H 3-39 de linha germinal é mostrado na Figura 15. Outra análise da seqüência V_H 10H10 utilizando o sistema Kabat de determinação de 10 região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 5A e 15, e as SEQ ID NOS: 25, 35 e 45, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 10H10 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de 15 imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 10H10 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L15 e um segmento JK de linha germinal humana JK2. O alinhamento da seqüência V_L 10H10 com a seqüência V_K L15 da linha germinal é mostrado na Figura 20 25. Outra análise da seqüência V_L 10H10 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 5B e 25, e as SEQ ID NOS: 55, 65 e 75, respectivamente.

25 As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 1B2, são mostradas na Figura 6A e nas SEQ ID NO:86 e 6, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 1B12, são mostradas na Figura 30 6B e nas SEQ ID NOS: 96 e 16, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 1B12 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 1B12 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 3-10, e um segmento J_H de linha germinal humana J_H 6b. O alinhamento da seqüência V_H 1B12 com a seqüência V_H

1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 16. Outra análise da seqüência V_H 1B12 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 6A e 16, e as SEQ ID NOS: 26, 36 e 46, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 1B12 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 1B12 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L6 e um segmento J_K de linha germinal humana JK1. O alinhamento da seqüência V_L 1B12 com a seqüência V_K L6 de linha germinal é mostrado na Figura 26. Outra análise da seqüência V_L 1B12 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 6B e 26, e as SEQ ID NOS: 56, 66 e 76, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 7H1, são mostradas na Figura 7A e nas SEQ ID NOS: 87 e 7, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 7H1, são mostradas na Figura 7B e nas SEQ ID NOS: 97 e 17, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 7H1 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 7H1 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 3-10 e um segmento J_H de linha germinal humana JH6b. O alinhamento da seqüência V_H 7H1 com a seqüência V_H 1-69 da linha germinal é mostrado na Figura 17. Outra análise da seqüência V_H 7H1 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 7A e 17, e as SEQ ID NOS: 27, 37 e 47, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 7H1 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 13F1 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L6, e um segmento J_K de linha germinal humana JK1. O alinhamento da seqüência V_L 7H1 com a seqüência V_K L6 da linha germinal é mostrado na Figura 27. Outra análise da seqüência V_L 7H1 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das 5 regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 7B e 27, e as SEQ ID NOS: 57, 67 e 77, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 11E6, são mostradas na 10 Figura 4A e nas SEQ ID NOS: 84 e 4, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 11E6, são mostradas na Figura 4B nas SEQ ID NOS: 94 e 14, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 11E6 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 11E6 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D da linha germinal humana 6-19 e um segmento J_H de linha germinal humana JH 25 6c. O alinhamento da seqüência V_H 11E6 com a seqüência V_H 1-69 da linha germinal é mostrado na Figura 18. Outra análise da seqüência V_H 11E6 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme 30 mostram as Figuras 8A e 18, e nas SEQ ID NOS: 28, 38 e 48, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 11E6 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a 35 cadeia leve 11E6 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K A27, e um segmento J_K de linha germinal humana JK4. O alinhamento da seqüência V_L 11E6 com a seqüência

V_K A27 da linha germinal é mostrado na Figura 27. Outra análise da seqüência V_L 11E6 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram 5 as Figuras 8B e 28, e as SEQ ID NOS: 58, 68 e 78, respectivamente. Além disso, um segundo clone relacionado incluía a seqüência VK conforme mostra SEQ ID NO: 109. Esse anticorpo é aqui identificado como 11E6a.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região 10 variável de cadeia pesada de 12B7 são mostradas na Figura 9A e na SEQ ID NO: 89 e 9, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 12B7 são mostradas na Figura 9B e na SEQ ID NO: 99 e 19, respectivamente. A comparação 15 da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 12B7 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 12B7 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 1-69, um segmento D de linha germinal 20 humana 3-10, e um segmento J_H de linha germinal humana JH6b. O alinhamento da seqüência V_H 12B7 com a seqüência V_H 1-69 da linha germinal é mostrado na Figura 19. Outra análise da seqüência V_H 12B7 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das 25 regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 9A e 19, e as SEQ ID NOS: 29, 39 e 49, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 12B7 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de 30 imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia leve 12B7 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L6, um segmento JK de linha germinal humana JK5. O alinhamento da seqüência V_L 12B7 com a seqüência V_K L6 da linha germinal é mostrado na Figura 29. Outra 35 análise da seqüência V_L 12B7 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram

as Figuras 9B e 29, e as SEQ ID NOS: 59, 69 e 79, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia pesada de 13G4 são mostradas na Figura 5 10A e na SEQ ID NO: 90 e 10, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 13G4 são mostradas na Figura 10B e na SEQ ID NO: 100 e 20, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia 10 pesada 13G4 com as conhecidas seqüências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a cadeia pesada 13G4 utiliza um segmento V_H de linha germinal humana V_H 3-9, e um segmento D de linha germinal humana 15 3-9, e um segmento J_H de linha germinal humana JH4b. O alinhamento da seqüência V_H 13G4 com a seqüência V_H 3-9 da linha germinal é mostrado na Figura 20. Outra análise da seqüência V_H 13G4 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das 20 regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 10A e 20, e as SEQ ID NOS: 30, 40 e 50 respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 13G4 com as conhecidas seqüências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal humana demonstrou que a 25 cadeia leve 13G4 utiliza um segmento V_L de linha germinal humana V_K L18, e um segmento J_K de linha germinal humana JK3. O alinhamento da seqüência V_L 13G4 com a seqüência V_K L18 da linha germinal é mostrado na Figura 30. Outra 30 análise da seqüência V_L 13G4 utilizando o sistema Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostram as Figuras 10B e 30, e as SEQ ID NOS: 60, 70 e 80 respectivamente.

Exemplo 3 : Caracterização de Especificidade de Ligação e 35 Cinética de Ligação de Anticorpos Monoclonais Humanos Anti-PD-L1

Neste exemplo, a afinidade de ligação e a cinética de

ligação de anticorpos anti-PD-L1 foram examinadas através de análise Biacore. A especificidade de ligação e a competição cruzada foram examinadas através de citometria de fluxo.

5 Afinidade e Cinética de Ligação

Os anticorpos anti-PD-L1 foram caracterizados quanto às afinidades e cinéticas de ligação através de análise Biacore (Biacore AB, Uppsala, Sweden). A proteína de fusão PD-L1 humano recombinante purificado foi covalentemente ligada a um chip CM5 (chip revestido com carboxi metil dextrano) via aminas primárias, utilizando química e kit de acoplamento de amina padrão fornecido pela Biacore, até uma densidade de 562 RUs. A ligação foi medida escoando-se os anticorpos em tampão HBS EP (fornecido pela Biacore AB) a uma concentração de 133 nM a uma taxa de escoamento de 50 μ l/min. A cinética de associação antígeno-anticorpo foi seguida por 1 minuto e a cinética de dissociação foi seguida durante 1 minuto. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas a um modelo de ligação de Langmuir 1:1 utilizando software de avaliação BIA (Biacore AB). Para minimizar os efeitos de avidez no cálculo das constantes de ligação, somente o segmento inicial de dados correspondentes às fases de associação e dissociação foram usados para o ajuste. Os valores K_D , k_{on} e k_{off} que foram determinados e são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados de Ligação Biacore para anticorpos monoclonais humanos PD-L1

Amostra #	ID Amostra	Afinidade $K_{D} \times 10^{-9}$ (M)	Taxa on $K_{on} \times 10^5$ (1/MS)	Taxa off $k_{off} \times 10^{-4}$ 1/s
1	3G10	3,39	5,25	17,8
3	10A5	1,45	2,58	3,72

Dados de ligação adicionais obtidos através do método de ligação de equilíbrio e analisados no GraphPad Prizm são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados de Ligação de Equilíbrio Biacore para anticorpos monoclonais humanos PD-L1

ID clone	KD (nM) 37C	KD (nM) 25C
12A4	1,94	0,76
7H1	2,15	nd
1B12	1,38	0,61
12B7	0,83	0,53
10A5	2,41	0,57
10H10	5,93	5,48
13G4	1,87	3,3
11E6	0,53	2,9
5F8	2,17	0,75

Especificidade de Ligação através de Citometria de Fluxo Linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO) que expressam PD-L1 humano recombinante na superfície celular foram desenvolvidas e utilizadas para determinar a especificidade de anticorpos monoclonais humanos PD-L1 através de citometria de fluxo. As células de CHO foram transfectadas com plasmídeos de expressão contendo formas transmembrânicas de PD-L1 codificadoras de cDNA de extensão completa. A ligação de anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5 e 12A4 foi avaliada incubando-se as células transfectadas com o anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1. As células foram lavadas e a ligação detectada com um Ab IgG anti-humano marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). A ligação foi comparada à linhagem celular CHO parental. Os resultados são mostrados nas Figuras 32A (HuMAb 3G10), 32B (HuMAb 10A5) e 32C (HuMAb 12A4). A ligação foi também testada utilizando-se concentrações variadas de um anticorpo anti-PD-L1. Os resultados são mostrados na Figura 33. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 10A5 e 12A4 ligaram-se às células CHO transfectadas com PD-L1 numa forma dependente de concentração. Esses dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 ligam-se especificamente a PD-L1 em superfície celular.

Especificidade de Ligação por ELISA

A especificidade dos anticorpos monoclonais anti-PD-L1

foi determinada utilizando-se um ensaio ELISA padrão para ligação a uma fusão de PD-L1 humano numa região Fc de imunoglobulina.

Uma proteína de fusão-Fc de PD-L1 humano foi testada quanto à ligação contra os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 12A4 e 10A5. Foram realizados os procedimentos ELISA padrão. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 foram adicionados em diferentes concentrações. O antícorpo policlonal IgG (cadeia kappa-específica) anti-humano de cabra conjugado com enzima horseradish peroxidase (HRP) foi usado como antícorpo secundário. Os resultados constam da Figura 34. Cada um dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 12A4 e 10A5 ligou-se com alta especificidade a PD-L1.

Exemplo 4: Caracterização da ligação de antícorpo anti-PD-L1 a PD-L1 expressado na superfície celular de células T humanas e de macaco.

Anticorpos anti-PD-L1 foram testados através de citometria de fluxo para ligação a células T humanas ativadas ou de macaco cinomolgo expressando PD-L1 em sua superfície.

As células T humanas ou de macaco foram ativadas pelo antícorpo anti-CD3 para induzir a expressão de PD-L1 antes da ligação com um antícorpo monoclonal anti-PD-L1 humano. A ligação de anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 1B12, 13G4 e 12A4 foi avaliada incubando-se as células ativadas com diluições em série dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1. Um antícorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo. As células foram lavadas e a ligação detectada com um Ab de cadeia leve Ig-kappa anti-humano marcado com FITC. As análises citométricas de fluxo foram realizadas utilizando-se um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são mostrados nas Figuras 35 e 36. Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 3G10, 1B12, 13G4 e 12A4 ligaram-se a células T humanas e de macaco ativadas. Esses dados demonstram que os anticorpos

monoclonais humanos anti-PD-L1 ligam-se a PD-L1 em superfície de célula humana e de macaco cinomolgo.

Exemplo 5: Caracterização de ligação de anticorpo anti-PD-L1 a PD-L1 expressado na superfície celular de células

5 T humanas

Os anticorpos anti-PD-L1 foram testados quanto à ligação a células T humanas ativadas expressando PD-L1 em sua superfície celular através de citometria de fluxo.

As células T humanas foram ativadas através do anticorpo anti-CD3 para induzir a expressão de PD-L1 nas células T

antes da ligação com um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 humano. A ligação dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 10A5 e 12A4 foi avaliada incubando-se as células T ativadas com os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 a uma concentração de 20 µg/ml. Um anticorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo.

As células foram lavadas e a ligação detectada com um Ab IgG anti-humano marcado com FITC. As análises citométricas de fluxo foram conduzidas utilizando

20 citometria de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são mostrados nas Figuras 37A (HuMAb 3G10), 37B(HuMAb 10A5) e 37C (HuMAb 12A4). Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 3G10, 10A5 e 12A5 ligaram-se a células T humanas ativadas (linha em

25 negrito) conforme mostram os gráficos de histograma comparados com o controle (linha clara). Esses dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-

L1 ligam-se a PD-L1 em superfície celular humana.

Exemplo 6: Especificidade de Ligação através de

30 Citometria de Fluxo

A linhagem celular de carcinoma ovariano humano ES-2 que expressa PD-L1 humano na superfície celular foi usado para determinar a especificidade de anticorpos monoclonais humanos PD-L1 através de citometria de fluxo.

35 As células ES-2 foram tratadas da noite para o dia com 500 UI/mL de hIFN-γ para aumentar a expressão de PD-L1 sobre o nível basal. A ligação dos anticorpos monoclonais

humanos anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 e 5F8 foi avaliada incubando-se as células induzidas com diluições em série do anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1. As células foram lavadas e a ligação 5 detectada com um Ab IgG anti-humano marcado com Pe. As análises de citometria de fluxo foram conduzidas utilizando-se um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). A ligação foi comparada com o anticorpo de controle de isótipo. Os resultados são 10 mostrados nas Figuras 38. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 e 5F8 ligaram-se a células ES-2 induzidas por hIFN- γ numa forma dependente de concentração. Esses dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD- 15 L1 ligam-se especificamente a PD-L1 em superfície celular.

Exemplo 7: Efeito de anticorpos anti-PD-L1 humanos sobre a proliferação celular e produção de citocina numa Reação Linfocitária Mista

20 Uma reação linfocitária mista foi empregada para demonstrar o efeito de bloquear a via PD-L1/PD-1 a células efetoras linfocitárias. As células T no ensaio foram testadas quanto à proliferação, secreção de IFN- γ e secreção de IL-2 na presença ou ausência de um anticorpo 25 monoclonal humano anti-PD-L1.

As células T CD4+ humanas foram purificadas de PBMC utilizando um kit de seleção positiva de CD4+ (Dynal Biotech). Células dendríticas foram derivadas de monócitos purificados cultivados com 1000 U/ml de IL-4 e 30 500 U/ml de GM-CSF (R&D Biosystems) durante sete dias. Os monócitos foram preparados utilizando-se um kit de seleção negativa de monócitos (Mitenyi Biotech). Cada cultura continha 10^5 células T purificadas e 10^4 células dendríticas alogeneicas num volume total de 200 μ l. O 35 anticorpo monoclonal anti-PD-L1 10A5, 12A4 ou 3G10 foi adicionado a cada cultura em concentrações diferentes de anticorpo. Nenhum anticorpo ou anticorpo de controle de

isótipo foi usado como controle negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37°C. Após o dia 5, 100 µl de meio foram colhidos de cada cultura para medição de citocina. Os níveis de IFN-γ e de IL-2 foram medidos 5 utilizando kits OptEIA ELISA (BD Biosciences). As células foram marcadas com ³H-timidina, cultivadas por mais 18 horas, e analisadas quanto à proliferação celular. Os resultados são mostrados nas Figuras 39A (proliferação de célula T), 39B (secreção de IFN-γ utilizando HuMAb 10A5), 10 39C (secreção de IFN-γ utilizando HuMAb 12A4 ou 3G10) e 39D (secreção de IL-2). O anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 10A5 promove a proliferação de célula T, secreção de IFN-γ e a secreção de IL-2 numa forma dependente de concentração. Os anticorpos monoclonais 15 humanos anti-PD-L1 12A4 e 3G10 também mostraram um aumento na secreção de IFN-γ. Ao contrário, culturas contendo o anticorpo de controle não mostraram aumento na proliferação de célula T, secreção de IFN-γ ou secreção de IL-2.

20 Num experimento separado, uma reação linfocitária mista alogeneica (MLR) foi empregada para demonstrar o efeito do bloqueio da via PD-L1/PD-1 em células efetoras linfocitárias. As células T no ensaio foram testadas quanto à proliferação e secreção de IFN-γ na presença ou 25 ausência de um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 ou anticorpo de controle de isótipo.

As células T CD4+ humanas foram purificadas de PBMC utilizando um kit de seleção negativa de CD4+ (Mitenyi Biotech). Monócitos foram preparados utilizando-se kit de 30 seleção negativo (Mitenyi Biotech). As células dendríticas foram derivadas de monócitos purificados cultivados com 1000 U/ml de IL-4 e 500 U/ml de GM-CSF (R&D Biosystems) durante sete dias. Cada cultura por MLR continha 10⁵ células T purificadas e 10⁴ células 35 dendríticas alogeneicas num volume total de 200 µl. O anticorpo monoclonal anti-PD-L1 12A4, 11E6, 3G10, 13G4, 1B12, 10A5, e 12B7 foram adicionados a cada cultura em

concentrações diferentes de anticorpo. Nenhum anticorpo ou anticorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37°C. No dia 5, 40 µl de meio foram colhidos de 5 cada cultura para medição de citocinas e substituído por um volume igual de meio de cultura contendo 1µCi de ^3H -timidina. As células foram cultivadas por mais 18 horas, colhidas e analisadas quanto à proliferação celular. Os níveis de IFN-γ no fluido de cultura foram medidos 10 utilizando um kit ELISA OptEIA hIFN-γ (BD Bioscience). Os resultados são mostrados na Figura 40. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 promovem a proliferação de célula T e a secreção de IFN-γ numa forma dependente de concentração. Ao contrário, as culturas contendo o 15 anticorpo de controle não mostraram um aumento na proliferação de célula T ou de secreção de IFN-γ.

Exemplo 8: Efeito de anticorpo anti-PD-L1 humano sobre a função de células T reguladoras

Células T reguladoras (CD4+, CD25+) são linfócitos que 20 suprimem a resposta imune. Foi testado o efeito da adição de células T reguladoras sobre a proliferação e secreção de IFN-γ na célula dendrítica alogeneica e MLR de célula T na presença ou ausência de um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1.

25 As células T reguladoras foram purificadas de PBMC utilizando um kit de isolamento de célula T reguladora CD4+CD25+ (Miltenyi Biotec). Células T reguladoras foram adicionadas numa reação linfocitária mista (vide acima) contendo células T CD4+CD25- e células dendríticas 30 alogeneicas numa relação de 2:1 de CD4+CD25- para células T reguladoras. O anticorpo monoclonal anti-PD-L1 10A5 foi adicionado a cada cultura a uma concentração de 10 µg/ml: nenhum anticorpo ou anticorpo de controle de isótipo foi usado como controle negativo. As células foram cultivadas 35 durante 5 dias a 37°C quando então os sobrenadantes foram analisados quanto à secreção de IFN-γ utilizando um sistema de detecção de citocina Beadlyte (Upstate). As

células foram marcadas com ^3H -timidina, cultivadas por mais 18 horas e analisadas quanto à proliferação celular. Os resultados são mostrados nas Figuras 41A (proliferação de célula T) e 41B (secreção de IFN- γ). A adição de 5 anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 10A5 promove tanto a proliferação de célula T como a secreção de IFN- γ em culturas celulares de células dendríticas alogeneicas, células T e células T reguladoras, indicando que os anticorpos anti-PD-L1 podem reverter o efeito de células 10 T reguladoras no MLR de célula T-DC alogeneica.

Num experimento separado, os anticorpos anti-PD-L1 humanos 12A4 e 13G4 e um anticorpo de controle 1D12 foram testados no ensaio MLR com células T reguladoras. Os resultados são mostrados nas Figuras 42 (proliferação de 15 célula T) e 42 (secreção de IFN- γ) e 43 (secreção de IFN- γ). A adição de anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 12A4 ou 13G4 reverte parcialmente a supressão tanto de proliferação de célula T como de secreção de IFN- γ em culturas celulares de células dendríticas alogeneicas e 20 células T contendo células T reguladoras, indicando que os anticorpos anti-PD-L1 podem tem um efeito sobre as células T reguladoras.

Exemplo 9 : Efeito do anticorpos anti-PD-1 sobre a secreção de citocinas através de células PBMC estimuladas 25 por antígeno viral de um doador responsivo a CMV positivo PBMC humanas responsivas a antígeno CMV (Astarte Biologics, Redmond, WA) foram cultivadas a 2e5 células/cavidade em placas de 96 cavidades de fundo plano tratadas com TC, na presença de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lisado de CMV 30 (Astarte Biologics) anticorpos anti-PD-L1 +/- titulados. O meio AIM-V (Invitrogen) complementado com FBC termo-inativado (10% final) foi usado num volume total de 200 $\mu\text{l}/\text{cavidade}$. As células foram cultivadas durante 4 dias a 37°C, 5% CO₂ quando então o sobrenadante da cultura foi 35 colhido para determinação de interferon- γ secretado através de ensaio ELISA (kit ELISA OptEIA hIFN- γ - BD Biosciences). Os resultados são mostrados na Figura 44.

Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 promovem a secreção de IFN- γ através de células T CMV-específicas na forma dose-dependente. A resposta mais forte foi gerada pelos anticorpos 13G4, 1B12 e 12A4 comparada com o 5 controle de isótipo. Esses resultados mostram que os HuMAbs anti-PD-L1 podem estimular a liberação de IFN- γ numa resposta de célula T de memória de células PBMC previamente estimuladas contra um antígeno.

Exemplo 10 : Bloqueio de ligação de ligante PD-L1 a PD-1 10 através de anticorpos anti-PD-L1 humanos

Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 foram testados quanto à sua capacidade de bloquear a ligação do ligante PD-L1 a PD-1 expressados em células CHO transfectadas utilizando um ensaio de citometria celular.

15 Células CHO expressando PD-1 foram suspensas em tampão de FACS (PBS com 4% de soro fetal bovino a 4%). Diversas concentrações dos HuMAbs anti-PD-L1 3G10, 10A5 ou 12A4 foram adicionados a tubos de suspensão de células a 4°C durante 30 minutos, seguido de adição de PD-L1 marcado 20 com FITC fundido a uma região-FC de imunoglobulina. As análises citométricas de fluxo foram conduzidas utilizando-se um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados constam da Figura 45. Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 3G10, 10A5 e 25 12A4 bloquearam a ligação de PD-L1 a células CHO transfectadas com PD-1 humano, conforme medido pela intensidade fluorescente média (MFI) de coloração. Esses dados demonstram que os HuMAbs anti-PD-L1 bloqueiam a ligação de ligante PD-L1 a PD-1 em superfície celular.

30 Exemplo 11 : Inibição da ligação de PD-1 solúvel a PD-L1 à superfície celular através de anticorpos anti-PD-L1 humanos.

35 Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 foram testados quanto à sua capacidade de bloquear a ligação de uma versão dimérica solúvel do receptor PD-1 (PD-1-hFc) a PD-L1 expressado em células de carcinoma ovariano humano ES-2 induzidas por hIFN- γ utilizando um ensaio de

citometria de fluxo. O bloqueio foi comparado ao anticorpo de controle de isótipo.

Células ES2 foram induzidas da noite para o dia com 500 UI/mL de hIFN- γ para regular para cima a expressão de 5 superfície celular de célula hPD-L1. As células induzidas foram suspensas em tampão FACS. Diluições em série dos HuMAbs anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 e 5F8 foram adicionadas a tubos de suspensão celular a 4°C durante 30 minutos, seguido de duas lavagens para 10 remover o anticorpo não ligado. Em seguida, proteína PD-1-hFc foi adicionada a uma constante de 2 μ g/mL a todas as cavidades a 4°C durante 30 minutos, seguido de duas lavagens para remover PD-1-hFc não ligado. Em seguida, o PD-1-Fc não ligado foi detectado nas células ES-2 15 mediante adição de HBuMab 26D5 anti-PD-1 não bloqueador biotinilado, que se liga a PD-1 quando ligado a PD-L1, a 4°C durante 30 minutos, seguido de duas lavagens para remoção de anticorpo não ligado. Finalmente, o anticorpo 26D5 ligado foi detectado mediante adição de conjugado de 20 estreptavidina-PE a 4°C durante 30 minutos, seguido de duas lavagens para remoção de conjugado não ligado. A análise citométrica de fluxo foi conduzida utilizando-se um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados constam da Figura 46. Os 25 anticorpos monoclonais anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6 e 5F8 bloquearam a ligação de PD-1 a células ES-2 que expressam PD-L1 humano, conforme medido pela intensidade fluorescente média geométrica (GMFI) de coloração. Esses dados demonstram que os HuMAbs anti-PD- 30 L1 bloqueiam a ligação de receptor PD-1 solúvel a PD-L1 em superfície celular.

Exemplo 12 : Tratamento de modelo de tumor *in vivo* utilizando anticorpos anti-PD-L1

Camundongos implantados com um tumor canceroso são 35 tratados *in vivo* com anticorpos anti-PD-L1 para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos sobre o crescimento tumoral. Para os estudos do tumor, camundongos AJ com 6-8

semanas de vida (Harlan Laboratories) são randomizadas por peso em 6 grupos. As camundongas são implantadas subcutaneamente no flanco direito com 2×10^6 células de fibrosarcoma SA1/N dissolvidas em 200 μl de meios DMEM no dia 0. As camundongas são tratadas com veículo PBS, ou anticorpos anti-PD-L1 a 10 mg/kg. Os animais são dosados através de injeção intraperitoneal com aproximadamente 200 μl de PBS contendo anticorpo ou veículo nos dias 1, 4, 8 e 11. Cada grupo contém 10 animais e os grupos consistem de: (i) um grupo veículo; (ii) IgG camundongo de controle e (iii) um anticorpo anti-PD-L1. As camundongas são monitoradas duas vezes por semana quanto ao crescimento tumoral por aproximadamente 6 semanas. Utilizando um calibrador eletrônico, os tumores são medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) sendo calculado o volume do tumor. As camundongas são submetidas à eutanásia quando os tumores atingem a meta do tumor (1500 mm^3) ou apresentam mais de 15% de perda de peso.

Exemplo 13: Eficácia *in vivo* de Terapia de Combinação (anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-L1) sobre o Estabelecimento e Crescimento de Tumor

Células de câncer colorretal MC38 (obtido de Dr.N.Restifo, National Cancer Institute, Bethesda, MD; ou Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD) foram implantadas em camundongos C57BL/6 (2×10^6 células/camundongo) e selecionadas para tratamento quando os tumores atingiram $100-200 \text{ mm}^3$ de tamanho). No dia 0 (ou seja, no primeiro dia de tratamento), cada um dos quatro grupos de 10 camundongos cada foi injetado intraperitonealmente (IP) com um dos seguintes: (1) 10 mg/kg de IgG camundongo e 10 mg/kg de IgG de rato(controle), (2) 10 mg/kg anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (CTLA-4 anti-camundongo de camundongo, obtido de K.Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) e 10 mg/kg de IgG de rato, (3) anticorpo monoclonal anti-PD-L1 MIH5 (PD-L1 anti-camundongo de

rato, eBioscience) e 10 mg/kg de IgG camundongo, ou (4) 10 mg/kg de anticorpo anti-CTLA 9D9 e 10 mg/kg de anticorpo MIH5 anti-PD-L1. As injeções de anticorpo foram então administradas nos dias 3 e 6. Utilizando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e calculado o volume do tumor. Os camundongos foram submetidos à eutanásia quando os tumores atingiram uma meta de tumor designada. Os resultados constam da Figura 47.

Esse estudo indica que, no modelo de tumor murino MC38, o tratamento com anticorpo anti-PD-L1 isoladamente tem um efeito modesto sobre o crescimento tumoral, resultando num retardo no crescimento tumoral, ao passo que o anti-CTLA-4 tem pouco efeito neste modelo. Porém, o tratamento combinado de anticorpo CTLA-4 e anticorpo PD-L1 tem um efeito significativamente maior sobre o crescimento tumoral e resulta em camundongos livres de tumor.

Exemplo 14: Imunoistoquímica Utilizando Anticorpos Anti-PD-L1

Para avaliar os perfis de ligação tecidual de HuMAb anti-PD-L1, 12A4, 13G4, 3G10 e 12B7 não modificados foram examinados num painel de tecidos humanos normais (não neoplásicos), incluindo o baço, amígdala, cérebro, cerebelo, coração, fígado, pulmão, rim, pâncreas, pituitária, pele e intestino delgado, bem como tecidos de carcinoma pulmonar (1 amostra/cada). Células ES-2 foram usadas como controle positivo. Hu-IgG1 e Hu-IgG4 foram usados como anticorpos de controle de isótipo.

Tecidos normais e de tumor congelados e embebidos em OCT foram adquiridos da Cooperative Human Tissue Network (Philadelphia, PA) ou National Disease Research Institute (Philadelphia, PA). Cortes por criostato de 5 µm foram fixados com acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente e armazenados a -80°C até o uso. Um protocolo de imunoistoquímica desenvolvido pela Medarex foi conduzido utilizando HuMab anti-PD-L1 não modificado através de

pré-complexo dos anticorpos primários (12A4, 13G4, 3G10 e 12B7) e antícorpo secundário (fragmento Fab conjugado com FITC de anti-Hu-IgG de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories. West Grove, PA) antes da aplicação nos cortes. Resumidamente, 1 µg/ml ou 5 µg/ml dos anticorpos primários não conjugados foram misturados com excesso triplo de antícorpo secundário respectivamente e incubados durante 30 minutos à temperatura ambiente e então gamaglobulina humana excedente foi adicionada por mais 30 minutos para bloquear o antícorpo secundário não ligado. Paralelamente, os anticorpos de controle de isótipo Hu-IgG1 ou Hu-IgG4 foram pré-complexados da mesma forma. As lâminas foram lavadas com PBS (Sigma, St. Louis, MO) duas vezes e então incubadas com bloco de peroxidase fornecido pela Dako EnVision+System (Dako, Carpinteria, CA) durante 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com bloco de proteína Dako para bloquear os sítios de ligação não-específicos. Posteriormente, o pré-complexo de anticorpos primários ou de controles de isótipo foram aplicados sobre os cortes e incubados por 1 hora. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com antícorpo anti-FITC de camundongo (20 µg/ml Sigma) por 30 minutos. Após outras três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com polímero IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase fornecido com o sistema Dako EnVision+System durante 30 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas conforme acima citado e reagidas com solução de substrato DAB-cromógeno fornecido no sistema Dako EnVision+System durante 6 minutos. As lâminas foram então lavadas com água deionizada, contracoradas com hematoxilina Mayer (Dako), desidratadas, clareadas e montadas com Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) após procedimento histológico de rotina.

A coloração de fraca a moderada foi observada nas células ES-2, bem como em células tumorais de tecidos de carcinoma pulmonar. Nos cortes tonsilares, observou-se

forte coloração no epitélio da cripta fortemente infiltrado com células linfóides, porém não nas células epiteliais escamosas estratificadas de mucosa. Observou-se uma coloração moderada em algumas células na região 5 interfolicular, e coloração muito fraca foi observada em grandes células dispersas (células similares ao retículo dendrítico) no centro germinal. No pulmão, fraca coloração foi encontrada em macrófagos alveolares. Os padrões de coloração nos tecidos tonsilares e pulmonares 10 foram similarmente observados em cortes imunoistoquímicos utilizando mAb anti-PD-L1 comercial (eBiosciences, San Diego, CA). Houve coloração global menos intensa com os HuMabs, especialmente para a coloração nos centros germinais. No baço, uma imunoreatividade fraca e difusa 15 na polpa vermelha estava levemente acima da coloração de fundo. Além disso, uma coloração de fraca a moderada foi observada em células similares às células de Kupffer no fígado e células difusas na placa de Peyer, bem como em células difusas similares a macrófagos e fibroblastos 20 principalmente na região focal da camada muscular (muscularis externa) do intestino delgado.

Nos tecidos do cerebelo, cérebro, coração, rim, pâncreas, pituitária e pele, nenhuma coloração significativa foi 25 observada quando corados com todos os quatro HuMabs anti-PD-L1. Não se observou nenhuma diferença evidente na coloração entre esses quatro anticorpos, com exceção de 12B7 e/ou 3G10 que exibiram coloração levemente mais forte em células hepáticas e ES-2.

SUMÁRIO DE ANTICORPO PD-L1

SEQ ID NO.	SEQÜÊNCIA	SEQ ID NO.	SEQÜÊNCIA
1	V _H a.a.3G10	26	V _H CDR1 a.a.1B12
2	V _H a.a.12A4	27	V _H CDR1 a.a.7H1
3	V _H a.a.10A5	28	V _H CDR1 a.a.11E6
4	V _H a.a.5F8	29	V _H CDR1 a.a.12B7
5	V _H a.a.10H10	30	V _H CDR1 a.a.13G4
6	V _H a.a.1B12		
7	V _H a.a.7H1	31	V _H CDR2 a.a.3G10
8	V _H a.a.11E6	32	V _H CDR2 a.a.12A4
9	V _H a.a.12B7	33	V _H CDR2 a.a.10A5
10	V _H a.a.13G4	34	V _H CDR2 a.a.5F8
		35	V _H CDR2 a.a.10H10
11	V _K a.a.3G10	36	V _H CDR2 a.a.1B12
12	V _K a.a.12A4	37	V _H CDR2 a.a.7H1
13	V _K a.a.10A5	38	V _H CDR2 a.a.11E6
14	V _K a.a.5F8	39	V _H CDR2 a.a.12B7
15	V _K a.a.10H10	40	V _H CDR2 a.a.13G4
16	V _K a.a.1B12		
17	V _K a.a.7H1	41	V _H CDR3 a.a.3G10
18	V _K a.a.11E6	42	V _H CDR3 a.a.12A4
19	V _K a.a.12B7	43	V _H CDR3 a.a.10A5
20	V _K a.a.13G4	44	V _H CDR3 a.a.5F8
		45	V _H CDR3 a.a.10H10
21	V _H CDR1 a.a.3G10	46	V _H CDR3 a.a.1B12
22	V _H CDR1 a.a.12A4	47	V _H CDR3 a.a.7H1
23	V _H CDR1 a.a.10A5	48	V _H CDR3 a.a.11E6
24	V _H CDR1 a.a.5F8	49	V _H CDR3 a.a.12B7
25	V _H CDR1 a.a.10H10	50	V _H CDR3 a.a.13G4
51	V _K CDR1 a.a.3G10	79	V _K CDR3 a.a.12B7
52	V _K CDR1 a.a.12A4	80	V _K CDR3 a.a.13G4
53	V _K CDR1 a.a.10A5		
54	V _K CDR1 a.a.5F8	81	V _H n.t.3G10
55	V _K CDR1 a.a.10H10	82	V _H n.t.12A4
56	V _K CDR1 a.a.1B12	83	V _H n.t.10A5
57	V _K CDR1 a.a.7H1	84	V _H n.t.5F8
58	V _K CDR1 a.a.11E6	85	V _H n.t.10H10
59	V _K CDR1 a.a.12B7	86	V _H n.t.1B12
60	V _K CDR1 a.a.13G4	87	V _H n.t.7H1
		88	V _H n.t.11E6
61	V _K CDR2 a.a.3G10	89	V _H n.t.12B7
62	V _K CDR2 a.a.12A4	90	V _H n.t.13G4
63	V _K CDR2 a.a.10A5		
64	V _K CDR2 a.a.5F8	91	V _K n.t.3G10
65	V _K CDR2 a.a.10H10	92	V _K n.t.12A4

66	V _k CDR2 a.a.1B12	93	VK n.t.10A5
67	V _k CDR2 a.a.7H1	94	VK n.t.5F8
68	V _k CDR2 a.a.11E6	95	VK n.t.10H10
69	V _k CDR2 a.a.12B7	96	VK n.t.1B12
70	V _k CDR2 a.a.13G4	97	VK n.t.7H1
		98	VK n.t.11E6
71	V _k CDR2 a.a.3G10	99	VK n.t.12B7
72	V _k CDR3 a.a.12A4	100	VK n.t.13G4
73	V _k CDR3 a.a.10A5		
74	V _k CDR3 a.a.5F8	101	linha germinal a.a. VH 1-18
75	V _k CDR3 a.a.10H10	102	linha germinal a.a. VH 1-69
76	V _k CDR3 a.a.1B12	103	linha germinal a.a. VH 1-3
77	V _k CDR3 a.a.7H1	104	linha germinal a.a. VH 3-9
78	V _k CDR3 a.a.11E6		
105	linha germinal a.a. VK L6		
106	linha germinal a.a. VK L15		
107	linha germinal a.a. VK A27		
108	linha germinal a.a. VK L18		
109	VK a.a.11E6a		

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

<110> MEDAREX, INC.

<120> "ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, COMPOSIÇÃO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, CAMUNDONGO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA MODULAR UMA RESPOSTA IMUNE NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA INIBIR CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA INFECCIOSA NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA RESPOSTA IMUNE A UM ANTÍGENO NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA NUM INDIVÍDUO E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO ANTI-PD-L1".

<130> 04280/2203107-W00

<140> PCT/US2006/026046

<141> 2006-06-30

<150> 60/696,426

<151> 2005-07-01

<160> 120

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Thr Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1															15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr																
				20					25						30	
Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met																
				35				40							45	
Gly Trp Leu His Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe																
				50				55							60	
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr																
				65				70							80	
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys																
				85				90							95	
Ala Arg Glu Arg Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr																
				100				105							110	
Leu Val Thr Val Ser Ser																
				115												

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1															15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ile Phe Ser Thr Tyr															
				20				25							30
Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met															
				35				40							45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn His Ala Gln Lys Phe															
				50				55							60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 6
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Arg Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Tyr Asp Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Ala Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Gly Trp Ser Arg Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

```
<210> 9  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 9
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ser
      1           5           10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Tyr
      20          25          30

```

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Ile Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Arg Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Arg Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1										10					15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
	20								25					30	
Leu	Val	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Arg
				85					90				95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
					100			105							

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1										10					15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
	20							25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40				45				
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75			80		

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
									20			25			30
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
									35			40			45
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
									50			55			60
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
									65			70			80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Thr
									85			90			95
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
									100			105			

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
									20			25		30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
									35			40		45	
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
									50			55		60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
									65			70		75	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Thr
									85			90		95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
								100			105				

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 18
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

```

<210> 19
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 19
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      1           5           10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35          40          45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
      65          70          75          80

```

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr			
85	90	95	
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20			
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala			
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe			
85	90	95	
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			
100	105		

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21			
Asp Tyr Gly Phe Ser			
1	5		

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Thr Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Ser Tyr Asp Val His
1 5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Thr Tyr Ala Ile Asn
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asp Tyr Val Val His
1 5

<210> 26

<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ser Tyr Ala Ile Asn
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 30
<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Asp Tyr Gly Met His

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Trp Ile Thr Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Trp Leu His Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn His Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Gly Ile Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Arg Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

●
<400> 38
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Asp

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Ile Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Arg Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 41
<211> 8
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Arg Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Pro Phe Asp Tyr

1

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Tyr Asp Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Ser Ser Gly Trp Ser Arg Tyr Tyr Met Asp Val

1

5

10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Lys Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Arg Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Val
1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
● Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
● Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
● Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 81

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 81

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc gac tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

ggt ttc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
Gly Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

gga tgg atc acc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc 192
Gly Trp Ile Thr Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gtc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gac tac ttc tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg 336
Ala Arg Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 82

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 82

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc acc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

gga ggg atc atc cct ata ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
 Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110

tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)

<400> 83

cag gtc caa ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 gat gta cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg atg 144
 Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga tgg ctc cac gct gac act ggt atc aca aaa ttt tca cag aag ttc 192
 Gly Trp Leu His Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acc att acc agg gac aca tcc gcg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg agg gag agg ata cag cta tgg ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336
 Ala Arg Glu Arg Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 ctg gtc acc gtc tcc tca 354
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 84
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 84

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tct gga ggc atc ttc agc acc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ile Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 gct atc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac cac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn His Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gat cag ggt ata gca gca gcc ctt ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Arg Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 85
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 85

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gtc tct gga ttc acc ttt gat gat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 gtc gtg cac tgg gtc cg^g caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc 144
 Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca ggt att agt ggg aat agt ggt aac ata ggc tat gcg gac tct gtg 192
 Ser Gly Ile Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg gtc ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
 Ala Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 tca 339
 Ser

<210> 86
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (369)

<400> 86
 cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aga gca cac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Arg Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
 Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110
 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)

<400> 87
 cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg acc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga aag tat gac tat gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
 Ala Arg Lys Tyr Asp Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110
 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 88
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 88
 cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 gct atc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga ggg atc atc cct atc ttt ggt tca gca aac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag gac aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc gca gcc tac 240
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Ala Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gta tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gac agc agt ggc tgg tct cgg tac tat atg gac gtc tgg ggc 336
 Ala Arg Asp Ser Ser Gly Trp Ser Arg Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 89
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)

<400> 89
 cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag gag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc aac agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga ggg atc atc cct ctt ttc ggt ata gca cac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Ile Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg aac aca gcc tat 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gac ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gta tat tat tgt 288
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga aag tat tcc tat gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
 Ala Arg Lys Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110
 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 90
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 90
 gaa gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga atc acc ttt gat gat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 ggc atg cac tgg gtc cg^g caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca ggt att agc tgg aat aga ggt aga ata gag tat gcg gac tct gtg 192
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Arg Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aaa ggg cg^g ttc cga tat ttt gac tgg ttt ctt gac tac tgg ggc 336
 Ala Lys Gly Arg Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 91
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 91
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 92
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(318)

<400> 92
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 93

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(321)

<400> 93

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac ccg tac 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 94
 gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg 288
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 324
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 95
- <211> 321
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1) .. (321)

<400> 95
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac ccg tac 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 96
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(318)

<400> 96
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 97
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 ● <221> CDS
 <222> (1)..(318)

<400> 97
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 98
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 98

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg	48		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc	96		
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser			
20	25	30	
tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc	144		
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt	192		
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag	240		
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca cct	288		
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro			
85	90	95	
ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	318		
Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 99
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 99

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35	40	45
----	----	----

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccc acc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

85	90	95
----	----	----

ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100	105
-----	-----

<210> 100

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 100

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cg^g gca agt cag ggc att agc agt gct 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cca ttc 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 101
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 102
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 103
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 104

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala

<210> 105

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 106
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

<210> 107
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 107

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1									10						15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
	20								25						30
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35							40							45
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50							55							60
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
	65					70				75					80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
									85			90			95

<210> 108

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1										10					15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala
	20								25						30
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35							40							45
Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50							55							60
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65							70			75				80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	
								85			90				95

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1									10						15
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
	20								25						30
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35								40						45
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50								55						60
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
	65								70						80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
									85						95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
								100							105

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

<210> 112

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 113

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de especificamente ligar-se a PD-L1 humano e sendo que o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades:
 - (a) liga-se a PD-L1 humano com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos;
 - (b) aumenta a proliferação de célula T num ensaio de reação mista (MLR) de linfócitos;
 - (c) aumenta a produção de interferon- γ num ensaio MLR; ou
 - (d) aumenta a secreção de interleucina-2 (IL-2) num ensaio MLR.
2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ligar-se a PD-L12 humano com um K_D de 5×10^{-9} M ou menos.
3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ligar-se a PD-L1 humano com um K_D de 2×10^{-9} M ou menos.
4. Anticorpo monoclonal humano isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de o anticorpo fazer competição cruzada para ligar-se a PD-L1 com um anticorpo de referência, sendo que o anticorpo compreende:
 - (a) a região variável de cadeia pesada humana compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10; e
 - (b) a região variável de cadeia leve humana compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20.
5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a região variável de cadeia pesada humana compreender a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e a região variável de cadeia leve humana compreender a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:11.
6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a região variável de cadeia pesada humana compreender a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 e a região variável de cadeia leve humana compreender a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:12.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de a região variável de cadeia pesada humana compreender a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 3 e a região variável de cadeia leve humana compreender a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:13.

8. Anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 1-18 humano, gene V_H 1-69, ou gene V_H 1-3; e

(b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6 humano ou gene V_K L15;

sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

9. Anticorpo monoclonal isolado, ou porção ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender uma região variável de cadeia pesada que compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3; e uma região variável de cadeia leve que compreende seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 sendo que:

(a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50, e suas modificações conservativas;

(b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, e 80, e suas modificações conservativas; e

(c) o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1 humano.

10. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreender uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40, e suas modificações conservativas; e a seqüência CDR2 da região variável de cadeia leve compreender uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70 e suas modificações conservativas.

11. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 10,

caracterizado pelo fato de a seqüênci a CDR1 da região variável de cadeia pesada compreender uma seqüênci a de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, e suas modificações conservativas; e a seqüênci a CDR1 da região variável de cadeia leve compreender uma seqüênci a de aminoácido selecionada do grupo consistindo de seqüências de aminoácido de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60 e suas modificações conservativas.

12. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

(a) a região variável de cadeia pesada compreende uma seqüênci a de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüênci a de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10;

(b) a região variável de cadeia leve compreende uma seqüênci a de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma seqüênci a de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, e 20; e o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com um K_D de $1 \times 10^{-7} M$ ou menos.

13. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de compreender ainda uma ou mais das propriedades selecionadas de:

(a) o anticorpo aumenta a proliferação de célula T num ensaio de reação mista (MLR) de linfócitos;

(b) o anticorpo aumenta a produção de interferon- γ num ensaio MLR; e

(c) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 num ensaio MLR.

14. Anticorpo monoclonal isolado, ou porção ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüênci a de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada

compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40;

(c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60;

(c) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70; e

(d) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80; sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

15. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:21;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 31;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 41;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:51;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:61; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:71.

16. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:22;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:32;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:42;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:52;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:62; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:72.

17. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:23;

(b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:33;

(c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:43;

(d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:53;

(e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:63; e

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:73.

18. Anticorpo monoclonal isolado, ou porção ligante ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; sendo que o anticorpo liga-se especificamente a PD-L1.

19. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 1; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 11.

20. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 2; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 12.

21. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 3; e

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 13.

22. Composição, caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, e um portador farmaceuticamente aceitável.

23. Imunoconjunto, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo, a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, ligado a um agente terapêutico.

24. Imunoconjunto, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de o agente terapêutico ser uma citotoxina ou um isotopo radioativo.

25. Molécula biespecífica, caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo, a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, ligada a uma segunda porção funcional que possui uma especificidade de ligação diferente da do dito anticorpo, ou da porção ligante ao antígeno do mesmo.

26. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de codificar o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1.

27. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de aminoácido, conforme definida na reivindicação 26.

28. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender o vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 27.

29. Camundongo transgênico, caracterizado pelo fato de

compreender transgenes de cadeia pesada e leve de imunoglobulina humana, sendo que o camundongo expressa o anticorpo, conforme definido na reivindicação 1.

30. Método para modular uma resposta imune num indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, de forma que a resposta imune seja modulada no indivíduo.

31. Método para inibir o crescimento de células tumorais num indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo um anticorpo, ou uma porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definida na reivindicação 1 de modo que o crescimento de células tumorais no indivíduo seja inibido.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de as células tumorais serem de um câncer selecionado do grupo consistindo de melanoma, câncer renal, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de cólon, e câncer de pulmão.

33. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de as células tumorais serem de um câncer selecionado da listagem consistindo de câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma cutâneo ou intraocular maligno, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer de estômago, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma da cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma de tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, leucemias crônicas ou agudas incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, tumores sólidos em crianças, linfoma linfocítico, câncer da bexiga, câncer do rim ou do ureter, carcinoma da pelve renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), linfoma primário

do SNC, angiogênese tumoral, tumor do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, adenoma pituitário, sarcoma de Kaposi, câncer epidermóide, câncer de células escamosas, linfoma de células T, cânceres induzidos pelo ambiente, incluindo os induzidos por amianto, e combinações de ditos cânceres.

34. Método para tratar uma doença infecciosa num indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, de forma que o indivíduo seja tratado da doença infecciosa.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de a doença infecciosa ser selecionado da listagem consistindo de HIV, gripe, herpes, giardia, malária, Leishmania, infecção patogênica causada pelo vírus da hepatite (A, B e C), vírus de herpes, adenovírus, vírus da gripe (influenza), flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus Coxsackie, cornovírus, vírus sincitial respiratório, vírus de caxumba, rotavírus, vírus de sarampo, vírus da rubéola, parvovírus, vírus da vacínia, vírus HTLV, vírus da dengue, papilomavírus, vírus de molusco, poliovírus, vírus da raiva, vírus JC e vírus de encefalite arboviral, infecção patogênica causada pela bactéria clamídia, bactéria riquétsia, micobactéria, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos, e conococos, klebsiela, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétano, botulismo, antrax, peste, leptospirose, e bactérias da doença de Lyme, infecção patogênica causada pelos fungos Cândida, Criptococos neoformans, Aspergillus, gênero Mucorales, Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasilienses, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum, e infecção patogênica causada pelos parasitas Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleria fowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lamblia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi, Nippostrongylus brasilienses.

36. Método para aumentar uma resposta imune a um antígeno num indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo: (i) o antígeno; e (ii) o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, de forma que uma resposta imune ao antígeno seja aumentada no indivíduo.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de o antígeno ser um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, ou um antígeno de um patógeno.

38. Método para tratar ou prevenir uma doença inflamatória num indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo o anticorpo, ou a porção ligante ao antígeno do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, de forma que o indivíduo seja tratado da doença inflamatória.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de a doença inflamatória ser líquen plano (LP).

40. Método para preparar o anticorpo anti-PD-L1, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) prover: (i) uma seqüência de anticorpo da região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30, uma seqüência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 e 40; e uma seqüência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50; ou (ii) uma seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 e 60, uma seqüência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, e 70, e uma seqüência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 80;

(b) alterar pelo menos um resíduo aminoácido em pelo menos uma seqüência de anticorpo de região variável, dita seqüência sendo selecionada da seqüência de anticorpo de região

variável de cadeia pesada e da seqüência de anticorpo de região variável de cadeia leve, para criar pelo menos uma seqüência de anticorpo alterada; e
(c) expressar a seqüência de anticorpo alterada como uma proteína.

Anti-PD-L1 3G10 VH

Segmento V : 1-18

Segmento D : indeterminado

Segmento J : JH6b

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
 CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

CDR1

55 K V S C K A S G Y T F T D Y G F S W
 AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC GAC TAT GGT TTC AGC TGG

CDR2

109 V R Q A P G Q G L E W M G W I T A Y
 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC ACC GCT TAC

CDR2

163 N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T
 AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG CTC CAG GCC AGA GTC ACC ATG ACC ACA

217 D T S T S T V Y M E L R S L R S D D
 GAC ACA TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

CDR3

271 T A V Y Y C A R D Y F Y G M D V W G
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAC TAC TTC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC

325 Q G T T V T V S S
 CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 1a

Anti-PD-L1 3G10 VK

Segmento V : L6

Segmento J : JK1

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L V W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GTC TGG TAC

CDR2

Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

R S N W P R T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 1b

Anti-PD-L1 12A4 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 3-10

Segmento J : JH6b

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
1 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG
CDR1

K V S C K T S G D T F S T Y A I S W
55 AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AGC TGG
CDR2

V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATA
CDR2

F G K A H Y A Q K F Q G R V T I T A
163 TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG
D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
217 GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC
CDR3

T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
271 ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC
CDR3

G M D V W G Q G T T V T V S S
325 GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 2a

Anti-PD-L1 12A4 VK

Segmento V : L6

Segmento J : JK1

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

R S N W P T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 2b

Anti-PD-L1 10A5 VH

Segmento V : 1-3

Segmento D : 5-5

Segmento J : JH4b

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
 1 CAG GTC CAA CTT GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

CDR1

K V S C K A S G Y T F T S Y D V H W
 55 AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT GAT GTA CAT TGG

CDR2

V R Q A P G Q R L E W M G W L H A D
 109 GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG CTC CAC GCT GAC

CDR2

T G I T K F S Q K F Q G R V T I T R
 163 ACT GGT ATC ACA AAA TTT TCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC AGG

D T S A S T A Y M E L S S L R S E D
 217 GAC ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC

CDR3

T A V Y Y C A R E R I Q L W F D Y W
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG AGG ATA CAG CTA TGG TTT GAC TAC TGG

G Q G T L V T V S S
 325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 3a

6/54

Anti-PD-L1 10A5 VK

Segmento V : L15

Segmento J : JK2

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

FIG. 3b

7/54

Anti-PD-L1 5F8 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 6-13

Segmento J : JH4b

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
1 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

K V S C K V S G G I F S T Y A I N W
55 AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCT GGA GGC ATC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AAC TGG

V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

F G T A N H A Q K F Q G R V T I T A
163 TTT GGT ACA GCA AAC CAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
217 GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

T A V Y Y C A R D Q G I A A A A L F D
271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CAG GGT ATA GCA GCA GCC CTT TTT GAC

Y W G Q G T L V T V S S
325 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 4a

8/54

Anti-PD-L1 5F8 VK1

Segmento V : A27

Segmento J : JK1

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA CGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR2

R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

CDR3

T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 4b

9/54

Anti-PD-L1 10H10 VH

Segmento V : 3-9

Segmento D : 4-17

Segmento J : JH4b

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
1 GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

CDR1

R L S C A V S G F T F D D Y V V H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GTC GTG CAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V S G I S G N
109 GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT GGG AAT

CDR2

S G N I G Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT GGT AAC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

CDR3

T A L Y Y C A V P F D Y W G Q G T L
271 ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCG GTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

V T V S S
325 GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 5a

10/54

Anti-PD-L1 10H10 VK

Segmento V : L15

Segmento J : JK2

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

FIG. 5b

11/54

Anti-PD-L1 1B12 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 3-10

Segmento J : JH6b

Q V Q L V O S G A E V K K P G S S V
1 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG CCT GGG TCC TCG GTG
CDR1
K V S C K T S G D T F S S Y A I S W
55 AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG
CDR2
V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC
CDR2
F G R A H Y A Q K F Q G R V T I T A
163 TTT GGT AGA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG
D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
217 GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC
CDR3
T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
271 ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC
CDR3
G M D V W G Q G T T V T V S S
325 GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 6a

12/54

Anti-PD-L1 1B12 VK

Segmento V : L6

Segmento J : JK1

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

R S N W P T F G Q G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 6b

Anti-PD-L1 7H1 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 3-10

Segmento J : JH6b

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG CCT GGG TCC TCG GTG
 ~~~~~  
 CDR1  
 55 K V S C K T S G G T F S S Y A I S W  
 AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG  
 ~~~~~  
 CDR2
 109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC
 ~~~~~  
 CDR2  
 163 F G K A H Y A Q K F Q G R V T I T A  
 TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG  
 ~~~~~  
 217 D E S T T T A Y M E L S S L R S E D
 GAC GAA TCC ACG ACC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC
 ~~~~~  
 CDR3  
 271 T A V Y Y C A R K Y D Y V S G S P F  
 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAG TAT GAC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC  
 ~~~~~  
 CDR3
 325 G M D V W G Q G T T V T V S S
 GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 7a

14/54

Anti-PD-L1 7H1 VK

Segmento V : L6

Segmento J : JK1

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC ACT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

271 R S N W P T F G Q G T K V E I K
 CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

FIG. 7b

15/54

Anti-PD-L1 11E6 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 6-19

Segmento J : JH6c

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

CDR1

55 K V S C K A S G G T F S S Y A I N W
 AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AAC TGG

CDR2

109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

CDR2

163 F G S A N Y A Q K F Q D R V T I T A
 TTT GGT TCA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GAC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217 D E S T S A A Y M E L S S L R S E D
 GAC GAA TCC ACG AGC GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

CDR3

271 T A V Y Y C A R D S S G W S R Y Y M
 ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AGA GAC AGC AGT GGC TGG TCT CGG TAC TAT ATG

CDR3

325 D V W G Q G T T V T V S S
 GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 8a

16/54

Anti-PD-L1 11E6 VK1

Segmento V : A27

Segmento J : JK4

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

CDR2

109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

CDR2

163 R A T G I P D R F S G S G S G T D F
 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

CDR3

217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

CDR3

271 Q Y G S S P F G G G T K V E I K
 CAG TAT GGT AGC TCA CCT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

FIG. 8b

17/54

Anti-PD-L1 12B7 VH

Segmento V : 1-69

Segmento D : 3-10

Segmento J : JH6b

1	Q V Q L V Q S G A E V K E P G S S V CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG GAG CCT GGG TCC TCG GTG
	CDR1
55	K V S C K A S G G T F N S Y A I S W AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AAC AGC TAT GCT ATC AGC TGG
	CDR2
109	V R Q A P G Q G L E W M G G I I P L GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT CTT
	CDR2
163	F G I A H Y A Q K F Q G R V T I T A TTC GGT ATA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG
	CDR2
217	D E S T N T A Y M D L S S L R S E D GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAT ATG GAC CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC
	CDR3
271	T A V Y Y C A R K Y S Y V S G S P F ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AGA AAG TAT TCC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC
	CDR3
325	G M D V W G Q G T T V T V S S GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACC GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 9a

18/54

Anti-PD-L1 12B7 VK

Segmento V : L6

Segmento J : JK5

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

CDR2

109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

CDR2

163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

CDR3

271 R S N W P T F G Q G T R L E I K
 CGT AGC AAC TGG CCC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

FIG. 9b

19/54

Anti-PD-L1 13G4 VH

Segmento V : 3-9

Segmento D : 3-9

Segmento J : JH4b

E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
1 GAA GTG CAG TTG CTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG
CDR1

R L S C A A S G I T F D D Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA ATC ACC TTT GAT GAT TAT GGC ATG CAC TGG
CDR2

V R Q A P G K G L E W V S G I S W N
109 GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGC TGG AAT
CDR2

R G R I E Y A D S V K G R F T I S R
163 AGA GGT AGA ATA GAG TAT GCG GAC TCT GTG AAG, GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
CDR3

D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
217 GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC
CDR3

T A L Y Y C A K G R F R Y F D W F L
271 ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GGG CGG TTC CGA TAT TTT GAC TGG TTT CTT
CDR3

D Y W G Q G T L V T V S S
325 GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG. 10a

20/54

Anti-PD-L1 13G4 VK

Segmento V : L18

Segmento J : JK3

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
1 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
CDR1
V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT
CDR2
Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG
CDR2
E S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR3
L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
CDR3
F N S Y P F T F G P G T K V D I K
271 TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

FIG. 10b

Anti-PD-L1 3G10 região VH

Linha germinal 1-18 3G10 VH:	Q V Q I V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q	CDR1
Linha germinal 1-18 3G10 VH:	A P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T D T S T S T	CDR2
Linha germinal 1-18 3G10 VH: (JH6b)	A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R	CDR3

FIG. 11

Anti-PD-L1 12A4 Região VH

Linha germinal 1-69 12A4 VH:	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
Linha germinal 1-69 12A4 VH:	S G G T P S S Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M
Linha germinal 1-69 12A4 VH:	G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
Linha germinal 1-69 12A4 VH:	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C
Linha germinal 1-69 Linha germinal JH6b 12A4 VH:	A R
Linha germinal JH6b 12A4 VH:	K F H F V S G S P F - - - - - - - - - - - - - - - -
Linha germinal JH6b 12A4 VH:	V S S

FIG. 12

Anti-PD-L1 10A5 Região VH

Linha germinal 1-3
10A5 VH

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V R V S C R A S G Y T F T S Y A M H W
- D V - -

CDR1

Linha germinal 1-3
10A5 VH

V R Q A P G Q R I E W M G W I N A G N G N T K Y S Q K P Q G R V T I T R
-
CDR2

Linha germinal 1-3
Linha germinal JH4b
10A5 VH

D T S A S T A Y M E L S S L R S S E D T A V Y Y C A R
-
CDR3

Linha germinal JH4b
10A5 VH

G Q G T L V T V S S
-
(JH4b)

FIG. 13

Anti-PD-L1 5F8 Região VH

Linha germinal 1-69 D E S T S T A Y M E L S S L R S S E D T A V Y Y C A R _____ CDR3
Linha germinal JH4b - - - - -
5F8 VH - - - - - F D
D Q G I A A A L - -

Anti-PD-L1 10H10 Região VH

| | | |
|---|---|-------------|
| Linha germinal 3-9
10H10 VH | E V Q I V E S G G G I V Q P G R S I R I S C A A S G F T E D D Y A M H W V R | <i>CDR1</i> |
| Linha germinal 3-9
10H10 VH | Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T I S R D N A K | <i>CDR2</i> |
| Linha germinal 3-9
Linha germinal JH4b
10H10 VH
(JH4b) | N S I Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A | <i>CDR3</i> |

FIG. 15

Anti-PD-L1 1B12 Região VH

Linha germinal 1-69 *CDR2* **1B12 VH** v r q a p g q g l e w m g g i r p i f g t a n y a q k f q g r v t t a

Linha germinal JH6b 1B12 VH G M D V W C Q G T T V T V S S (JH6b)

FIG. 16

26/54

Anti-PD-L1 7H1 Região VH

Linha germinal 1-69
7H1 VH

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W

CDR1

Linha germinal 1-69
7H1 VH

V R Q A P G Q G I E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K E Q G R V T I T A

CDR2

Linha germinal 1-69
Linha germinal JH6b
7H1 VH

D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R Y

CDR3

Linha germinal JH6b
7H1 VH

G M D V W G Q G T T V T V S S (JH6b)

FIG. 17

Anti-PD-L1 11E6 Região VH

| | |
|--|---|
| Linha germinal 1-69
11E6 VH | CDR1
Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W
- N - - |
| Linha germinal 1-69
11E6 VH | CDR2
V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A
- D - - - - - - - - |
| Linha germinal 1-69
Linha germinal JH6c
11E6 VH | CDR3
D E S T S T A Y M E I S S I R S E D T A V Y Y C A R Y Y M
- - - - A - - - - - - - - - - - - - - - - D S S G W S R - - - |
| Linha germinal JH6c
11E6 VH | D V W G Q G T T V T V S S
(JH6c) |

FIG. 18

Anti-PD-L1 12B7 Região VH

| | | |
|--|---|-------------|
| Linha germinal 1-69
12B7 VH | Q V Q I V Q S G A E V R K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W | <i>CDR1</i> |
| | - | |
| Linha germinal JH6b
12B7 VH | V R Q A P G Q G L E W M G G I T P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A | <i>CDR2</i> |
| | - | |
| Linha germinal JH6b
12B7 VH | D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R | <i>CDR3</i> |
| | - - - - N - - - - D - | |
| Linha germinal JH6b
12B7 VH | G M D V W G Q G T T V T V S S | <i>CDR3</i> |
| | - | |

FIG. 19

Anti-PD-L1 13G4 Região VH

| | | |
|--------------------------------|---|-------------|
| Linha germinal 3-9
13G4 VH | E V Q L V E S G G G I V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W | <u>CDR1</u> |
| Linha germinal 3-9
13G4 VH | V R Q A P G R G I E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T I S R | <u>CDR2</u> |
| Linha germinal 3-9
13G4 VH | D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K | <u>CDR3</u> |
| Linha germinal JH4b
13G4 VH | D Y W G Q G T I L V T V S S | (JH4b) |

FIG. 20

Anti-PD-L1 3G10 Região VK

| | |
|----------------------------------|--|
| Linha germinal L6
3G10 VK#1: | E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
- |
| Linha germinal L6
3G10 VK#1: | W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
- |
| Linha germinal JK1
3G10 VK#1: | T D P T L T I S S I E P E D P A V Y Y C Q Q R S N W P
- |

FIG. 21

Anti-PD-L1 12A4 Região VK

| | | |
|-------------------------------|---|-------------|
| Linha germinal L6
12A4 VK: | E I V L T Q S P A T S L S P G E R A T U S C R A S Q S V S S Y L A W Y | <u>CDR1</u> |
| Linha germinal L6
12A4 VK: | Q Q K P G Q A P R U L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G T D F T | <u>CDR2</u> |
| Linha germinal L6
12A4 VK: | I T I S S S L E P P E D P A V Y Y C Q Q R S N W P T P G Q G T K V E I X | <u>CDR3</u> |

FIG. 22

Anti-PD-L1 10A5 Região VK

Linha germinal L15 **10A5 VK** **CDRI**

Linha germinal L15 W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F **CDR2**

Linha germinal L15
10A5 VK

Linha germinal L15 **X P**
Linha germinal JK2 **- - - - -**
10A5 VK **(JK2)**

FIG. 23

Anti-PD-L1 5F8 Região VK1

| | | |
|--|---|------|
| Linha germinal A27
5F8 VK1 | E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q s v s s Y L A W | CDR1 |
| Linha germinal A27
5F8 VK1 | Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F | CDR2 |
| Linha germinal A27
Linha germinal JK1
5F8 VK1
(JK1) | T L T I S R I E P E D F E A V Y Y C Q Q Y G S S P | CDR3 |

FIG. 24

Anti-PD-L1 10H10 Região VK

Linha germinal L15 10H10 VK **CDR1** R A S Q G I S S

Linha germinal L15
10u10 VK

Linha germinal L15
Linha germinal JK2
10H10 VK

FIG. 25

Anti-PD-L1 1B12 Região VK

**Linha germinal L6
1B12 VK**

E I V L T Q S P A T I S L S P G E R A T I S C R A S Q S V S S

CDR1

**Linha germinal L6
1B12 VK**

Y L A W Y Q Q K P G Q A P R I L I Y D A S N R A T G I P A R E

CDR2

**Linha germinal L6
1B12 VK**

S G S G S G T D F T I T I S S I E P E D F A V Y X C Q Q R S N

CDR3

**Linha germinal L6
Linha germinal JK1
1B12 VK**

W P T F G Q G T K V E I K
(JK1)

FIG. 26

Anti-PD-L1 7H1 Região VK

Linha germinal L6
7H1 VK

Linha germinal L6
7H1 VK

Linha germinal L6
Linha germinal JK1
7H1 VK

W P
T F G Q G T K V E I K
(JK1)

FIG. 27

Anti-PD-L1 11E6 Região VK1

| | |
|---------------------------|--|
| Linha germinal A27 | E I V I T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y I A W |
| 11E6 VK1 | |

| | |
|---------------------------|--|
| Linha germinal A27 | Y Q Q K P G Q A P R L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G T D F |
| 11E6 VK1 | |

| | |
|---------------------------|--|
| Linha germinal A27 | T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P |
| Linha germinal JK4 | |
| 11E6 VK1 | |

FIG. 28

Anti-PD-L1 11E6a Região VK2

| | | |
|--|---|------|
| Linha germinal A27
11E6 VK2 | E I V L T Q S P G T I L S S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y I A W | CDR1 |
| Linha germinal A27
11E6 VK2 | Y Q Q K P G Q A P R I L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F | CDR2 |
| Linha germinal A27
Linha germinal JK4
11E6 VK2 | T L T I S R I E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P T F G G G T K V E I K (JK4) | CDR3 |

FIG. 29

Anti-PD-L1 12B7 Região VK

| | | |
|--|---|-------|
| Linha germinal L6
12B7 VK | E I V L T Q S P A T L S I S P G E R A T L S C R A S S Q S V S S | CDR1 |
| Linha germinal L6
12B7 VK | Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F | CDR2 |
| Linha germinal L6
12B7 VK | S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N | CDR3 |
| Linha germinal L6
Linha germinal JK5
12B7 VK | W P T F G Q G T R L E I K | (JK5) |

FIG. 30

| Anti-PD-L1 13G4 Região VK | |
|---|---|
| Linha germinal L18
13G4 VK | A I Q L T Q S P S S I S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S

<i>CDR1</i> |
| Linha germinal L18
13G4 VK | A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F

<i>CDR2</i> |
| Linha germinal L18
13G4 VK | S G S S G T D E T L T I S S I L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S

<i>CDR3</i> |
| Linha germinal L18
Linha germinal JK3
13G4 VK | Y P

F T E G P G T K V D I K

(JK3) |

FIG. 31

42/54

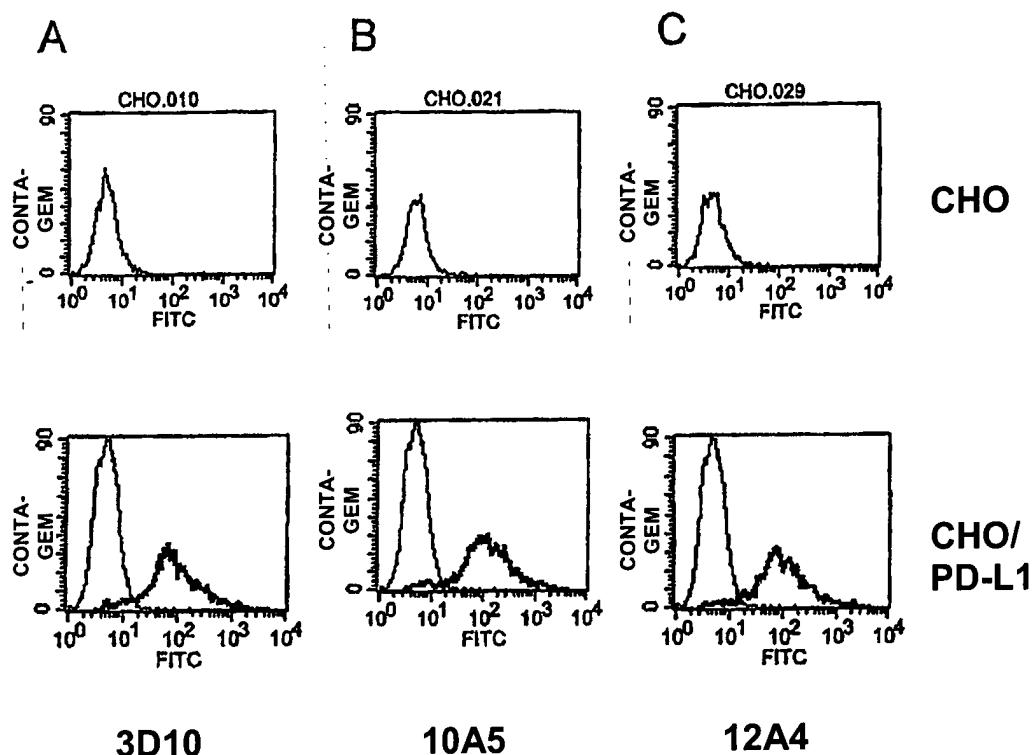


FIG. 32

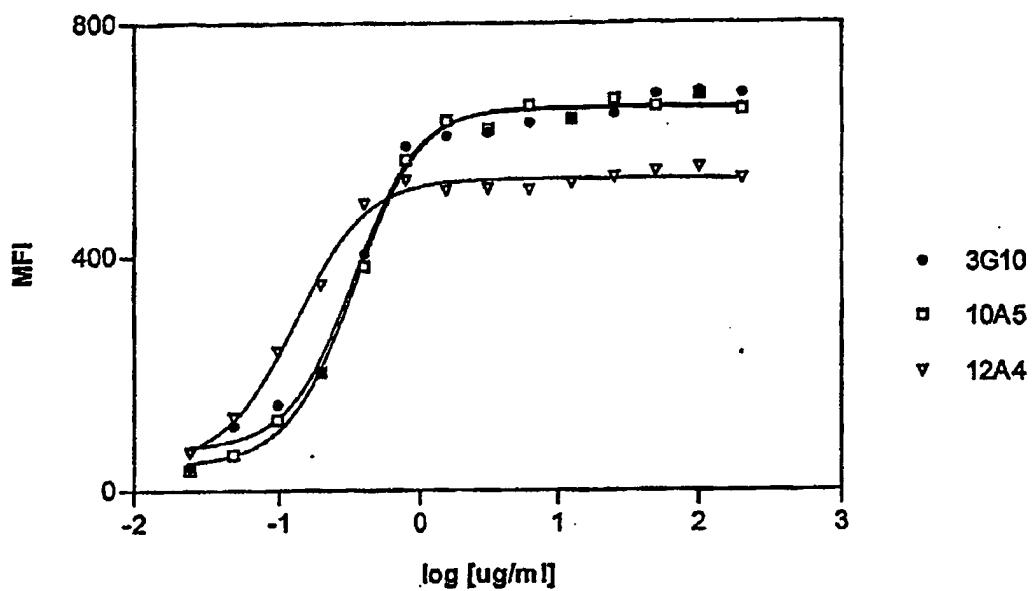


FIG. 33

43/54

**Ligaçāo de anticorpos HuMab anti-PD-L1 a hPD-L1/Fc
(através de teste ELISA)**

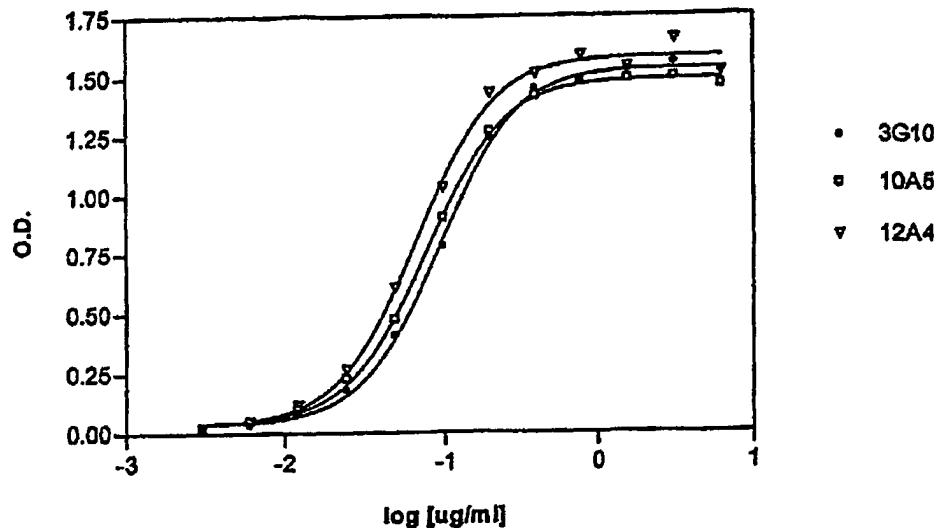


FIG. 34

**Titulação de HuMab PDL1 sobre células T CD4 +
humanas estimuladas**

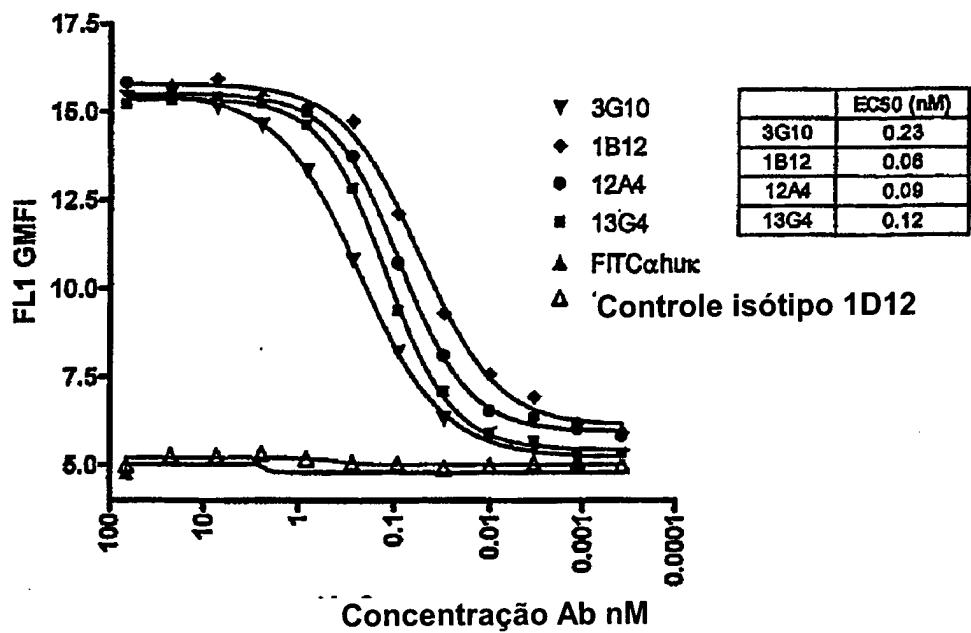


FIG. 35

44/54

**Titulação de HuMab PDL1 sobre PBMC
ativadas de macaco cinomolgo**

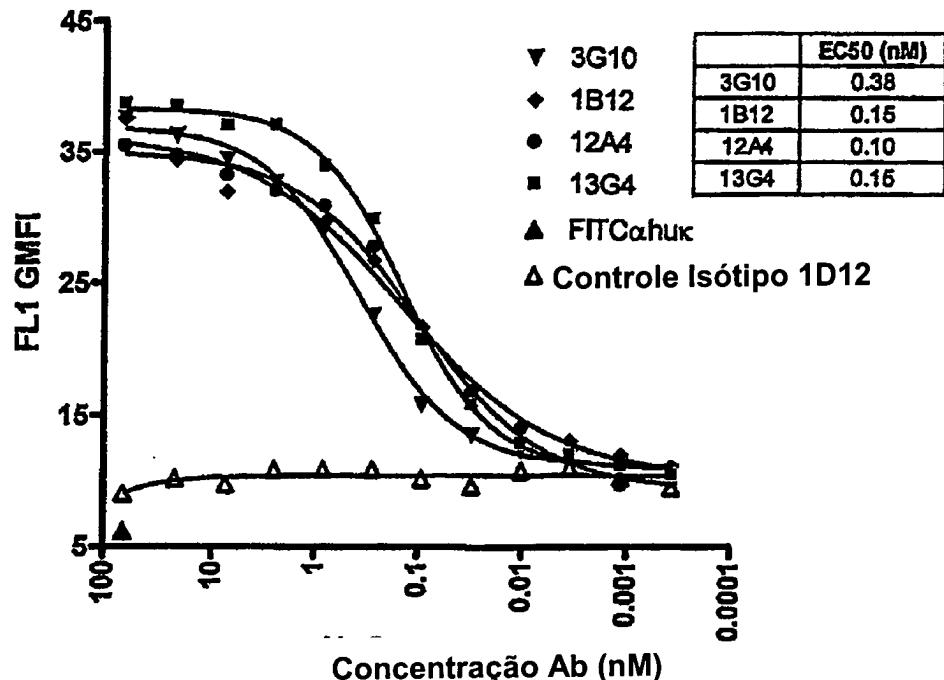


FIG. 36

**Titulação de Célula ES-2 tratada com IFN γ -
Detecção anti-Hu Kappa de HuMAbs α PDL1**

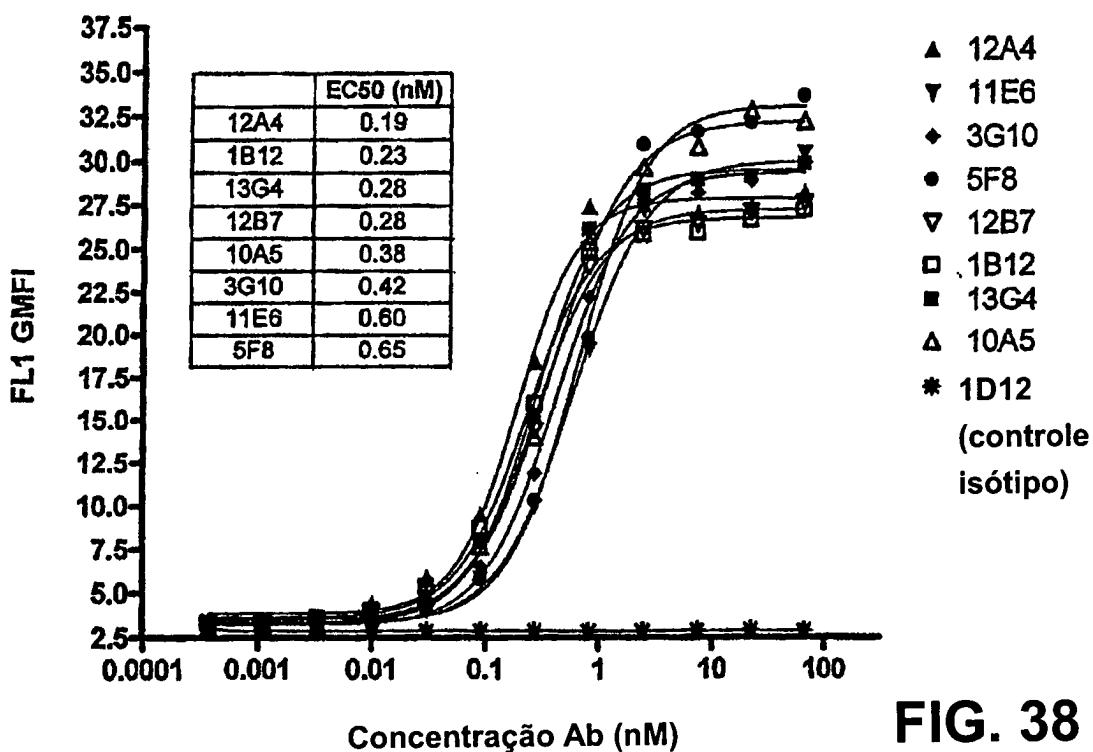
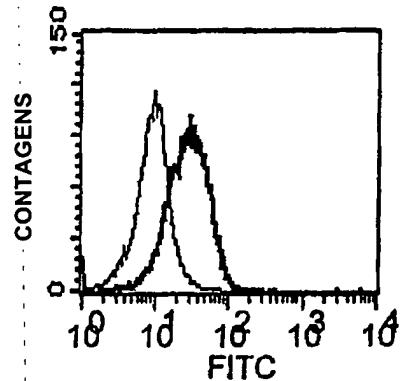


FIG. 38

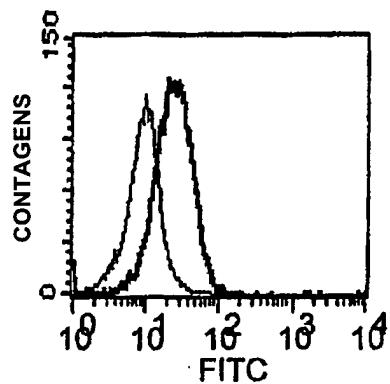
45/54

A



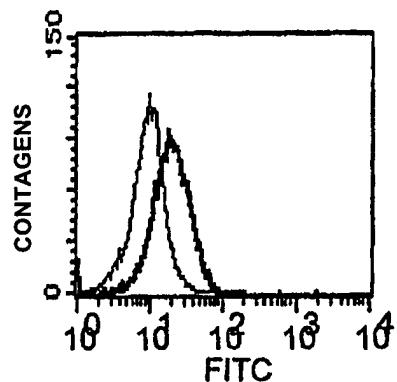
3G10

B



10A5

C



12A4

FIG. 37

46/54

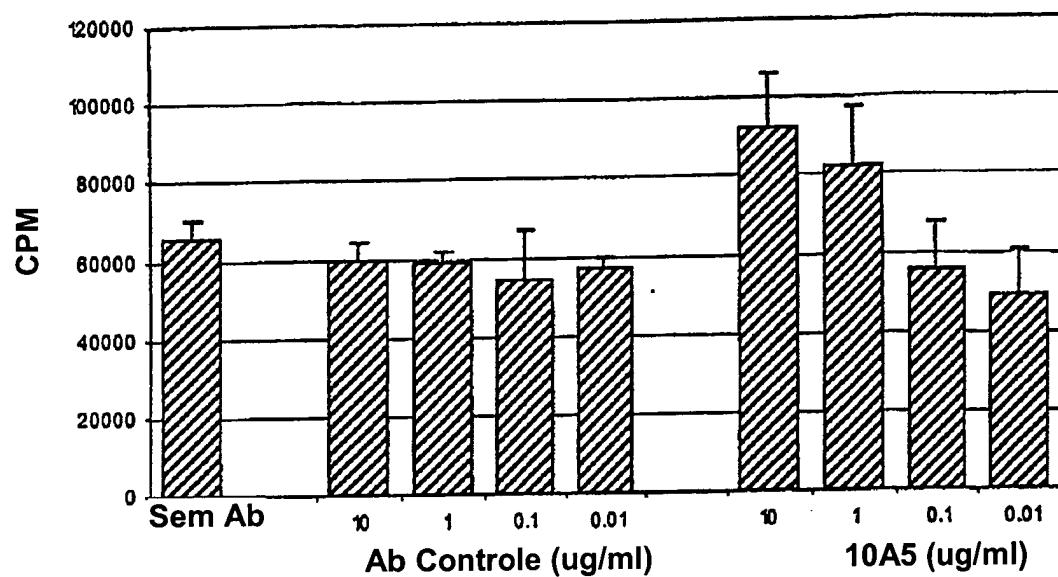


FIG. 39A

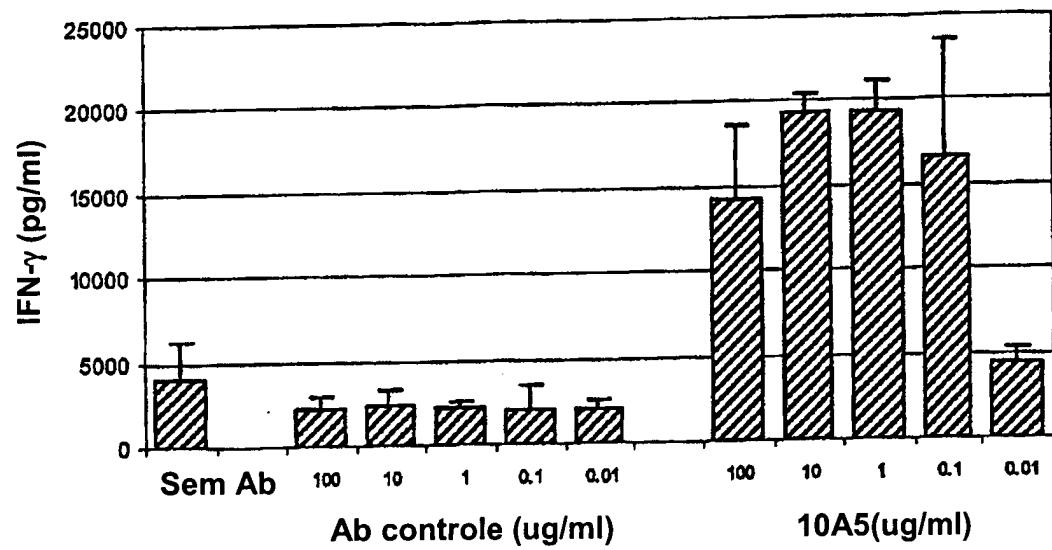


FIG. 39B

47/54

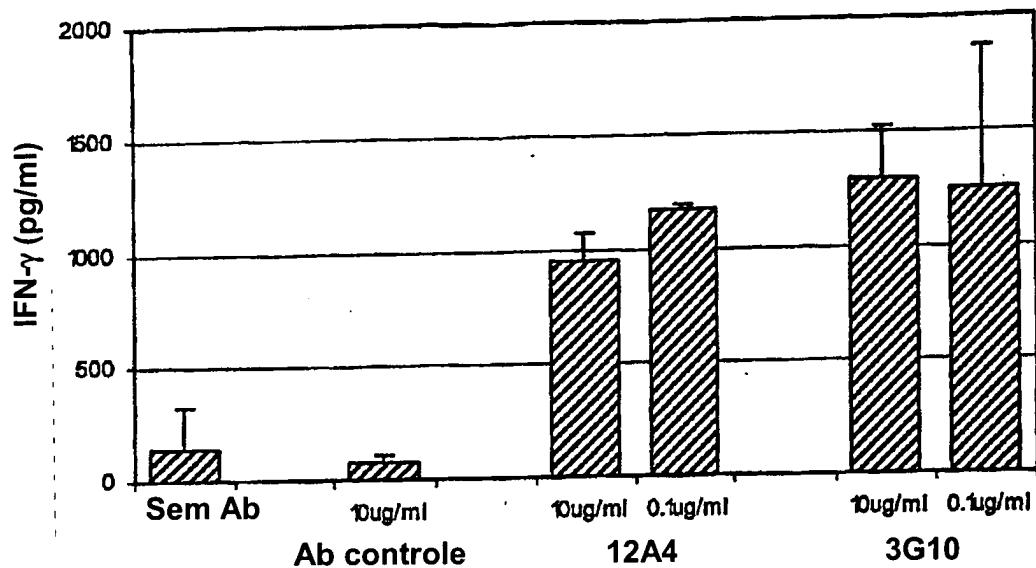


FIG. 39C

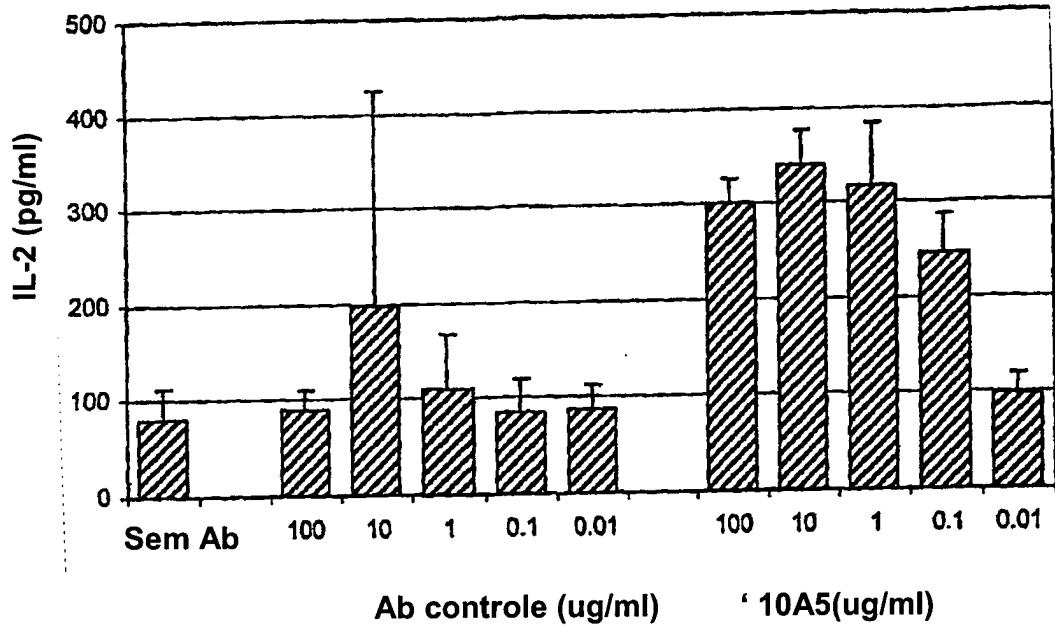


FIG. 39D

48/54

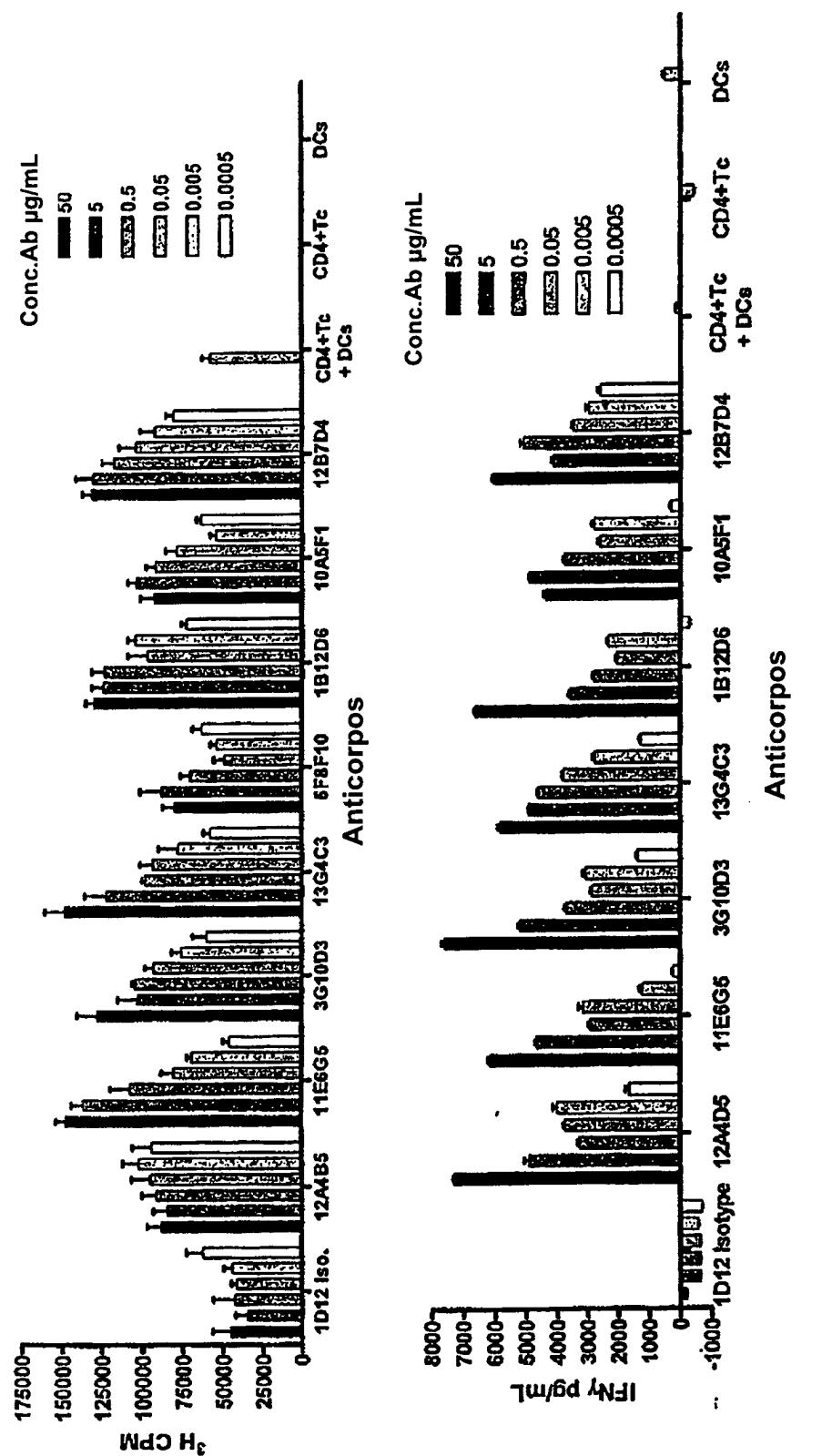


FIG. 40

49/54

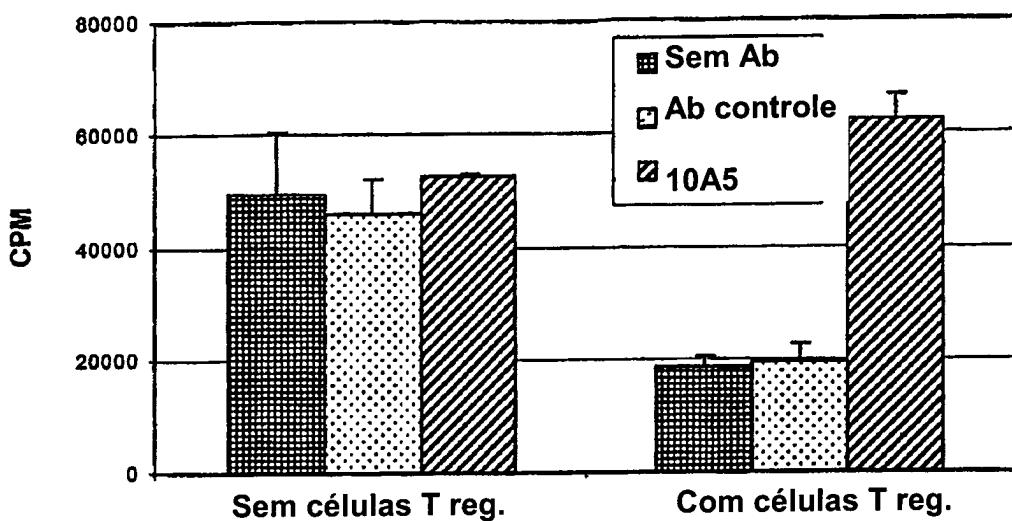


FIG. 41A

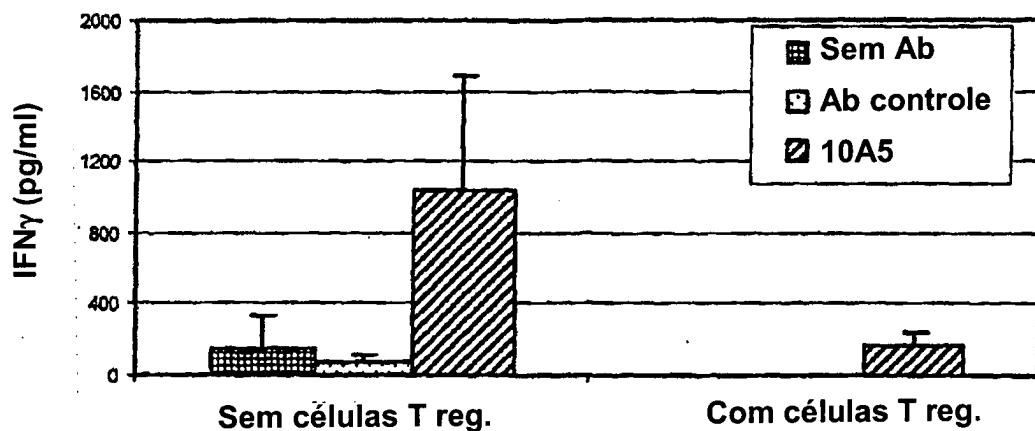


FIG. 41B

Resposta proliferativa num MLR T/T reg./DC na presença de anticorpos humanos anti-PDL1

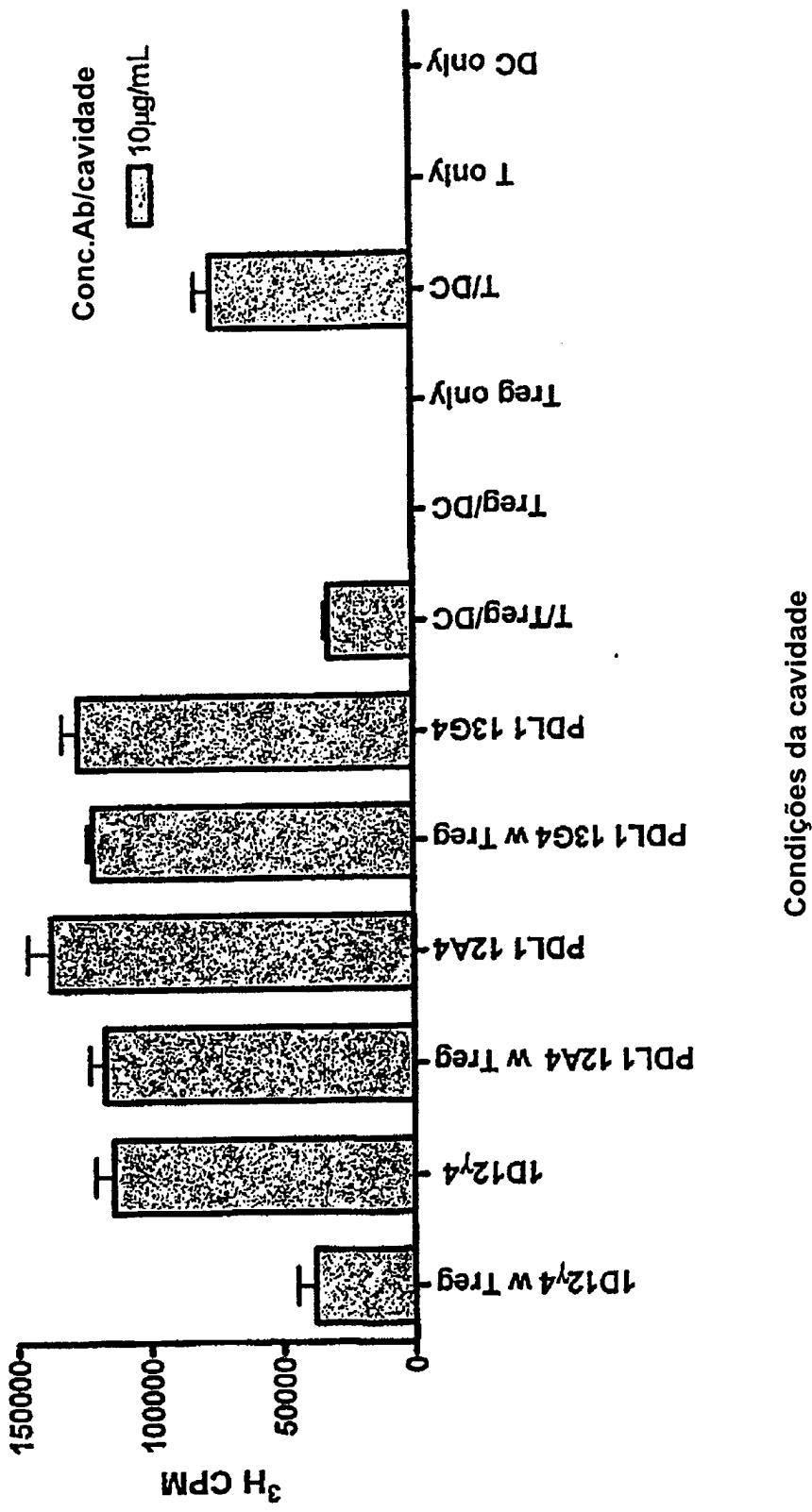


FIG. 42

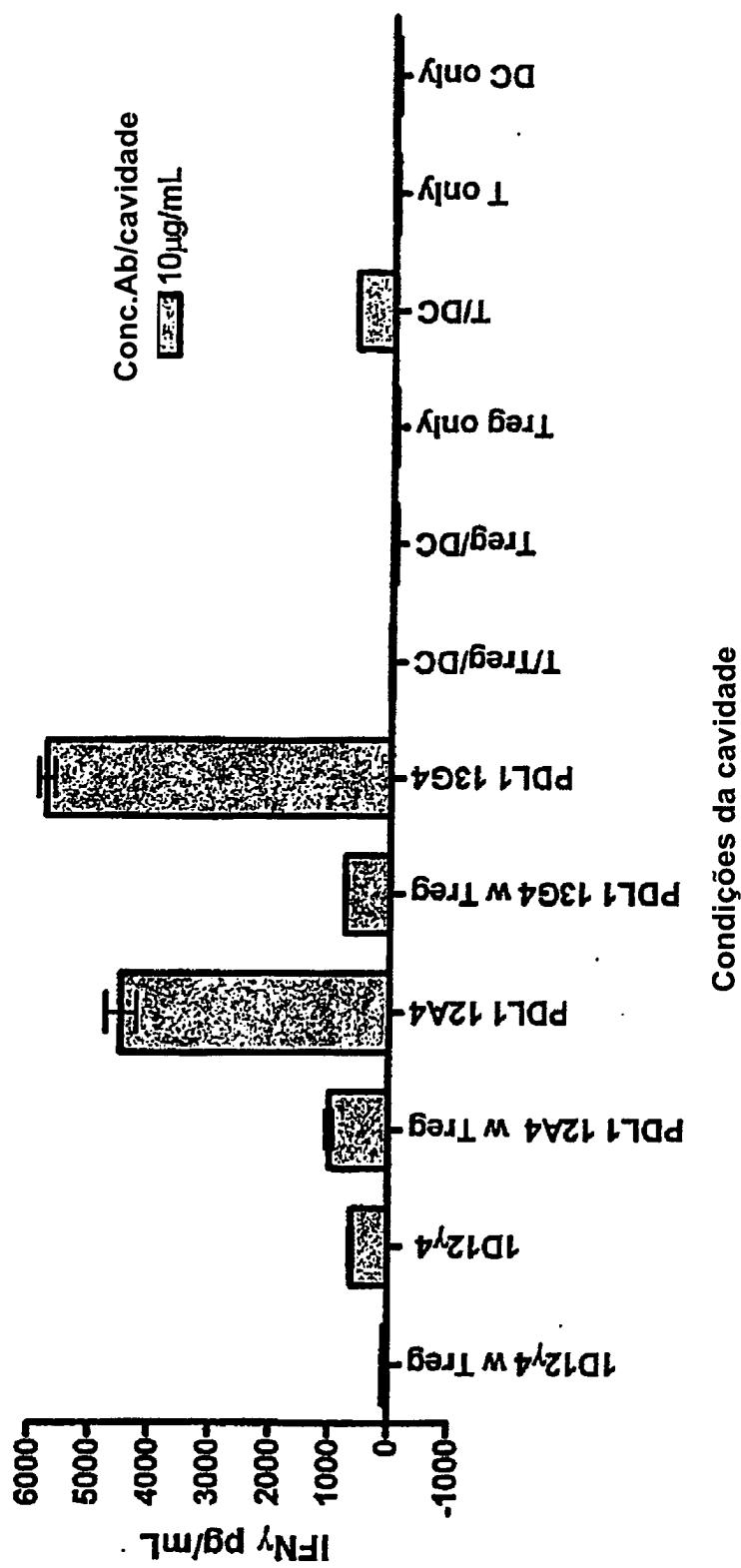
Liberação de IFN γ num MLR T/T reg./DC na presença de anticorpos humanos anti-PDL1

FIG. 43

52/54

PBMC humanas estimuladas com lisado CMV –
Secreção IFN- γ

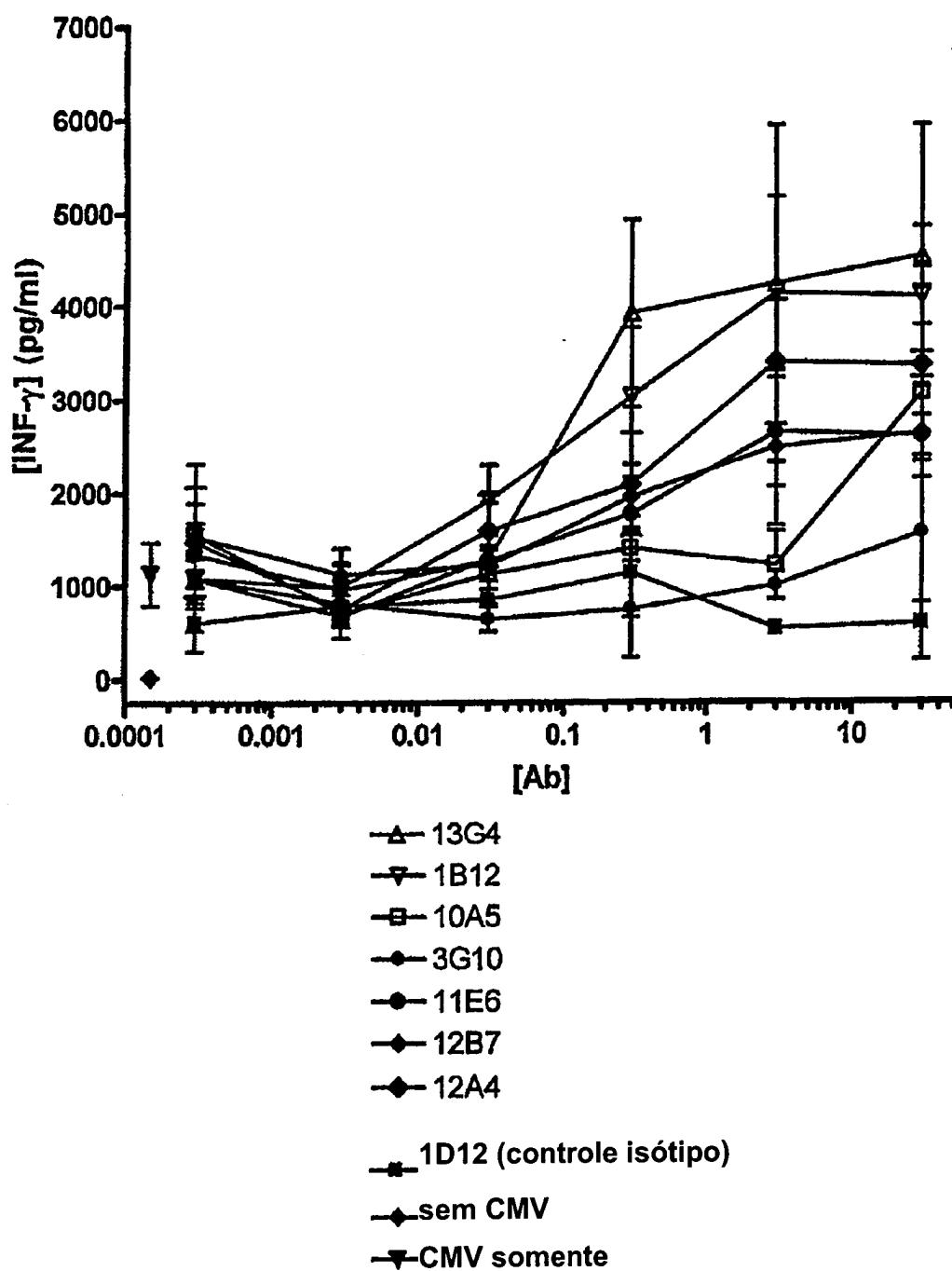


FIG. 44

53/54

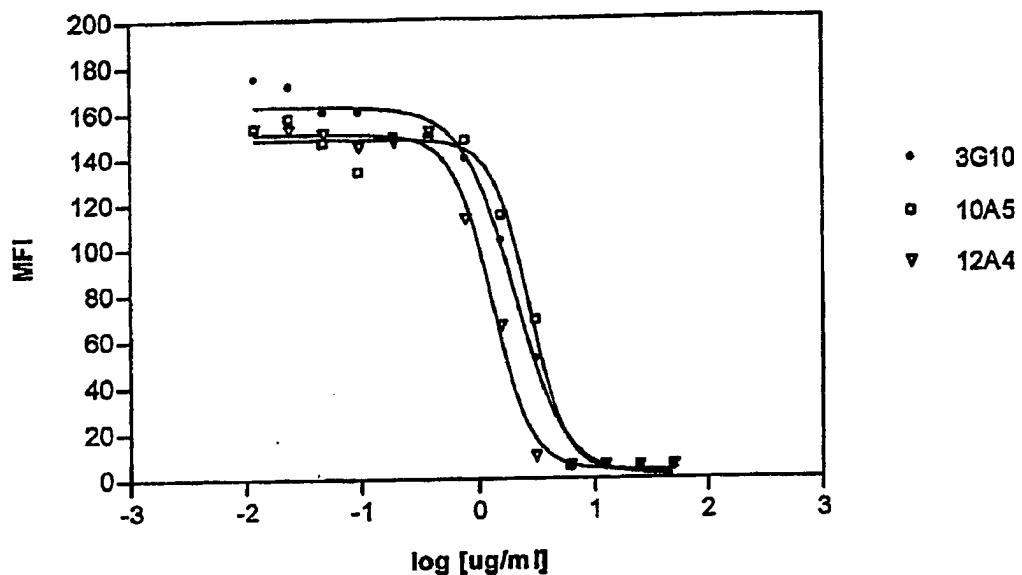


FIG. 45

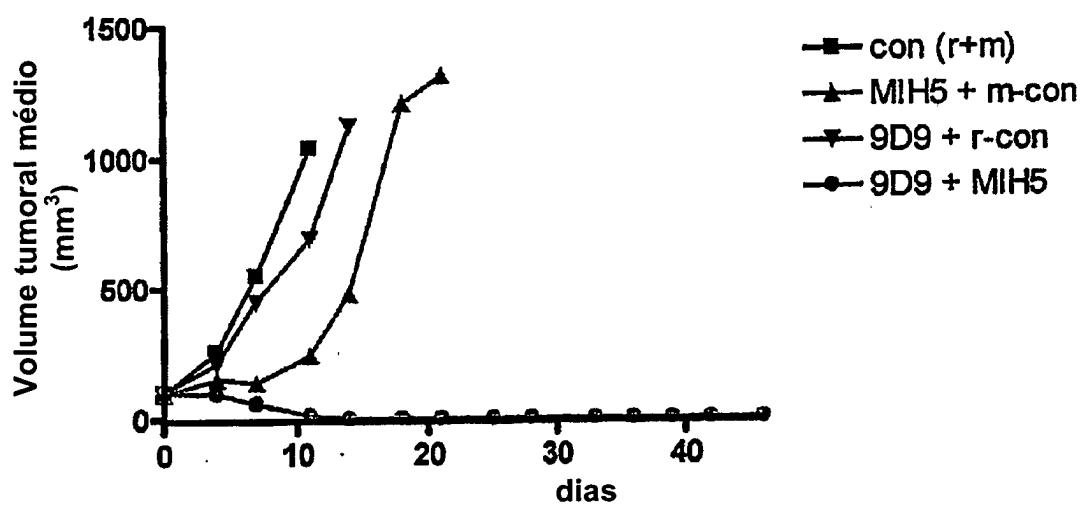
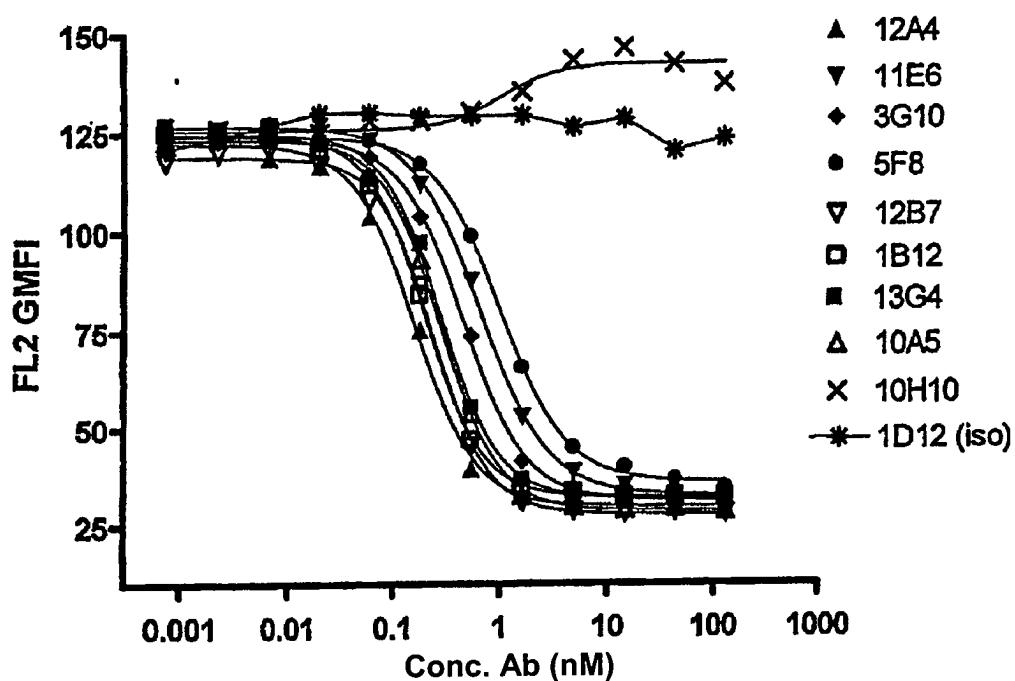


FIG. 47

54/54

Bloqueio de ligação de PD1-Ig por Abs anti-PDL1 sobre células ES-2 tratadas com IFN-gama



| | IC50 (nM) |
|------|-----------|
| 12A4 | 0.17 |
| 1B12 | 0.21 |
| 12B7 | 0.25 |
| 10A5 | 0.29 |
| 13G4 | 0.29 |
| 3G10 | 0.47 |
| 11E6 | 0.68 |
| 5F8 | 1.03 |

FIG. 46

RESUMO

"ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO, COMPOSIÇÃO, IMUNOCONJUGADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, 5 CAMUNDONGO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA MODULAR UMA RESPOSTA IMUNE NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA INIBIR CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA TRATAR UMA DOENÇA INFECCIOSA NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA AUMENTAR UMA RESPOSTA IMUNE A UM ANTÍGENO NUM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA 10 TRATAR OU PRÉVENIR UMA DOENÇA INFLAMATÓRIA NUM INDIVÍDUO E MÉTODO PARA PREPARAR O ANTICORPO ANTI-PD-L1".

A presente descrição provê anticorpos monoclonais isolados, especialmente anticorpos monoclonais humanos que ligam-se especificamente a PD-L1 com alta afinidade. 15 Moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos da presente descrição, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos da presente descrição são também providos. Imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas 20 compreendendo os anticorpos da invenção são também providos. A descrição também provê métodos para detectar PD-L1, bem como métodos para tratar diversas doenças, inclusive o câncer e doenças infecciosas, utilizando anticorpos anti-PD-L1.