



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

(21) BR 112020021271-7 A2



(22) Data do Depósito: 17/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 26/01/2021

(54) Título: CONSTRUTOS BISPECÍFICOS E ANTICORPOS ANTI- CD27 E ANTI-PD-L1

(51) Int. Cl.: A61P 35/00; C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 17/04/2018 US 62/658,899; 29/03/2019 US 62/826,091.

(71) Depositante(es): CELLDDEX THERAPEUTICS, INC..

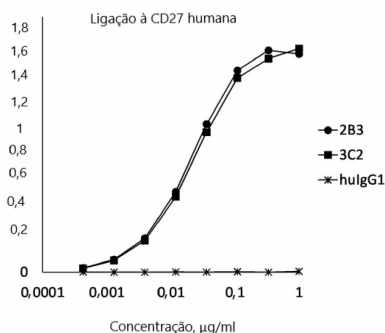
(72) Inventor(es): TIBOR KELER; JOEL GOLDSTEIN; LAURA A. VITALE; LIZHEN HE.

(86) Pedido PCT: PCT US2019027897 de 17/04/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/204462 de 24/10/2019

(85) Data da Fase Nacional: 16/10/2020

(57) Resumo: Trata-se de anticorpos anti-CD27 e anti-PD-L1 inovadores e domínios de ligação dos mesmos, bem como construtos biespecíficos e domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1. Também são fornecidos no presente documento métodos para estimular a atividade de células T, métodos para induzir ou aumentar uma resposta imunológica e métodos para tratar uma doença ou condição (por exemplo, câncer) pela administração dos construtos biespecíficos, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, ou composições descritos no presente documento a um paciente em necessidade dos mesmos.



“CONSTRUTOS BISPECÍFICOS E ANTICORPOS ANTI-CD27 E ANTI-PD-L1”

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório nº. US 62/658.899 (depositado em 17 de abril de 2018) e do Pedido Provisório nº. US 62/826.091 (depositado em 29 de março de 2019). O conteúdo dos pedidos acima mencionados é incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

I. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] As interações entre as células T e as células que apresentam antígeno envolvem uma variedade de moléculas acessórias que facilitam a geração de uma resposta imunológica. Uma dessas moléculas é CD27, que se liga a CD70 e pertence à superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNF-R) (Ranheim, EA *et al.* (1995) *Blood*, 85 (12): 3.556 a 3.565). A CD27 existe tipicamente como uma proteína transmembranar do tipo I glicosilada, frequentemente na forma de homodímeros com uma ponte de dissulfeto ligando os dois monômeros. A ponte de dissulfeto está no domínio extracelular próximo à membrana (Camerini *et al.* (1991) *J. Immunol.*, 147:3.165 3.169). A CD27 também pode ser expressa em uma forma solúvel (consultar, por exemplo, van Oers, M.H. *et al.* (1993) *Blood* 82 (11):3.430 a 3.436 e Loenen, W.A. *et al.* (1992) *Eur. J. Immunol.*, 22:447). A reticulação do antígeno de CD27 nas células T fornece um sinal coestimulatório que, em conjunto com a reticulação de receptor de células T, podem induzir a proliferação de células T e a ativação imune celular.

[0003] A CD27 é expressa em timócitos maduros, na maioria das células T de sangue periférico CD4+ e CD8+, células exterminadoras naturais e células B (Kobata, T. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(24):11.249 a 11.253). A CD27 também é altamente expressa em linfomas não-Hodgkin de células B e leucemias linfocíticas crônicas de células B (Ranheim, E.A. *et al.* (1995) *Blood*, 85(12):3.556 a 3.565). Além disso, níveis aumentados de proteína CD27 solúvel foram identificados em soros ou sítios de

atividade de doença em infecção parasitária, infecção por citomegalovírus (CMV), sarcoidose, esclerose múltipla e leucemia linfocítica crônica de células B (Loenen, W.A. *et al.* (1992) *Eur. J. Immunol*, 22:447).

[0004] O ligante 1 de morte programada (PD-L1) é uma proteína transmembrana do tipo 1 de 40 kDa que especulou-se desempenhar um papel importante na supressão do sistema imunológico durante eventos específicos, tais como gravidez, aloenxertos de tecido, doença autoimune, e outros estados de doença, tal como hepatite. Normalmente, o sistema imunológico reage a antígenos estranhos que estão associados a sinais de perigo exógenos ou endógenos, o que desencadeia uma proliferação de células T CD8+ específicas para antígeno e/ou células auxiliares CD4+. A ligação de PD-L1 a PD-1 transmite um sinal inibitório que reduz a proliferação dessas células T e também pode induzir apoptose, que é ainda mediada por uma regulação inferior do gene Bcl-2. PD-L1 é abundante em uma variedade de cânceres humanos (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8:787 a 789). A interação entre PD-1 e PD-L1 resulta em uma diminuição nos linfócitos infiltrantes de tumor, uma diminuição na proliferação mediada por receptor de células T e evasão imune pelas células cancerosas (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281 a 287; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 307 a 314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10: 5.094 a 5.100). A supressão imunológica pode ser revertida inibindo-se a interação local de PD-1 com PD-L1, e o efeito é aditivo quando a interação de PD-1 com PD-L2 também é bloqueada (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99: 12.293 a 12.297; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170: 1.257 a 1.266).

[0005] Apesar dos avanços na terapia multimodal, há uma necessidade na técnica de novos e melhores agentes terapêuticos para tratar condições ou doenças (por exemplo, em que a estimulação de uma resposta imunológica é desejada). Assim, é um objetivo da presente invenção fornecer métodos melhorados para tratar sujeitos com tais condições ou doenças (por exemplo, câncer).

II. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] São fornecidos no presente documento anticorpos anti-CD27 e anti-PD-L1 inovadores e domínios de ligação dos mesmos, bem como construtos biespecíficos e construtos multiespecíficos que compreendem um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1. Também são fornecidos no presente documento métodos para estimular a atividade de células T, métodos para induzir ou aumentar uma resposta imunológica e métodos para tratar uma doença ou condição (por exemplo, câncer) pela administração de construtos biespecíficos ou multiespecíficos, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, ou composições descritas no presente documento a um paciente em necessidade dos mesmos.

[0007] Um exemplo de anticorpo anti-CD27 é o anticorpo 3C2, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 3C2. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 3C2 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 17, e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 3C2 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, o anticorpo

ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas em SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 18, respectivamente.

[0008] Outro exemplo de anticorpo anti-CD27 é o anticorpo 2B3, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 2B3. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 2B3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 19, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 3C2 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 20. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências apresentadas nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que possui as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 19. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 20. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20, respectivamente.

[0009] Um exemplo de anticorpo anti-PD-L1 é o anticorpo 7H7, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 7H7. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os

domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 7H7 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 77, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 7H7 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 78. Em outra modalidade, o anticorpo ou o domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 77. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 77. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 77 e SEQ ID NO: 78, respectivamente.

[0010] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 1B3, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 1B3. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 1B3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 79, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 1B3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 80. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve

que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou o domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que possui as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 79. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve com as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 80. Em outra modalidade, o anticorpo ou o domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 79 e SEQ ID NO: 80, respectivamente.

[0011] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 3B6, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 3B6. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 3B6 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 81, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 3B6 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 82. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 81. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 82. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões

variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 81 e SEQ ID NO: 82, respectivamente.

[0012] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 8B1, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 8B1. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 8B1 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 83, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 8B1 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 84. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 83. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 84. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84, respectivamente.

[0013] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 4A3, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 4A3. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de

anticorpo 4A3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 85, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 4A3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 86. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 85. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 86. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 85 e SEQ ID NO: 86, respectivamente.

[0014] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 9H9, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 9H9. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 9H9 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 87, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 9H9 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 88. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64,

respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 87. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 88. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 87 e SEQ ID NO: 88, respectivamente.

[0015] Em uma modalidade, as regiões CDR1, 2 e/ou 3 dos domínios de ligação anti-C27 ou anti-PD-L1 descritos no presente documento podem compreender as sequências de aminoácidos exatas como aquelas dos anticorpos 3C2, 2B3, 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 e 9H9 divulgados no presente documento. Em outra modalidade, os anticorpos compreendem derivados das sequências exatas de CDR de 3C2, 2B3, 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 e 9H9, mas ainda retêm a capacidade de se ligar a CD27 ou PD-L1 de forma eficaz. Essas modificações de sequência podem incluir uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) adições, deleções ou substituições de aminoácidos, por exemplo, modificações de sequência conservativas.

[0016] Em outra modalidade, os domínios de ligação anti-C27 ou anti-PD-L1 descritos no presente documento podem ser compostos por uma ou mais CDRs que são, por exemplo, 90%, 95%, 98% ou 99,5% idênticas a uma ou mais CDRs de anticorpos 3C2, 2B3, 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 e 9H9. Faixas intermediárias aos valores citados acima, por exemplo, CDRs que são de 90 a 95%, 95 a 98% ou 98 a 100% idênticas em identidade a uma ou mais das sequências acima também se destinam a ser abrangidas pela presente invenção.

[0017] As sequências de anticorpos também podem ser sequências consenso de vários anticorpos. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada CDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos

selecionada a partir da sequência consenso: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO: 167). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 168. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada CDR3 que compreende a SEQ ID NO: 169. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 170. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia leve CDR2 que compreende a SEQ ID NO: 171. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia leve CDR3 que compreende a SEQ ID NO: 172.

[0018] Sequências substancialmente idênticas aos domínios de ligação anti-CD27 e/ou anti-PD-L1 descritos no presente documento (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas), também são abrangidas pela invenção. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica à mesma (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende

a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0019] Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação

anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0020] Os anticorpos anti-CD27 e/ou anti-PD-L1 ou seus domínios de ligação que competem pela ligação com qualquer um dos anticorpos ou domínios de ligação dos mesmos descritos no presente documento ou que se ligam ao mesmo epítipo que qualquer um dos anticorpos ou domínios de ligação dos mesmos descritos no presente documento também são adequados para uso e são abrangidos pela invenção. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação ao CD27 com o anticorpo 3C2 e/ou o anticorpo 2B3, conforme descrito no presente documento. Por exemplo, conforme descrito no Exemplo 28, os anticorpos da invenção (por exemplo, anticorpo 2B3) se ligam a um ou mais resíduos dentro dos aminoácidos 80 a 95 do ECD de CD27 humana (SEQ ID NO: 183), por exemplo, um ou mais resíduos dentro dos aminoácidos 85 a 89, por exemplo, aminoácidos 85, 87, 88 e/ou 89 do ECD de CD27 humana (SEQ ID NO: 183).

[0021] Em outra modalidade, os anticorpos se ligam ao ECD do tipo selvagem de CD27 humana, mas não a uma versão mutada de

ECD que tem substituições de aminoácidos em uma ou mais posições dentre os resíduos de aminoácidos 85 a 89 (por exemplo, A85S, R87A, N88A, e/ou G89A) do ECD de CD27 humana (SEQ ID NO: 183). Por exemplo, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, liga-se ao ECD do tipo selvagem de CD27 humana (SEQ ID NO: 183), mas não se liga a uma versão mutada de ECD do tipo selvagem de CD27 humana que tem as seguintes substituições de aminoácidos: A85S, R87A, N88A e G89A.

[0022] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação se liga ao mesmo epítipo em CD27 como o anticorpo 3C2 e/ou o anticorpo 2B3, conforme descrito no presente documento. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação anti-PD-L1 compete pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 e/ou 9H9, conforme descrito no presente documento. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 e/ou 9H9, conforme descrito no presente documento.

[0023] Em um aspecto, é fornecido um construto biespecífico (ou construto multiespecífico) que compreende um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1, em que:

(i) o domínio de ligação anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas da mesma; e

- (ii) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende:
 - a. uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da sequência consenso: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO: 167);
 - b. uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 168;
 - c. uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 169;
 - d. uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 170;
 - e. uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 171; e
 - f. uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 172.

Em outra modalidade, um construto biespecífico que compreende um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1, em que:

- (i) o domínio de ligação anti-CD27 compreende:
 - a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, ou
 - b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas da mesma; e

- (ii) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas; ou

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

[0024] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende a região variável de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de

ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente.

[0025] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

[0026] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente.

[0027] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

[0028] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1,

CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente.

[0029] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

[0030] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51, e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0031] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região

variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

[0032] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57, e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0033] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

[0034] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou

modificações de sequência conservativas das mesmas, e um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0035] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0036] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33, e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0037] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de

ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

[0038] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39, e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0039] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) e domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

[0040] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende a região variável de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 conforme estabelecido em SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende a região variável de cadeia pesada CDR1,

CDR2 e CDR3 conforme estabelecido em SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas e CDR1 de região variável de cadeia leve, CDR2 e CDR3 conforme estabelecido em SEQ ID NOs: 44, 45, e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0041] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

[0042] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0043] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que

compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

[0044] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0045] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

[0046] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61,

respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

[0047] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0048] Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 e o domínio de ligação anti-CD27 são geneticamente fundidos. O construto biespecífico pode ser, por exemplo, uma proteína de fusão, que pode ser produzida por engenharia genética com o uso de técnicas de DNA recombinante padrão para ligar operacionalmente o ácido nucleico que codifica os domínios de ligação anti-CD27 e anti-PD-L1. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 e o domínio de ligação anti-CD27 são quimicamente conjugados.

[0049] Por exemplo, o construto biespecífico pode ser um conjugado químico, que pode ser produzido por meio de conjugação química dos domínios de ligação anti-CD27 e anti-PD-L1. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 está ligado ao C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-PD-L1. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 é um scFv.

[0050] Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 está ligado ao C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-CD27. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é um scFv.

[0051] Em uma modalidade particular, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente;

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente;

c. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente;

d. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente;

e. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ

ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; ou

f. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente; e

g. um domínio constante de IgG1 humano.

Em outra modalidade específica, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; e

c. um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente;

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente;

c. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente,

e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente;

d. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente;

e. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; ou

f. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente; e

[0052] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; ou

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;

- c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;
 - d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;
 - e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; ou
 - f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88; e
 - g. um domínio constante de IgG1 humano.
- Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:
- (i) o anticorpo anti-CD27 compreende:
 - a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; ou
 - b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e
 - c. um domínio constante de IgG1 humano; e
 - (ii) o scFv anti-PD-L1 compreende:
 - a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;
 - b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;

- c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;
- d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;
- e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; ou
- f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0053] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

- (i) o scFv anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente; e
- (ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 50, 51 e 52, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano.

[0054] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

- (i) o anticorpo anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente.

[0055] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 e um domínio constante de IgG1 humano.

[0056] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

[0057] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano.

[0058] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0059] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 e um domínio constante de IgG1 humano.

[0060] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região

variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0061] Em outra modalidade, o construto biespecífico tem uma ou mais das seguintes características funcionais: induz a ativação de NFkB, aumenta a proliferação de células T, induz uma resposta de células T CD8 e/ou aumenta a produção de IL-2. Em outra modalidade, o construto biespecífico aumenta a produção de IL-2 em pelo menos cerca de 1,5 vez (por exemplo, pelo menos 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes ou 4 vezes) em comparação com um anticorpo monoclonal anti-CD27 ou anticorpo monoclonal anti-PD-L1 isoladamente. Em outra modalidade, o construto biespecífico induz uma resposta de células T CD8 pelo menos cerca de 2 vezes maior (por exemplo, pelo menos 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 5,5 vezes, 6 vezes, 6,5 vezes, 7 vezes, 7,5 vezes, 8,0 vezes, 8,5 vezes ou 9 vezes) do que um anticorpo monoclonal anti-CD27 isoladamente. Em outra modalidade, o construto biespecífico aumenta a sobrevivência em pelo menos cerca de 1,5 vez mais (por exemplo, pelo menos 1,5 vez, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes) em comparação com um anticorpo monoclonal anti-CD27 ou anticorpo monoclonal anti-PD-L1 isoladamente. Em outra modalidade, o construto biespecífico diminui o peso do tumor em pelo menos cerca de 1,5 vez (por exemplo, pelo menos 1,5 vez, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes) em comparação com anticorpos monoclonais anti-CD27 ou anticorpos monoclonais anti-PD-L1 isoladamente ou em combinação. Em outra modalidade, o construto biespecífico aumenta a produção de células T em pelo menos cerca de 1,5 vez (por exemplo, pelo menos 1,5 vez, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 5,5 vezes, 6 vezes, 6,5 vezes, 7 vezes, 7,5 vezes, 8,0 vezes, 8,5 vezes ou 9 vezes) em comparação com anticorpos monoclonais anti-CD27 ou anticorpos monoclonais anti-PD-L1 isoladamente ou em combinação.

[0062] Em determinadas modalidades, os construtos biespecíficos descritos no presente documento exibem efeitos sinérgicos (por exemplo, no aumento de respostas imunes *in vivo*) em comparação com o uso de domínios de ligação anti-CD27 e domínios de ligação anti-PD-L1 em combinação (isto é, coadministração de anticorpos não ligados).

[0063] Em outro aspecto, anticorpos anti-CD27 inovadores, ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, são fornecidos, os quais compreendem qualquer um dos domínios de ligação anti-CD27 descritos no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0064] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

[0065] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tem uma ou mais das seguintes

características funcionais: induz ou aumenta uma resposta imunológica mediada por células T, bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 (por exemplo, parcialmente ou completamente), induz a ativação de NFκB, aumenta a proliferação de células T, liga-se à CD27 humana com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10^{-9} M ou menos ou, alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10^{+9} M⁻¹ ou mais, induz citotoxicidade específica mediada por complemento (CDC) de células que expressam CD27, induz a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), lise específica de células que expressam CD27, induz ou aumenta as respostas imunológicas específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno, induz ou intensifica respostas imunológicas de TH1 específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno, induz ou aumenta a proliferação ou a ativação de células T específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno; e/ou induz ou aumenta a atividade de células T quando combinada com ativação de TCR simultânea, separada ou sequencial.

[0066] Em outro aspecto, um construto biespecífico é fornecido, em que o construto biespecífico compreende qualquer um dos anticorpos anti-CD27 descritos no presente documento ligados a um domínio de ligação anti-PD-L1. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente;

b. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente;

c. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente;

d. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente;

e. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; e

f. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0067] Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78; (b) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80; (c) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82; (d) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84; (e) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região

variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; e (f) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88. Em uma modalidade específica, o domínio de ligação anti-PD-L1 é um scFv.

[0068] Em determinadas modalidades, os construtos biespecíficos descritos no presente documento exibem efeitos sinérgicos (por exemplo, no aumento de respostas imunes *in vivo*) em comparação com o uso de domínios de ligação anti-CD27 e domínios de ligação anti-PD-L1 em combinação (isto é, coadministração de anticorpos não ligados).

[0069] Em outro aspecto, novos anticorpos anti-PD-L1, ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, são fornecidos, os quais compreendem qualquer um dos domínios de ligação anti-PD-L1 descritos no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 90% idênticas às

mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 90% idênticas às

mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0070] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tem uma ou mais das seguintes características funcionais: (a) bloqueia a ligação de PD1 a PD-L1 (por exemplo, parcialmente ou completamente), (b) induz a ativação da via de NFAT e/ou (c) induz uma resposta mista de linfócitos.

[0071] Em outro aspecto, um construto biespecífico é fornecido, em que o construto biespecífico compreende qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento, ligados a um domínio de ligação anti-CD27. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18, ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20, ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano.

[0072] Em determinadas modalidades, os construtos biespecíficos descritos no presente documento exibem efeitos sinérgicos (por exemplo, no aumento de respostas imunes *in vivo*) em comparação com o uso de domínios de ligação anti-CD27 e domínios de ligação anti-PD-L1 em combinação (isto é, coadministração de anticorpos não ligados).

[0073] Em outro aspecto, no presente documento são fornecidas composições que incluem qualquer um dos construtos biespecíficos (construtos multiespecíficos), anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos neste documento, e um carreador farmacologicamente aceitável. Também são fornecidos kits que compreendem qualquer um dos construtos biespecíficos (construtos multiespecíficos), anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento, e instruções de uso.

[0074] Em um aspecto adicional, moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam os domínios de ligação, anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos e construtos biespecíficos ou multiespecíficos descritos no presente documento também são fornecidos, bem como vetores de expressão que compreendem tais ácidos nucleicos e células hospedeiras que

compreendem tais vetores de expressão. Em outra modalidade, é fornecida uma molécula de ácido nucleico que codifica qualquer um dos domínios de ligação, anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, ou construtos biespecíficos descritos no presente documento. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico está sob a forma de um vetor de expressão. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico está sob a forma de um vetor de expressão que expressa o domínio de ligação, anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo, ou construto biespecífico quando administrado a um sujeito in vivo.

[0075] Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável de anticorpo, em que a região variável de anticorpo compreende a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a uma ou mais das sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, ou uma sequência de nucleotídeos pelo menos 90% idêntica à mesma (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a uma ou mais das sequências acima mencionadas).

[0076] Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica regiões variáveis de cadeias pesada e leve de um anticorpo, em que as regiões variáveis de cadeias pesada e leve compreendem as sequências de aminoácidos representadas nas SEQ ID NOs: 17 e 18, SEQ ID NOs: 19 e 20, SEQ ID NOs: 77 e 78, SEQ ID NOs: 79 e 80, SEQ ID NOs: 81 e 82, SEQ ID NOs: 83 e 84, SEQ ID NOs: 85 e 86, ou SEQ ID NOs: 87 e 88, respectivamente, ou sequências de aminoácidos pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0077] Em outro aspecto, métodos de estimulação de atividade de células T são fornecidos, os quais compreendem o contato de células T com qualquer um dos anticorpos, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritas no presente documento. A estimulação da atividade de células T pode compreender, por exemplo, estimular a produção de IFN-gama.

[0078] Em ainda outro aspecto, métodos para induzir ou aumentar uma resposta imunológica (por exemplo, contra um antígeno) em um sujeito, que compreende a administração ao sujeito de qualquer um dos anticorpos, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritas no presente documento, em uma quantidade eficaz para induzir ou aumentar uma resposta imunológica no sujeito (por exemplo, contra um antígeno).

[0079] Em um aspecto adicional, são fornecidos métodos para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método compreende administrar ao sujeito qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritas no presente documento, em uma quantidade eficaz para tratar a condição ou doença.

[0080] Em outro aspecto, são fornecidos métodos para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método compreende administrar ao sujeito qualquer um dos anticorpos anti-CD27, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento em combinação com qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento. Por exemplo, em uma modalidade:

(i) o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que

compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente, e (b) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 32, 33 e 34, respectivamente; (b) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 38, 39 e 40, respectivamente; (c) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 44, 45 e 46, respectivamente; (d) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 50, 51 e 52, respectivamente; (e) anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e

CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; e (f) anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0081] Em outra modalidade,

(i) o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e um região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78; (b) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80; (c) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82; (d) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;

(e) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; e (f) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0082] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados separadamente. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados sequencialmente. Por exemplo, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, pode ser administrado primeiramente seguido por (por exemplo, imediatamente seguido por) administração do anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, ou vice-versa. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados juntos. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados simultaneamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados simultaneamente em uma única formulação. Alternativamente, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são formulados para administração separada e são administrados simultaneamente ou sequencialmente. Tal administração simultânea ou sequencial resulta, de preferência, na presença simultânea de ambos os anticorpos em pacientes tratados.

[0083] Em determinadas modalidades, a administração de qualquer um dos anticorpos anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno dos mesmos, descritos neste documento em combinação com qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento, resulta em efeitos sinérgicos (por exemplo, na intensificação das respostas imunológicas *in vivo*) em comparação com o uso de qualquer um dos anticorpos isoladamente.

[0084] O sujeito pode ser, por exemplo, alguém que sofre de uma condição ou doença em que a estimulação de uma resposta imunológica é desejada. Em uma modalidade, a condição ou doença na qual deseja-se a estimulação de uma resposta imunológica é câncer. O método para induzir ou intensificar uma resposta imunológica (por exemplo, contra um antígeno) em um sujeito pode compreender ainda a administração do antígeno ao sujeito. Os antígenos preferenciais a serem coadministrados com os anticorpos, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritas no presente documento, são antígenos tumorais.

III. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0085] A Figura 1 é um gráfico que mostra a ligação dos anticorpos 2B3 e 3C2 de CD27 à CD27 humana recombinante, em função da concentração de anticorpos.

[0086] A Figura 2 é um gráfico que mostra a ligação de anticorpos 2B3 e 3C2 de CD27 à CD27 de cinomolgo recombinante.

[0087] A Figura 3 é um gráfico que mostra a ligação de alto nível de anticorpos 2B3 e 3C2 de CD27 a células Ramos que expressam CD27 em sua superfície.

[0088] A Figura 4 é um gráfico que mostra a ligação de alto nível de anticorpos 2B3 e 3C2 de CD27 a células T.

[0089] A Figura 5 é um gráfico que mostra que os anticorpos 2B3 e 3C2 bloqueiam significativamente a ligação de CD70 a CD27.

[0090] A Figura 6 é um gráfico que mostra a ativação de NFκB significativa induzida por anticorpos 2B3 e 3C2, em função da concentração de anticorpos.

[0091] A Figura 7 é um gráfico que mostra os anticorpos 2B3 e 3C2 que aumentam a proliferação de células T.

[0092] A Figura 8 é um gráfico que mostra os anticorpos anti-PD-L1 que se ligam ao PD-L1 humano em função da concentração de anticorpos.

[0093] A Figura 9 é um gráfico que mostra a ligação de anticorpos anti-PD-L1 a PD-L1 de cinomolgo recombinante.

[0094] A Figura 10 é um gráfico que mostra que os anticorpos anti-PD-L1 bloqueiam significativamente a ligação de PD-L1 a PD1 em função da concentração de anticorpo.

[0095] A Figura 11 é um gráfico que mostra o alto nível de ligação de anticorpos anti-PD-L1 a células que expressam PD-L1 humana como uma função da concentração de anticorpo.

[0096] A Figura 12 é um gráfico que mostra o alto nível de ligação de anticorpos anti-PD-L1 a células dendríticas humanas em função da concentração de anticorpos.

[0097] A Figura 13 é um gráfico que mostra que os anticorpos anti-PD-L1 bloqueiam a interação PD1/PD-L1 entre as células, resultando na ativação da via NFAT.

[0098] A Figura 14 é um gráfico que mostra que os anticorpos anti-PD-L1 induzem uma resposta mista de linfócitos em função da concentração de anticorpos.

[0099] A Figura 15A é um vetor de expressão de DNA representativo contendo a cadeia leve anti-CD27, cadeia pesada anti-CD27 e o peptídeo de cadeia única anti-PD-L1 c-terminal (VL + VH).

[0100] A Figura 15B é um desenho da proteína de anticorpo biespecífico CD27/PD-L1 em que um anticorpo anti-PD-L1 está ligado a um scFv anti-CD27.

[0101] A Figura 15C é um desenho da proteína do anticorpo biespecífico CD27/PD-L1, em que um anticorpo anti-CD27 está ligado a um scFv anti-PD-L1.

[0102] A Figura 15D é uma tabela de construtos biespecíficos anti-CD27/anti-PD-L1 representativos.

[0103] A Figura 15E mostra a caracterização do anticorpo biespecífico CDX-527 por HPLC e eletroforese em gel.

[0104] A Figura 16 é um gráfico que mostra a ligação de construtos biespecíficos anti-CD27/antiPD-L1 (BsAbs) a CD27 e PD-L1 usando um ELISA bifuncional.

[0105] A Figura 17 é um gráfico que mostra o aumento de ativação de NFκB induzida por construtos biespecíficos anti-CD27/anti-PD-L1 em comparação com os anticorpos 1F5 ou 2B3 sozinhos.

[0106] A Figura 18 é um gráfico que mostra os construtos biespecíficos anti-CD27/anti-PD-L1 que bloqueiam a interação PD1/PD-L1 e induzem a ativação da via NFAT em função da concentração de anticorpo.

[0107] A Figura 19 é um gráfico que mostra construtos biespecíficos anti-CD27/anti-PD-L1 que aumentam a produção/secreção de IL-2 em uma reação de linfócitos mistos em comparação com os anticorpos AbX (um conhecido anticorpo monoclonal anti-PD-L1), 8B1 ou 9H9 sozinho.

[0108] As Figuras 20A e 20B são gráficos que mostram que um construto biespecífico anti-CD27/anti-PD-L1 (por exemplo, CD27xAbX) induz uma resposta de células T CD8 mais alta em comparação com o anticorpo monoclonal de CD27 isoladamente.

[0109] A Figura 21 é uma curva de Kaplan-Meier que mostra sobrevivência melhorada de camundongos tratados com um construto biespecífico (por exemplo, CD27xAbX) em comparação com anticorpos CD27 e PD-L1 administrados sozinhos ou em combinação em um modelo de tumor de camundongo.

[0110] A Figura 22A é um gráfico que mostra a diminuição do peso do tumor em camundongos tratados com um construto biespecífico (por exemplo, CD27xAbX) em comparação com anticorpos CD27 e PD-L1 administrados isoladamente ou em combinação. A Figura 22B é um gráfico que mostra a porcentagem aumentada de células T de CD8 em camundongos tratados com um construto biespecífico (por exemplo, CD27xAbX) em comparação com anticorpos CD27 e PD-L1 administrados isoladamente ou em combinação. A Figura 22C é um gráfico que mostra a porcentagem aumentada de células T de CD4 em camundongos tratados com um construto biespecífico (por exemplo, CD27xAbX) em comparação com anticorpos CD27 e PD-L1 administrados isoladamente ou em combinação. A Figura 22D é um gráfico que mostra o aumento de células T de CD8 ativadas em camundongos tratados com um construto biespecífico (por exemplo, CD27xAbX) em comparação com os anticorpos CD27 e PD-L1 administrados isoladamente ou em combinação.

[0111] As Figuras 23A e 23B são gráficos que mostram que o Ab anti-CD27 (por exemplo, CDX-1127) regula positivamente a expressão de PD-L1 em células tumorais e células infiltradas por tumor.

[0112] A Figura 24 é um gráfico que mostra a ligação do construto biespecífico anti-CD27/antiPD-L1 CDX-527 a CD27 e PD-L1 com o uso de um ELISA bifuncional.

[0113] A Figura 25 são gráficos que mostram o aumento de ativação de NFκB induzida pelo construto biespecífico anti-CD27/anti-PD-L1 CDX-527 em comparação com os anticorpos 1F5 ou 2B3 isoladamente (gráfico à esquerda) e também na presença de FcγR1 solúvel (gráfico à direita).

[0114] A Figura 26 é um gráfico que mostra o aumento da produção/secreção de IL-2 em uma reação mista de linfócitos pelo construto biespecífico anti-CD27/anti-PD-L1 CDX-527 em comparação com os anticorpos 2B3 ou 9H9 isoladamente ou em combinação.

[0115] A Figura 27 é um gráfico que mostra o aumento da produção/secreção de IL-2 em células T pelo construto biespecífico anti-CD27/anti-PD-L1 CDX-527 em comparação com os anticorpos 2B3 e 9H9 em combinação.

[0116] A Figura 28 é um gráfico que mostra os níveis séricos de CDX-527 em um estudo farmacocinético de NHP.

[0117] A Figura 29 é um gráfico que mostra o aumento do bloqueio de sinalização de PD-1 pela configuração de 9H9x2B3 em comparação com a configuração de 2B3x9H9.

[0118] A Figura 30 é um gráfico que mostra o aumento da ativação de células T pela configuração de 9H9x2B3 em comparação com a configuração de 2B3x9H9.

[0119] A Figura 31 é um gráfico que mostra o aumento da estimulação de uma resposta de células T CD8+ induzida por vacina por AbXx2B3 em comparação com 2B3xAbX.

[0120] A Figura 32 é um gráfico que mostra o aumento da atividade antitumoral por AbXx2B3 em comparação com 2B3xAbX.

[0121] A Figura 33 é um gráfico que mostra o bloqueio da ligação de PD-L1 a CD80 por anticorpos anti-PD-L1 AbX e 9H9.

[0122] A Figura 34 mostra a sequência do domínio extracelular (ECD) de huCD27 do tipo selvagem e uma versão mutada com substituições nas posições 85, 87, 88 e 89.

[0123] A Figura 35 é um gráfico que mostra a ligação do anticorpo anti-CD27 2B3 a huCD27 do tipo selvagem e huCD27 mutado com sequências, conforme mostrado na Figura 34.

[0124] A Figura 36 é um gráfico que mostra a produção (expressão) melhorada de um construto 9H9x2B3 (DD) modificado em comparação com o construto 9H9x2B3 original (não modificado).

IV. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0125] A CD27 é um importante receptor coestimulador que pode ser explorado para imunoterapia com o uso de

moléculas agonistas. A CD27 desempenha um papel fundamental em diversos processos imunológicos, incluindo a sobrevivência, ativação e funções efetoras de células T, bem como a proliferação e a atividade citotóxica de células exterminadoras naturais (NK). Esses eventos ocorrem em resposta à interação apropriada do ligante (CD70) com a CD27, resultando em eventos de sinalização intracelular que levam à ativação de NF-kB e à expressão de genes relevantes. Tal como acontece com a maioria das moléculas coestimuladoras, a estimulação eficaz de células T com o ligante ou anticorpos agonistas também requer estimulação simultânea através do receptor de células T (TCR).

[0126] A maioria das moléculas agonistas de CD27 requer multimerização ou reticulação para sua atividade. Por exemplo, os anticorpos anti-CD27 que são agonistas são reticulados por meio da interação de seus domínios Fc com os receptores Fc por meio de interações cis ou trans. *In vitro*, isso também pode ser realizado artificialmente com o uso de um anticorpo anti-Ig secundário ou adsorvendo-se o anticorpo a uma matriz de fase sólida. O requisito para a interação de FcR de anticorpos agonistas anti-CD27 implica que a atividade de estimulação de células T é pelo menos parcialmente dependente do número de células que expressam FcR.

[0127] Para eliminar a necessidade de interações de FcR, os agonistas de CD27 foram inventados que 1) eliminam a necessidade de interação com outros receptores além de CD27 (aqui denominados agentes de hiper-reticulação de CD27), ou 2) podem fornecer a reticulação através da interação de receptores alternativos que podem estar em diferentes tipos de células específicas que não expressam FcR, e cujos receptores alternativos também podem fornecer função adicional (aqui denominados agentes multiespecíficos de CD27).

[0128] Em um aspecto, a invenção fornece construtos biespecíficos (ou construtos multiespecíficos) que compreendem um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, ligado a um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo. Esses agentes biespecíficos anti-CD27 x anti-PD-L1 da invenção agora demonstraram exibir

efeitos sinérgicos *in vivo*, como no aumento de parâmetros imunológicos e inibição de crescimento de tumor, em comparação com a coadministração de um anticorpo anti-CD27 com um anticorpo anti-PD-L1 (consultar Exemplos 9 e 10).

[0129] Para que a presente invenção possa ser mais facilmente compreendida, determinados termos são primeiramente definidos. Definições adicionais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

A. DEFINIÇÕES

[0130] Conforme usado no presente documento, o termo “sujeito” inclui qualquer animal humano ou não humano. Por exemplo, os métodos e as composições da presente invenção podem ser usados para tratar um sujeito com um distúrbio imunológico. O termo “animal não humano” inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

[0131] Conforme usado no presente documento, o termo “domínio de ligação” se refere à porção de uma proteína ou anticorpo que compreende os resíduos de aminoácidos que interagem com um antígeno. Os domínios de ligação incluem, mas sem limitação, anticorpos (por exemplo, anticorpos de comprimento total), bem como porções de ligação a antígeno dos mesmos. O domínio de ligação confere ao agente de ligação sua especificidade e afinidade para o antígeno. O termo também cobre qualquer proteína que possui um domínio de ligação que é homólogo ou amplamente homólogo a um domínio de ligação de imunoglobulina. Essas proteínas podem ser derivadas de fontes naturais ou parcialmente ou totalmente produzidas de forma sintética.

[0132] O termo “anticorpo”, conforme referido neste documento, inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação a antígeno (isto é, “porção de ligação a antígeno”) ou sua versão de cadeia única. Um “anticorpo” se refere, em uma modalidade preferencial, a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfeto ou uma porção de ligação a antígeno das mesmas. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A

região constante de cadeia pesada é composta por três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta por uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é composta por um domínio, CL. As regiões de V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). As CDRs aqui identificadas estão de acordo com o sistema Kabat, salvo indicação em contrário. Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas a partir do terminal amino ao terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis de cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássico.

[0133] O termo “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente “fragmento de anticorpo”), conforme usado no presente documento, se refere a um ou mais fragmentos ou porções de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, CD27 humana). Tais “fragmentos” têm, por exemplo, entre cerca de 8 e cerca de 1.500 aminoácidos de comprimento, adequadamente entre cerca de 8 e cerca de 745 aminoácidos de comprimento, adequadamente cerca de 8 a cerca de 300, por exemplo, cerca de 8 a cerca de 200 aminoácidos, ou cerca de 10 a cerca de 50 ou 100 aminoácidos de comprimento. Demonstrou-se que a função de ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios V_L, V_H, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na

região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios V_H e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios de V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544 a 546), que consiste em um domínio de V_H; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada ou (vii) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que podem ser opcionalmente unidas por um ligante sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, de V_L e V_H, sejam codificados por genes separados, os mesmos podem ser unidos, com o uso de métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que sejam produzidos como uma única cadeia de proteína na qual as regiões de V_L e V_H emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (sFv); consultar, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423 a 426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5.879 a 5.883). Esses anticorpos de cadeia única também se destinam a ser abrangidos pelo termo “fragmento de ligação a antígeno” de um anticorpo. Esses fragmentos de anticorpo são obtidos com o uso de técnicas convencionais conhecidas pelos versados na técnica, e os fragmentos são triados quanto à utilidade da mesma maneira que os anticorpos intactos. As porções de ligação a antígeno podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante ou por clivagem enzimática ou química de imunoglobulinas intactas.

[0134] O termo “anticorpo monoclonal”, conforme usado no presente documento, se refere a um anticorpo que exibe uma única especificidade de ligação e afinidade a um epítipo específico. Consequentemente, o termo “anticorpo monoclonal humano” se refere a um anticorpo que exibe uma especificidade de ligação única e que tem regiões constantes variáveis e opcionais derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal transgênico não humano, por exemplo, um camundongo transgênico, que tem um genoma que compreende um transgene de cadeia

pesada humana e um transgene de cadeia leve fundido com uma célula imortalizada.

[0135] O termo “anticorpo humano recombinante”, conforme usado no presente documento, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcrômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir dos mesmos, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatórios recombinantes e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva o *splicing* de sequências de genes de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes compreendem regiões variáveis e constantes que utilizam determinadas sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana são codificadas pelos genes da linhagem germinativa, mas incluem novas disposições e mutações subsequentes que ocorrem, por exemplo, durante a maturação de anticorpo. Como conhecido na técnica (consultar, por exemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1.117 a 1.125), a região variável contém o domínio de ligação a antígeno, que é codificado por vários genes que são novamente dispostos de modo a formar um anticorpo específico para um antígeno estranho. Além da nova disposição, a região variável pode ser ainda modificada por múltiplas mudanças de aminoácidos únicos (referidas como mutação somática ou hipermutação) para aumentar a afinidade do anticorpo com o antígeno estranho. A região constante mudará em resposta posterior a um antígeno (isto é, troca de isotipo). Portanto, as moléculas de ácido nucleico redistribuídas e somaticamente mutadas que codificam os polipeptídeos de imunoglobulina de cadeia leve e de cadeia pesada em resposta a um antígeno podem não ter identidade de sequência com as moléculas de ácido nucleico originais, mas em

vez disso serão substancialmente idênticas ou semelhantes (isto é, têm pelo menos 80% de identidade).

[0136] O termo “anticorpo humano” inclui anticorpos que têm regiões variáveis e constantes (se presentes) de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica para sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*) (consultar, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474):856 a 859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 a 101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13:65 a 93, e Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536 a 546). No entanto, o termo “anticorpo humano” não inclui anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero, tal como um camundongo, foram enxertadas em sequências estruturais humanas (isto é, anticorpos quiméricos e humanizados).

[0137] Um “anticorpo isolado”, conforme usado no presente documento, se destina a se referir a um anticorpo que está substancialmente livre de outros anticorpos com diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente à CD27 humana é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos que não sejam CD27 humana; um anticorpo isolado que se liga especificamente ao PD-L1 humano é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a outros antígenos que não sejam o PD-L1 humano). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítopo pode, no entanto, ter reatividade cruzada com o mesmo antígeno de diferentes espécies. Além disso, um anticorpo isolado é tipicamente substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos.

[0138] O termo “epítopo” ou “determinante antigênico” se refere a um sítio em um antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo se liga especificamente. Os epítopos podem ser formados tanto a partir de

aminoácidos contíguos quanto a partir de aminoácidos não contíguos justapostos por dobramento terciário de uma proteína. Os epítomos formados a partir de aminoácidos contíguos são normalmente retidos na exposição a solventes desnaturantes, enquanto os epítomos formados por dobramento terciário são normalmente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítomo inclui tipicamente pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Métodos para determinar quais epítomos estão ligados por um determinado anticorpo (isto é, mapeamento de epítomo) são bem-conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, *immunoblotting* e ensaios de imunoprecipitação, em que os peptídeos sobrepostos ou contíguos do antígeno (por exemplo, CD27 ou PD-L1) são testados quanto à reatividade com o anticorpo fornecido (por exemplo, anticorpo anti-CD27 ou anti-PD-L1. Os métodos de determinação de conformação espacial de epítomos incluem procedimentos na técnica e aqueles descritos no presente documento, por exemplo, cristalografia de raios-x e ressonância magnética nuclear bidimensional (consultar, por exemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, GE Morris, Ed. (1996)).

[0139] O termo “anticorpo que se liga ao mesmo epítomo” que outro anticorpo se destina a abranger anticorpos que interagem com, isto é, se ligam a, à mesma região estrutural na CD27 humana como um anticorpo anti-CD27 de referência. O “mesmo epítomo” ao qual os anticorpos se ligam pode ser um epítomo linear ou um epítomo conformacional formado por dobramento terciário do antígeno.

[0140] O termo “anticorpo competidor” se refere a um anticorpo que compete pela ligação à CD27 humana com um anticorpo anti-CD27 de referência, ou seja, inibe competitivamente a ligação do anticorpo anti-CD27 de referência à CD27. Um “anticorpo competidor” pode se ligar ao mesmo epítomo na CD27 que o anticorpo anti-CD27 de referência, pode se ligar a um epítomo sobreposto ou pode impedir estericamente a ligação do anticorpo anti-CD27 de referência à CD27.

[0141] Os anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo ou competem pela ligação podem ser identificados com o uso de técnicas de rotina. Essas técnicas incluem, por exemplo, um imunoenensaio, que mostra a capacidade de um anticorpo para bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno-alvo, isto é, um ensaio de ligação competitiva. A ligação competitiva é determinada em um ensaio no qual a imunoglobulina em teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, tal como CD27. Inúmeros tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoenensaio enzimático direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche (consultar Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA direto de biotina-avidina em fase sólida (consultar Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3.614 (1986)); ensaio de marcação direta em fase sólida, ensaio em sanduíche de marcação direta em fase sólida (consultar Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcação direta em fase sólida com o uso de marcação I-125 (consultar Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA direto de biotina-avidina em fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); e RIA marcado direto. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Tipicamente, tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado ligado a uma superfície sólida ou células que contêm qualquer um dos mesmos, uma imunoglobulina de teste não marcada e uma imunoglobulina de referência marcada. A inibição competitiva é medida determinando-se a quantidade de marcador ligado à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina de teste. Normalmente, a imunoglobulina de teste está presente em excesso. Normalmente, quando um anticorpo competidor está presente em excesso, o mesmo inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50 a 55%, 55 a 60%, 60 a 65%, 65 a 70% 70 a 75% ou mais.

[0142] Outras técnicas incluem, por exemplo, métodos de mapeamento de epítopos, tais como análises de raios-x de cristais de complexos de antígeno:anticorpo que fornecem resolução atômica do epítopo.

Outros métodos monitoram a ligação do anticorpo a fragmentos de antígeno ou variações mutadas do antígeno, em que a perda de ligação devido a uma modificação de um resíduo de aminoácido na sequência de antígeno é frequentemente considerada uma indicação de um componente de epítopo. Além disso, métodos computacionais combinatórios para mapeamento de epítopos também podem ser usados. Esses métodos se baseiam na capacidade do anticorpo de interesse de isolar por afinidade peptídeos curtos específicos de bibliotecas combinatórias de peptídeos de exibição de fago. Os peptídeos são, então, considerados como líderes para a definição do epítopo que corresponde ao anticorpo usado para triar a biblioteca de peptídeos. Para o mapeamento de epítopos, também foram desenvolvidos algoritmos computacionais que mostraram mapear epítopos descontínuos conformacionais.

[0143] Conforme usado no presente documento, os termos “ligação específica”, “ligação seletiva”, “se liga seletivamente” e “se liga especificamente” se referem à ligação do anticorpo a um epítopo em um antígeno predeterminado. Normalmente, o anticorpo se liga a uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda menor quando determinada por ressonância plasmônica de superfície (SPR) em um instrumento BIACORE 2000 (por exemplo, com o uso de CD27 humana recombinante como analito e o anticorpo como o ligante) e se liga ao antígeno predeterminado com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior do que sua afinidade para ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) diferente do antígeno predeterminado ou um antígeno intimamente relacionado. As frases “um anticorpo que reconhece um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são usadas de forma intercambiável aqui com o termo “um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno”.

[0144] O termo “ K_D ”, conforme usado no presente documento, destina-se a se referir à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno específica. Tipicamente, os anticorpos humanos da invenção se ligam a CD27 com uma constante de equilíbrio de

dissociação (K_D) de cerca de 10^{-8} M ou menos, tal como menos de 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda menor quando determinada por tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR) em um instrumento BIACORE 2000 (por exemplo, com o uso de CD27 humana recombinante como analito e o anticorpo como ligante).

[0145] O termo “ k_d ”, conforme usado no presente documento, se destina a se referir à constante de taxa de dissociação para a dissociação de um anticorpo do complexo de anticorpo/antígeno.

[0146] O termo “ k_a ”, conforme usado no presente documento, se destina a se referir à constante de taxa ligada à associação de um anticorpo com o antígeno.

[0147] O termo “ EC_{50} ”, conforme usado no presente documento, se refere à concentração de um anticorpo ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que induz uma resposta, seja em um ensaio *in vitro* ou *in vivo*, que é 50% da resposta máxima, isto é, a meio caminho entre a resposta máxima e a linha de base.

[0148] Conforme usado no presente documento, “isotipo” se refere à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificada por genes de região constante de cadeia pesada. Em uma modalidade, um anticorpo monoclonal humano da invenção é do isotipo IgG1. Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal humano da invenção é do isotipo IgG2.

[0149] Conforme usado no presente documento, os termos “inibe” ou “bloqueia” (por exemplo, referindo-se à inibição/bloqueio da ligação de CD70 a CD27 e/ou PD1 a PD-L1) são usados de forma intercambiável e abrangem inibição/bloqueio parcial e completo. A inibição/bloqueio, de preferência, reduz ou altera o nível normal ou tipo de atividade que ocorre quando a ligação ocorre sem inibição ou bloqueio. A inibição e o bloqueio também se destinam a incluir qualquer diminuição mensurável na afinidade de ligação de CD70 quando em contato com um anticorpo anti-CD27 em comparação com CD70 não em contato com um anticorpo anti-CD27, por exemplo, inibe a ligação de CD70 em pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%,

30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 inibe a ligação de CD70 em pelo menos cerca de 70%. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27 inibe a ligação de CD70 em pelo menos 80%. A inibição e o bloqueio também se destinam a incluir qualquer diminuição mensurável na afinidade de ligação de PD1 quando em contato com um anticorpo anti-PD-L1 em comparação com PD1 não em contato com um anticorpo anti-PD-L1, por exemplo, inibe a ligação de PD1 em pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 inibe a ligação de PD1 em pelo menos cerca de 70%. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 inibe a ligação de PD1 em pelo menos 80%.

[0150] O termo “reação cruzada”, conforme usado no presente documento, se refere à capacidade de um domínio de ligação anti-CD27 ou um domínio de ligação anti-PD-L1 da invenção de se ligar a CD27 ou PD-L1, respectivamente, de uma espécie diferente. Por exemplo, um domínio de ligação a CD27 da invenção que se liga a CD27 humano também pode se ligar a outras espécies de CD27. De modo similar, um domínio de ligação anti-PD-L1 da invenção que se liga a PD-L1 humano também pode se ligar a outra espécie de PD-L1. Conforme usado no presente documento, a reatividade cruzada é medida pela detecção de uma reatividade específica com antígeno purificado em ensaios de ligação (por exemplo, SPR, ELISA) ou ligação a, ou de outra forma interagindo funcionalmente com, células que expressam fisiologicamente CD27. Métodos para determinar a reatividade cruzada incluem ensaios de ligação padrão conforme descrito no presente documento, por exemplo, por análise de ressonância de plasmon de superfície Biacore™ (SPR) com o uso de um instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suécia) ou técnicas de citometria de fluxo.

[0151] O termo “de ocorrência natural”, conforme usado no presente documento, aplicado a um objeto, se refere ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, um polipeptídeo ou

sequência polinucleotídica que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado a partir de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem no laboratório é de ocorrência natural.

[0152] A presente invenção também abrange “modificações de sequência conservativas” de qualquer uma das sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 1 a 160, isto é, modificações de sequência de nucleotídeos e aminoácidos que não anulam a ligação das sequências de VH e VL codificadas pela sequência de nucleotídeos ou que contêm a sequência de aminoácidos, para o antígeno. Essas modificações de sequência conservativas incluem substituições de nucleotídeos e aminoácidos conservativas, bem como adições e deleções de nucleotídeos e aminoácidos. Por exemplo, modificações podem ser introduzidas nas SEQ ID NOs: 1 a 160 por técnicas padrão conhecidas na técnica, tais como mutagênese direcionada a sítio e mutagênese mediada por PCR. As substituições conservativas de aminoácidos incluem aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos que têm cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais ramificadas em beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial previsto em um anticorpo anti-CD27 é, de preferência, substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral. Os métodos de identificação de substituições conservativas de nucleotídeos e aminoácidos que não eliminam a ligação ao antígeno são bem-conhecidos na técnica (consultar, por exemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1.180 a 1.187 (1993); Kobayashi *et*

al. Protein Eng. 12(10):879 a 884 (1999); e Burks *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412 a 417 (1997)).

[0153] Em determinadas modalidades, as modificações conservativas da sequência de aminoácidos se referem a no máximo 1, 2, 3, 4 ou 5 substituições conservativas de aminoácidos nas sequências de CDR descritas no presente documento. Por exemplo, cada CDR pode conter até 5 substituições conservativas de aminoácidos, por exemplo, até (isto é, não mais do que) 4 substituições conservativas de aminoácidos, por exemplo, até (isto é, não mais do que) 3 substituições conservativas de aminoácidos, por exemplo, até (isto é, não mais do que) 2 substituições conservativas de aminoácidos ou não mais do que 1 substituição conservativa de aminoácidos.

[0154] Alternativamente, em outra modalidade, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de todo ou parte de uma sequência de codificação do domínio de ligação anti-CD27 ou anti-PD-L1, tal como por mutagênese de saturação, e os anticorpos anti-CD27 ou anti-PD-L1 modificados resultantes podem ser triados quanto à atividade de ligação.

[0155] Para ácidos nucleicos, o termo “homologia substancial” indica que dois ácidos nucleicos, ou sequências designadas dos mesmos, quando idealmente alinhados e comparados, são idênticos, com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriadas, em pelo menos cerca de 80% dos nucleotídeos, geralmente pelo menos cerca de 90% a 95%, e com mais preferência pelo menos cerca de 98% a 99,5% dos nucleotídeos. Alternativamente, há homologia substancial quando os segmentos hibridizarem sob condições de hibridização seletiva, com o complemento da fita.

[0156] Para aminoácidos, o termo “homologia substancial” indica que duas sequências de aminoácidos, ou sequências designadas das mesmas, quando idealmente alinhadas e comparadas, são idênticas, com inserções ou deleções de aminoácidos adequadas, em pelo menos cerca de 80% dos aminoácidos, geralmente pelo menos cerca de 90% a

95%, e com mais preferência pelo menos cerca de 98% a 99% ou 99,5% dos aminoácidos.

[0157] A porcentagem de identidade entre duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de homologia = no. de posições idênticas/no. total de posições x 100), levando em consideração o número de lacunas e o comprimento de cada lacuna, que precisa ser introduzida para o alinhamento ideal das duas sequências. A comparação de sequências e a determinação da identidade percentual entre duas sequências podem ser realizadas com o uso de um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos não limitantes abaixo.

[0158] A identidade percentual entre duas sequências de nucleotídeos pode ser determinada com o uso do programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), com o uso de uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de lacuna de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. A porcentagem de identidade entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos também pode ser determinada com o uso do algoritmo de E. Meyers e W. Miller (CABIOS, 4: 11 a 17 (1989)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), com o uso de uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, a porcentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada com o uso do algoritmo Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444 a 453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), com o uso de uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[0159] As sequências de ácidos nucleicos e de proteínas da presente invenção podem ainda ser usadas como uma “sequência de consulta” para realizar uma pesquisa em bancos de dados públicos para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Essas pesquisas podem ser

realizadas com o uso dos programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 a 410. Pesquisas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, pontuação = 100, comprimento de palavra = 12 para obter sequências de nucleotídeos idênticas às moléculas de ácido nucleico da invenção. As pesquisas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos idênticas às moléculas de proteína da invenção. Para obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado, conforme descrito em Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17):3.389 a 3.402. Ao utilizar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Consultar <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

B. ANTICORPOS ANTI-CD27 E DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO DOS MESMOS

[0160] São fornecidos aqui anticorpos anti-CD27 inovadores e domínios de ligação dos mesmos. O termo “CD27” (também referido como “molécula de CD27”, “receptor de CD27L”, “S1521”, “antígeno de ativação de células T CD27”, “TNFRSF7”, “MGC20393”, “superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 7”, “antígeno de ativação de células T S152”, “Tp55”, “membro 7 de superfamília de fator de necrose tumoral”, “antígeno CD27” e “antígeno de ativação de células T CD27”) se refere a um receptor que é membro da superfamília de receptor de TNF, que se liga à CD70 de ligante. A CD27 é necessária para a geração e manutenção a longo prazo da imunidade de células T e desempenha um papel fundamental na regulação da ativação das células B e na síntese de imunoglobulinas. O termo “CD27” inclui quaisquer variantes ou isoformas de CD27 que são naturalmente expressas por células (por exemplo, CD27 humana depositada com GENBANK® que tem o número de acesso AAH12160.1, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 173). Consequentemente, os domínios de ligação de CD27 da invenção podem reagir de forma cruzada com CD27 de outras espécies além da humana.

Alternativamente, os domínios de ligação de CD27 podem ser específicos para CD27 humano e podem não exibir qualquer reatividade cruzada com outras espécies. A CD27 ou quaisquer variantes e isoformas da mesma, podem ser isoladas de células ou tecidos que as expressam de forma natural ou ser produzidas de forma recombinante com o uso de técnicas bem-conhecidas na técnica e/ou aquelas descritas no presente documento. De preferência, os domínios de ligação de CD27 são direcionados para CD27 humana, que tem um padrão de glicosilação normal.

[0161] O termo “CD70” (também referida como “molécula de CD70”, “CD27L”, “CD27LG”, “TNFSF7”, “membro de superfamília 7 de fator de necrose tumoral (ligante)”, “ligante de CD27”, “antígeno de CD70”, “antígeno de superfície de CD70”, “superfamília de ligante de fator de necrose tumoral, membro 7”, “antígeno Ki-24” e “CD27-L”) se refere ao ligante para CD27 (consultar, por exemplo, Bowman MR *et al.*, *J. Immunol.* 15 de fevereiro de 1994; 152(4):1.756 a 1.761). CD70 é uma proteína transmembranar do tipo II que pertence à família de ligantes de fator de necrose tumoral (TNF). A mesma é um antígeno de superfície em linfócitos T e B ativados que induz a proliferação de células T coestimuladas, aumenta a geração de células T citolíticas e contribui para a ativação de células T. Também foi sugerido que a CD70 desempenha um papel na regulação da ativação de células B, função citotóxica de células exterminadoras naturais e síntese de imunoglobulina (Hintzen RQ *et al.*, *J. Immunol.* 15 de fevereiro de 1994; 152(4):1.762 a 1.773). O número de acesso Genbank® NP_001243 relata a sequência de aminoácidos de CD70 humana (SEQ ID NO: 174).

[0162] Um exemplo de anticorpo anti-CD27 é o anticorpo 3C2, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeia pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 3C2. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 3C2 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 17, e os

domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 3C2 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 18. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas em SEQ ID NO: 17 e SEQ ID NO: 18, respectivamente.

[0163] Outro exemplo de anticorpo anti-CD27 é o anticorpo 2B3, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 2B3. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 2B3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 19, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 3C2 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 20. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências apresentadas nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o

anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que possui as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 19. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 20. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20, respectivamente.

[0164] Sequências substancialmente idênticas aos domínios de ligação anti-CD27 descritos no presente documento (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas (idênticas) às sequências acima mencionadas), também são fornecidas. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica à mesma (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0165] Os anticorpos anti-CD27 e domínios de ligação dos mesmos que competem pela ligação com qualquer um dentre o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo descrito no presente documento ou que se ligam ao mesmo epítopo que qualquer um dentre o anticorpo anti-CD27 ou o domínio de ligação do mesmo descrito no presente documento também são adequados para uso e fornecidos no presente documento. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação à CD27 com o anticorpo 3C2 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesadas e leves e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 3C2). Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação à CD27 com o anticorpo 2B3 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesadas e leves e/ou sequências de região variável de cadeias pesadas e leves correspondentes ao anticorpo 2B3). Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação anti-CD27 do mesmo se liga ao mesmo epítopo na CD27 que o anticorpo 3C2 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesadas e leves e/ou sequências de região variável de cadeias pesadas e leves correspondentes ao anticorpo 3C2). Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítopo no CD27 que o anticorpo 2B3 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesadas e leves e/ou sequências de região variável de cadeias pesadas e leves que correspondem ao anticorpo 2B3).

[0166] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende

a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0167] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

[0168] Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tem uma ou mais das seguintes características funcionais: induz ou aumenta uma resposta imunológica mediada por células T, bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 (por exemplo, parcialmente ou completamente), induz a ativação de NFkB, aumenta a proliferação de células T, se liga à CD27 humana com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10^{-9} M ou menos, ou alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10^{+9} M⁻¹ ou mais, induz citotoxicidade mediada por complemento específico (CDC) de células que expressam CD27, induz citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), lise específica de células que expressam CD27, induz ou aumenta as respostas imunológicas específicas para o antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno, induz ou aumenta respostas imunológicas de TH1 específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno, induz ou aumenta a proliferação ou ativação de células T específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno; e/ou induz ou aumenta a

atividade das células T quando combinada com ativação de TCR simultânea, separada ou sequencial.

C. ANTICORPOS ANTI-PD-L1 E DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO

[0169] São fornecidos no presente documento domínios de ligação de anticorpos anti-PD-L1 inovadores dos mesmos. Conforme usado no presente documento, os termos “Ligante de morte celular programada 1”, “PD-L1”, “ligante 1 de PDCD1”, “Ligante de morte programada 1”, “Homólogo B7 1”, “B7-H1” e “CD274” são usados indistintamente e incluem variantes, isoformas, espécies homólogas de PD-L1 humano e análogos com pelo menos um epítipo comum com PD-L1. A sequência de PD-L1 completa pode ser encontrada sob o Nº de Acesso ao GenBank NP_001254635, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 176.

[0170] O ligante 1 de morte programada (PD-L1) é uma proteína transmembrana do tipo 1 de 40 kDa que especulou-se desempenhar um papel importante na supressão do sistema imunológico durante eventos específicos, tais como gravidez, aloenxertos de tecido, doença autoimune e outros estados de doença, tal como hepatite. Normalmente, o sistema imunológico reage a antígenos estranhos que estão associados a sinais de perigo exógenos ou endógenos, o que desencadeia uma proliferação de células CD8+ específicas para antígeno e/ou células auxiliares CD4+. A ligação de PD-L1 a PD-1 transmite um sinal inibitório que reduz a proliferação dessas células T e também pode induzir apoptose, que é ainda mediada por uma regulação inferior do gene Bcl-2. Conforme usado no presente documento, os termos “Morte Programada 1”, “Morte Celular Programada 1”, “Proteína PD-1”, “PD-1”, “PD1”, “PDCD1”, “hPD-1” e “hPD-I” são usados de forma intercambiável e incluem variantes, isoformas, espécies homólogas de PD-1 humano e análogos com pelo menos um epítipo comum com PD-1. A sequência de PD-1 completa pode ser encontrada sob o Nº de Acesso ao GenBank NP_005009, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 175.

[0171] PD-L1 é abundante em uma variedade de cânceres humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat. Med.* 8:787 a 789). A interação entre PD-1 e PD-L1 resulta em uma diminuição nos linfócitos infiltrantes de tumor, uma diminuição na proliferação mediada por receptor de células T e evasão imune pelas células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J. Mol. Med.* 81:281 a 287; Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307 a 314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5.094 a 5.100). A supressão imunológica pode ser revertida inibindo-se a interação local de PD-1 com PD-L1, e o efeito é aditivo quando a interação de PD-1 com PD-L2 também é bloqueada (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12.293 a 12.297; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1.257 a 1.266).

[0172] Um exemplo de anticorpo anti-PD-L1 é o anticorpo 7H7, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 7H7. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 7H7 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 77, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 7H7 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 78. Em outra modalidade, o anticorpo ou o domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 77. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 77. Em outra

modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 77 e SEQ ID NO: 78, respectivamente.

[0173] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 1B3, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 1B3. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 1B3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 79, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 1B3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 80. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou o domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que possui as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 79. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve com as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 80. Em outra modalidade, o anticorpo ou o domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 79 e SEQ ID NO: 80, respectivamente.

[0174] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 3B6, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 3B6. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os

domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 3B6 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 81, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 3B6 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 82. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 81. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 82. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 81 e SEQ ID NO: 82, respectivamente.

[0175] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 8B1, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 8B1. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 8B1 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 83, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 8B1 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 84. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve

que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 83. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 84. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 83 e SEQ ID NO: 84, respectivamente.

[0176] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 4A3, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs de cadeias pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 4A3. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 4A3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 85, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 4A3 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 86. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 85. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 86. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões

variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 85 e SEQ ID NO: 86, respectivamente.

[0177] Outro anticorpo anti-PD-L1 exemplificativo é o anticorpo 9H9, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compreende as CDRs da cadeia pesada e leve ou regiões variáveis de anticorpo 9H9. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia pesada de anticorpo 9H9 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 87, e os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável de cadeia leve de anticorpo 9H9 que tem a sequência apresentada na SEQ ID NO: 88. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 87. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 88. Em outra modalidade, o anticorpo ou domínio de ligação do mesmo compreende regiões variáveis de cadeias pesada e leve que têm as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 87 e SEQ ID NO: 88, respectivamente.

[0178] As sequências de anticorpos também podem ser sequências consenso de vários anticorpos. Por exemplo, em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada CDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da sequência consenso: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO: 167). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma

CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 168. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada CDR3 que compreende a SEQ ID NO: 169. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 170. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia leve CDR2 que compreende a SEQ ID NO: 171. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia leve CDR3 que compreende a SEQ ID NO: 172.

[0179] Sequências substancialmente idênticas aos anticorpos anti-PD-L1 e domínios de ligação dos mesmos descritas no presente documento (por exemplo, pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas), também estão abrangidas pela invenção. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica à mesma (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88 ou uma sequência pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende

a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0180] Anticorpos anti-PD-L1 e domínios de ligação dos mesmos que competem pela ligação com qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 ou domínios de ligação dos mesmos, conforme descrito no presente documento, ou que se ligam ao mesmo epítopo que qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 ou domínios de ligação, conforme descrito no presente documento, também são adequados para uso e fornecidos aqui. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compete

pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 7H7 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 7H7). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 7H7 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 7H7).

[0181] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 1B3 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 1B3). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 1B3 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 1B3).

[0182] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 3B6 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 3B6). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 3B6 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 3B6).

[0183] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 8B1 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 8B1). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 8B1 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 8B1).

[0184] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 4A3 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 4A3). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 4A3 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 4A3).

[0185] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo compete pela ligação a PD-L1 com o anticorpo 9H9 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 9H9). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 ou domínio de ligação do mesmo se liga ao mesmo epítipo em PD-L1 como o anticorpo 9H9 (ou um anticorpo que tem as CDRs de cadeias pesada e leve e/ou sequências de região variável de cadeias pesada e leve correspondentes ao anticorpo 9H9).

[0186] Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é um anticorpo anti-PD-L1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID

NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID

NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0187] Em outra modalidade, o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tem uma ou mais das seguintes características funcionais: (a) bloqueia a ligação de PD1 a PD-L1 (por exemplo, parcialmente ou completamente), (b) induz a ativação da via de NFAT e/ou (c) induz uma reação mista de linfócitos.

D. CONSTRUTOS BIESPECÍFICOS

[0188] São fornecidos no presente documento construtos biespecíficos que compreendem um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1. Tais construtos biespecíficos ligados a um ou mais agentes de ligação adicionais para formar construtos multiespecíficos também são fornecidos.

[0189] Um construto “biespecífico” ou “bifuncional” é um híbrido artificial que tem dois pares de domínios de ligação diferentes (por exemplo, cadeias pesada/leve) e dois sítios de ligação diferentes. Os construtos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos, incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Consultar, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315 a 321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1.547 a 1.553 (1992).

[0190] Conforme usado no presente documento, o termo “ligado” se refere à associação de duas ou mais moléculas. A ligação pode ser covalente ou não covalente. A ligação também pode ser genética (isto é, fundida de forma recombinante). Tais ligações podem ser alcançadas com o uso de uma ampla variedade de procedimentos reconhecidos na técnica, tais como conjugação química e produção de proteína recombinante.

[0191] Para a conjugação química, reagentes e métodos adequados são conhecidos na técnica para acoplar duas ou mais porções químicas, em particular, dois ou mais anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, juntos. Uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação estão comercialmente disponíveis e podem ser usados para conjugar o domínio de ligação anti-CD27 e o domínio de ligação anti-PD-L1. Exemplos não limitantes incluem Sulfo-SMCC, proteína A, carboi-imida, dimaleimida, ácido ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB) e N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Sulfo-SMCC, SPDP e DTNB são agentes preferenciais, com Sulfo-SMCC sendo particularmente preferencial. Outros procedimentos adequados para a reticulação de componentes (por exemplo, domínios de ligação) com agentes de reticulação são conhecidos na técnica. Consultar, por exemplo, Karpovsky, B. *et al.*, (1984) *J. Exp. Med.* 160:1.686; Liu, M. A. *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82:8.648; Segal, D. M. and Perez, P., Pat. nº. U.S. 4.676.980; e Brennan, M. (1986) *Biotechniques* 4:424.

[0192] Para modificação genética, as moléculas de ácido nucleico que codificam o domínio de ligação anti-CD27 podem ser inseridas em um vetor de expressão apropriado com o uso de técnicas de DNA

recombinante padrão. Uma molécula (ou moléculas) de ácido nucleico que codifica o domínio de ligação anti-PD-L1 também pode ser inserida no mesmo vetor de expressão, de modo que esteja operativamente ligada (por exemplo, clonagem em quadro) ao domínio de ligação a CD27, resultando assim em um vetor de expressão que codifica uma proteína de fusão que é o construto biespecífico. De preferência, o domínio de ligação anti-PD-L1 está operacionalmente ligado à região de C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-CD27. Outros vetores de expressão adequados e estratégias de clonagem para a preparação dos construtos biespecíficos descritos no presente documento são conhecidos na técnica.

[0193] Para a expressão dos construtos biespecíficos em células hospedeiras, as regiões de codificação dos domínios de ligação são combinadas com o promotor clonado, sequência-líder, iniciação de tradução, sequência-líder, região constante, 3' não traduzido, poliadenilação e terminação de transcrição, sequências para formar construtos de vetor de expressão. Esses construtos podem ser usados para expressar, por exemplo, anticorpos IgG₁ κ ou IgG₄κ humanos de comprimento total. Os anticorpos totalmente humanos, humanizados e quiméricos usados nos construtos biespecíficos descritos no presente documento também incluem anticorpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM e IgD. Plasmídeos similares podem ser construídos para a expressão de outros isotipos de cadeia pesada, ou para a expressão de anticorpos que compreendem cadeias leves lambda.

[0194] Após a preparação de um vetor de expressão que codifica o construto biespecífico, o construto biespecífico pode ser expresso de forma recombinante em uma célula hospedeira com o uso de métodos de transfecção padrão. Por exemplo, em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o construto biespecífico pode ser ligado a um vetor de expressão, tal como um plasmídeo de expressão eucariótica, tal como usado pelo sistema de expressão do gene GS divulgado nos documentos WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338 841 ou outros sistemas de expressão bem-conhecidos na técnica. O plasmídeo purificado com o gene de construto biespecífico clonado pode ser

introduzido em células hospedeiras eucarióticas, tais como células CHO ou células NSO ou, alternativamente, outras células eucarióticas como células derivadas de plantas, fungos ou células de levedura. O método usado para introduzir esses genes pode ser métodos descritos na técnica, tais como eletroporação, lipofectina, lipofectamina ou outros. Após a introdução do vetor de expressão nas células hospedeiras, as células que expressam o construto biespecífico podem ser identificadas e selecionadas. Essas células representam os transfectomas que podem ser, então, amplificados quanto ao seu nível de expressão e aumentados para produzir construtos biespecíficos. Alternativamente, esses construtos biespecíficos clonados podem ser expressos em outros sistemas de expressão, tais como *E. coli* ou em organismos completos, ou podem ser expressos sinteticamente. Os construtos biespecíficos recombinantes podem ser isolados e purificados a partir desses sobrenadantes de cultura e/ou células.

[0195] Um construto biespecífico da invenção, seja preparado por conjugação química ou por modificação genética, pode ser isolado e purificado com o uso de uma ou mais metodologias para purificação de proteínas bem-estabelecidas na técnica. Os métodos preferenciais para isolamento e purificação incluem, mas sem limitação, cromatografia de filtração em gel, cromatografia de afinidade, cromatografia de troca aniônica e similares. Um método particularmente preferencial é a cromatografia de filtração em gel, por exemplo, com o uso de uma coluna Superdex 200. Construtos biespecíficos isolados e purificados podem ser avaliados com o uso de métodos padrão, tal como análise SDS-PAGE.

[0196] Consequentemente, em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 e o domínio de ligação anti-CD27 são geneticamente fundidos. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 e o domínio de ligação anti-CD27 são quimicamente conjugados. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 está ligado ao C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-

PD-L1. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 é um scFv. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 está ligado ao C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-CD27. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é um scFv.

[0197] Construtos biespecíficos exemplificativos são apresentados abaixo nas Tabelas 1 e 2, em que os domínios de ligação são definidos por sequências de CDR (Tabela 1) ou sequências de região variável (Tabela 2).

TABELA 1: CONSTRUTOS BIESPECÍFICOS EXEMPLIFICATIVOS (CDRS)

Construto Biespecífico	CDRs Variáveis de Cadeia Pesada de CD27	CDRs Variáveis de Cadeia Leve de CD27	CDRs Variáveis de Cadeia Pesada de PD-L1	CDRs Variáveis de Cadeia Leve de PD-L1
2B3x7H7	CDR1: SEQ ID NO: 7 CDR2: SEQ ID NO: 8 CDR3: SEQ ID NO: 9	CDR1: SEQ ID NO: 10 CDR2: SEQ ID NO: 11 CDR3: SEQ ID NO: 12	CDR1: SEQ ID NO: 29 CDR2: SEQ ID NO: 30 CDR3: SEQ ID NO: 31	CDR1: SEQ ID NO: 32 CDR2: SEQ ID NO: 33 CDR3: SEQ ID NO: 34
2B3x1B3	CDR1: SEQ ID NO: 7 CDR2: SEQ ID NO: 8 CDR3: SEQ ID NO: 9	CDR1: SEQ ID NO: 10 CDR2: SEQ ID NO: 11 CDR3: SEQ ID NO: 12	CDR1: SEQ ID NO: 35 CDR2: SEQ ID NO: 36 CDR3: SEQ ID NO: 37	CDR1: SEQ ID NO: 38 CDR2: SEQ ID NO: 39 CDR3: SEQ ID NO: 40
2B3x3B6	CDR1: SEQ ID NO: 7 CDR2: SEQ ID NO: 8 CDR3: SEQ ID NO: 9	CDR1: SEQ ID NO: 10 CDR2: SEQ ID NO: 11 CDR3: SEQ ID NO: 12	CDR1: SEQ ID NO: 41 CDR2: SEQ ID NO: 42 CDR3: SEQ ID NO: 43	CDR1: SEQ ID NO: 44 CDR2: SEQ ID NO: 45 CDR3: SEQ ID NO: 46
2B3x8B1	CDR1: SEQ ID NO: 7 CDR2: SEQ ID NO: 8 CDR3: SEQ ID NO: 9	CDR1: SEQ ID NO: 10 CDR2: SEQ ID NO: 11 CDR3: SEQ ID NO: 12	CDR1: SEQ ID NO: 47 CDR2: SEQ ID NO: 48 CDR3: SEQ ID NO: 49	CDR1: SEQ ID NO: 50 CDR2: SEQ ID NO: 51 CDR3: SEQ ID NO: 52
2B3x4A3	CDR1: SEQ ID NO: 7 CDR2: SEQ ID NO: 8 CDR3: SEQ ID NO: 9	CDR1: SEQ ID NO: 10 CDR2: SEQ ID NO: 11 CDR3: SEQ ID NO: 12	CDR1: SEQ ID NO: 53 CDR2: SEQ ID NO: 54 CDR3: SEQ ID NO: 55	CDR1: SEQ ID NO: 56 CDR2: SEQ ID NO: 57 CDR3: SEQ ID NO: 58
2B3x9H9	CDR1: SEQ ID NO: 7 CDR2: SEQ ID NO: 8 CDR3: SEQ ID NO: 9	CDR1: SEQ ID NO: 10 CDR2: SEQ ID NO: 11 CDR3: SEQ ID NO: 12	CDR1: SEQ ID NO: 59 CDR2: SEQ ID NO: 60 CDR3: SEQ ID NO: 61	CDR1: SEQ ID NO: 62 CDR2: SEQ ID NO: 63 CDR3: SEQ ID NO: 64
3C2x7H7	CDR1: SEQ ID NO: 1 CDR2: SEQ ID NO: 2 CDR3: SEQ ID NO: 3	CDR1: SEQ ID NO: 4 CDR2: SEQ ID NO: 5 CDR3: SEQ ID NO: 6	CDR1: SEQ ID NO: 29 CDR2: SEQ ID NO: 30 CDR3: SEQ ID NO: 31	CDR1: SEQ ID NO: 32 CDR2: SEQ ID NO: 33 CDR3: SEQ ID NO: 34
3C2x1B3	CDR1: SEQ ID NO: 1 CDR2: SEQ ID NO: 2 CDR3: SEQ ID NO: 3	CDR1: SEQ ID NO: 4 CDR2: SEQ ID NO: 5 CDR3: SEQ ID NO: 6	CDR1: SEQ ID NO: 35 CDR2: SEQ ID NO: 36 CDR3: SEQ ID NO: 37	CDR1: SEQ ID NO: 38 CDR2: SEQ ID NO: 39 CDR3: SEQ ID NO: 40
3C2x3B6	CDR1: SEQ ID NO: 1 CDR2: SEQ ID NO: 2 CDR3: SEQ ID NO: 3	CDR1: SEQ ID NO: 4 CDR2: SEQ ID NO: 5 CDR3: SEQ ID NO: 6	CDR1: SEQ ID NO: 41 CDR2: SEQ ID NO: 42 CDR3: SEQ ID NO: 43	CDR1: SEQ ID NO: 44 CDR2: SEQ ID NO: 45 CDR3: SEQ ID NO: 46
3C2x8B1	CDR1: SEQ ID NO: 1 CDR2: SEQ ID NO: 2 CDR3: SEQ ID NO: 3	CDR1: SEQ ID NO: 4 CDR2: SEQ ID NO: 5 CDR3: SEQ ID NO: 6	CDR1: SEQ ID NO: 47 CDR2: SEQ ID NO: 48 CDR3: SEQ ID NO: 49	CDR1: SEQ ID NO: 50 CDR2: SEQ ID NO: 51 CDR3: SEQ ID NO: 52
3C2x4A3	CDR1: SEQ ID NO: 1 CDR2: SEQ ID NO: 2 CDR3: SEQ ID NO: 3	CDR1: SEQ ID NO: 4 CDR2: SEQ ID NO: 5 CDR3: SEQ ID NO: 6	CDR1: SEQ ID NO: 53 CDR2: SEQ ID NO: 54 CDR3: SEQ ID NO: 55	CDR1: SEQ ID NO: 56 CDR2: SEQ ID NO: 57 CDR3: SEQ ID NO: 58
3C2x9H9	CDR1: SEQ ID NO: 1 CDR2: SEQ ID NO: 2 CDR3: SEQ ID NO: 3	CDR1: SEQ ID NO: 4 CDR2: SEQ ID NO: 5 CDR3: SEQ ID NO: 6	CDR1: SEQ ID NO: 59 CDR2: SEQ ID NO: 60 CDR3: SEQ ID NO: 61	CDR1: SEQ ID NO: 62 CDR2: SEQ ID NO: 63 CDR3: SEQ ID NO: 64

TABELA 2: CONSTRUTOS BIESPECÍFICOS EXEMPLIFICATIVOS (VRS)

Construtos Biespecíficos	CD27 Região Variável de Cadeia Pesada	CD27 Região Variável de Cadeia Leve	PD-L1 Região Variável de Cadeia Pesada	PD-L1 Região Variável de Cadeia Leve
2B3x7H7	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78
2B3x1B3	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
2B3x3B6	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
2B3x8B1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
2B3x4A3	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86
2B3x9H9	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88
3C2x7H7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78
3C2x1B3	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80
3C2x3B6	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
3C2x8B1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
3C2x4A3	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86
3C2x9H9	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88

[0198] Em uma modalidade, é fornecido um construto biespecífico que compreende um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1, em que:

- (i) o domínio de ligação anti-CD27 compreende:
 - a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente, ou
 - b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente; e
- (ii) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende:
 - a. uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da sequência consenso: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO: 167);
 - b. uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 168;
 - c. uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 169;
 - d. uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 170;

e. uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 171; e

f. uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 172.

Em outra modalidade, é fornecido um construto biespecífico que compreende um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1, em que:

(i) o domínio de ligação anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas);

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas);

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 95% idênticas às

mesmas (por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas);

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas);

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas); ou

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0199] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente.

[0200] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de

ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

[0201] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente.

[0202] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

[0203] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e a CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente.

[0204] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

[0205] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 50, 51 e 52, respectivamente.

[0206] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

[0207] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente; e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme

estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente.

[0208] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

[0209] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente e um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0210] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0211] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região

variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente.

[0212] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

[0213] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente e um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36, e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente.

[0214] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) e domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

[0215] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente e um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente.

[0216] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

[0217] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente.

[0218] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de

ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

[0219] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente.

[0220] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

[0221] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11, e 12, respectivamente e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0222] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende (a) um domínio de ligação anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e (b) um domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0223] Em uma modalidade particular, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende:

CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente;

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente;

c. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente,

e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 44, 45 e 46, respectivamente;

d. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 50, 51 e 52, respectivamente;

e. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 56, 57 e 58, respectivamente; ou

f. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 62, 63 e 64, respectivamente; e

g. um domínio constante de IgG1 humano.

Em outra modalidade específica, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente; e

c. um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 29, 30 e 31, respectivamente,

e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente;

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente;

c. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente;

d. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente;

e. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; ou

f. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente; e

[0224] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; ou

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende:

- a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;
- b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;
- c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;
- d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;
- e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; ou
- f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88; e
- g. um domínio constante de IgG1 humano.

Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende:

- a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; ou
- b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e
- c. um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende:

- a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;
- b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;
- c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;
- d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;
- e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; ou
- f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0225] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

- (i) o scFv anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; e
- (ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano.

[0226] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente.

[0227] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ

ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 e um domínio constante de IgG1 humano.

[0228] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

[0229] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e

CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano.

[0230] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0231] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região

variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 e um domínio constante de IgG1 humano.

[0232] Em outra modalidade, o construto biespecífico compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0233] Em outro aspecto, o construto biespecífico é fornecido, em que o construto biespecífico compreende qualquer um dos anticorpos anti-CD27, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento ligados a um domínio de ligação anti-PD-L1. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente;

b. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente;

c. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43,

respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente;

d. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente;

e. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; e

f. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0234] Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78; (b) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80; (c) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82; (d) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84; (e) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; e (f) uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88. Em uma modalidade

específica, o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-PD-L1 é um scFv.

[0235] Em outro aspecto, um construto biespecífico é fornecido, em que o construto biespecífico compreende qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento, ligados a um domínio de ligação anti-CD27. Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18, ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende um anticorpo anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20, ou sequências pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas). Em uma modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 é um scFv. Em outra modalidade, o domínio de ligação anti-CD27 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano.

[0236] Em outra modalidade, o construto biespecífico tem uma ou mais das seguintes características funcionais: induz a ativação de NFκB, aumenta a proliferação de células T, induz uma resposta de células T CD8 e/ou aumenta a produção de IL-2. Em outra modalidade, o construto biespecífico aumenta a produção de IL-2 em pelo menos cerca de 1,5 vez (por exemplo, pelo menos 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes ou 4 vezes) em comparação com um anticorpo monoclonal anti-CD27 ou anticorpo monoclonal anti-PD-L1 isoladamente. Em outra modalidade, o construto biespecífico induz uma resposta de células T CD8 pelo menos cerca de 2 vezes maior (por exemplo, pelo menos 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 5,5 vezes, 6 vezes, 6,5 vezes, 7 vezes, 7,5 vezes, 8,0 vezes, 8,5 vezes ou 9 vezes) do que um anticorpo monoclonal anti-CD27 isoladamente. Em outra modalidade, o construto biespecífico aumenta a sobrevivência em pelo menos cerca de 1,5 vez mais (por exemplo, pelo menos 1,5 vez, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes) em comparação com um anticorpo monoclonal anti-CD27 ou anticorpo monoclonal anti-PD-L1 isoladamente. Em outra modalidade, o construto biespecífico diminui o peso do tumor em pelo menos cerca de 1,5 vez (por exemplo, pelo menos 1,5 vez, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes ou 5 vezes) em comparação com anticorpos monoclonais anti-CD27 ou anticorpos monoclonais anti-PD-L1 isoladamente ou em combinação. Em outra modalidade, o construto biespecífico aumenta a produção de células T em pelo menos cerca de 1,5 vez (por exemplo, pelo menos 1,5 vez, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 5,5 vezes, 6 vezes, 6,5 vezes, 7 vezes, 7,5 vezes, 8,0 vezes, 8,5 vezes ou 9 vezes) em comparação com anticorpos monoclonais anti-CD27 ou anticorpos monoclonais anti-PD-L1 isoladamente ou em combinação.

[0237] Em determinadas modalidades, os construtos biespecíficos descritos no presente documento exibem efeitos sinérgicos (por exemplo, no aumento de respostas imunes *in vivo*) em comparação com o uso de domínios de ligação anti-CD27 e domínios de ligação anti-PD-L1 em combinação (isto é, coadministração de anticorpos não ligados).

E. COMPOSIÇÕES

[0238] Também são fornecidas no presente documento composições, por exemplo, uma composição que compreende um ou uma combinação de qualquer um dos domínios de ligação, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, os construtos biespecíficos ou os construtos multiespecíficos descritos no presente documento, formulados juntamente com um carreador (por exemplo, um carreador farmacologicamente aceitável).

[0239] Conforme usado no presente documento, os termos “carreador” e “carreador farmacologicamente aceitável” incluem todos e quaisquer solventes, sais, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção e similares que são fisiologicamente compatíveis. De preferência, o carreador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo (isto é, qualquer um dos domínios de ligação, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, os construtos biespecíficos ou os construtos multiespecíficos descritos no presente documento), pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[0240] Exemplos de adjuvantes que podem ser usados com os domínios de ligação, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, os construtos biespecíficos ou os construtos multiespecíficos descritos no presente documento incluem, mas sem limitação: Adjuvante Incompleto e Adjuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Adjuvante 65 da Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); sais de alumínio, tais como gel de hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio; sais de cálcio, ferro ou zinco; uma suspensão insolúvel de tirosina acilada; açúcares acilados; polissacarídeos cationicamente ou anionicamente derivatizados; polifosfazenos;

microesferas biodegradáveis; citocinas, tais como GM-CSF, interleucina-2, -7, -12 e outros fatores semelhantes; 3D-MPL; oligonucleotídeo de CpG; e monofosforil lipídeo A, por exemplo, monofosforil lipídeo A 3-des-O-acilado.

[0241] Os adjuvantes de MPL estão disponíveis junto à Corixa Corporation (Seattle, Wash; consultar, por exemplo, as Patentes nºs. US 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 e 4.912.094). Os oligonucleotídeos que contêm CpG (em que o dinucleotídeo CpG não está metilado) são bem conhecidos e são descritos, por exemplo, nos documentos WO 96/02555, WO 99/33488 e Pat. nºs. US 6.008.200 e 5.856.462. As sequências de DNA imunoestimulantes também são descritas, por exemplo, por Sato et al., Science 273: 352, 1996.

[0242] Outros adjuvantes alternativos incluem, por exemplo, saponinas, tais como Quil A, ou seus derivados, incluindo QS21 e QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); Escin; Digitonina; ou saponinas Gypsophila ou Chenopodium quinoa; Montanide ISA 720 (Seppic, França); SAF (Chiron, Califórnia, Estados Unidos); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron); a série de adjuvantes SBAS (por exemplo, SBAS-2 ou SBAS-4, disponíveis junto à SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica); Detox (Enhanzyn™) (Corixa, Hamilton, Mont.); RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) e outros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGPs); adjuvantes de éter de polioxietileno, tais como os descritos no documento WO 99/52549A1; imidazoquinolinas sintéticas, tais como imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison, et al., Vaccine 19: 1.820 a 1.826, 2001; e resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., Cellular immunology 204: 64 a 74, 2000; Bases de Schiff de carbonilas e aminas que são constitutivamente expressas em células de apresentação de antígeno e superfícies de células T, tal como tucaresol (Rhodes, J. et al., Nature 377:71 a 75, 1995); citocina, quimiocina e moléculas coestimulatórias como proteína ou peptídeo, incluindo, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, tais como Interferon, GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa e TGF-beta, indutores de Th1, tais como interferon gama, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, indutores de Th2, tais como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e outros genes coestimuladores e

quimiocina, tais como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 e CD40L; agentes imunoestimuladores direcionados a ligantes, tais como CTLA-4 e L-selectina, proteínas e peptídeos estimuladores de apoptose, tais como Fas; adjuvante à base de lipídio sintético, tais como vaxfectina, (Reyes et al., Vaccine 19: 3.778 a 3.786, 2001) esqualeno, alfa-tocoferol, polissorbato 80, DOPC e colesterol; endotoxina, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23 a 30, 2000); ligantes que ativam os receptores Toll para produzir citocinas indutoras de Th1, tais como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, proteína micobacteriana p19, peptidoglicano, ácido teicoico e lipídio A; e CT (toxina de cólera, subunidades A e B) e LT (enterotoxina lábil ao calor de E. coli, subunidades A e B), família de proteínas de choque térmico (HSPs) e LLO (listeriolisina O; documento WO 01/72329). Esses e vários outros agonistas do Receptor do tipo Toll (TLR) são descritos, por exemplo, em Kanzler et al, *Nature Medicine*, maio de 2007, Vol 13, nº. 5.

[0243] Um “sal farmaceuticamente aceitável” se refere a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto original e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (consultar, por exemplo, Berge, SM, *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66:1 a 19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como ácido clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos, tais como ácidos alifáticos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanoicos substituídos por fenila, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalinoterrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletlenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

[0244] Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Conforme será observado pelo especialista na técnica, a via e/ou o modo de

administração variará dependendo dos resultados desejados. Os compostos ativos podem ser preparados com carreadores que protegerão o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos e sistemas de entrega microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos pelos versados na técnica. Consultar, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0245] Para administrar um composto da invenção por determinadas vias de administração, pode ser necessário revestir o composto com, ou coadministrar o composto com, um material para prevenir sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um sujeito em um carreador apropriado, por exemplo, lipossomas ou um diluente. Os diluentes aceitáveis incluem solução salina e soluções tampão aquosas. Os lipossomas incluem emulsões de CGF de água-em-óleo-em-água, bem como lipossomas convencionais (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

[0246] Os carreadores 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 farmacologicamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, o uso deste nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados às composições.

[0247] As composições terapêuticas normalmente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para alta concentração de fármaco. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão que contém, por exemplo,

água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e similares) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[0248] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização por microfiltração. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando-se o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferenciais são secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[0249] Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta ideal desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bólus pode ser administrado, várias 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. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser administrados uma ou duas vezes por semana por injeção subcutânea ou intramuscular ou uma ou duas vezes por mês por injeção subcutânea ou intramuscular.

[0250] É especialmente vantajoso formular composições parenterais sob a forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de dosagem unitária,

conforme utilizado no presente documento, se refere a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção são ditadas por e diretamente dependentes de (a) características únicas do composto ativo e efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) limitações inerentes à técnica de composição de tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

[0251] Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato 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, galato de propila, alfa-tocoferol e similares; e (3) agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similares.

[0252] Para as composições terapêuticas, as formulações da presente invenção incluem aquelas adequadas para administração oral, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas sob a forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na técnica de farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do sujeito a ser tratado e do modo de administração específico. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única será geralmente a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, essa quantidade variará de cerca de 0,001 por cento a cerca de noventa por cento do ingrediente ativo, de preferência, de cerca de 0,005 por

cento a cerca de 70 por cento, com mais preferência, de cerca de 0,01 por cento a cerca de 30 por cento.

[0253] As formulações da presente invenção que são adequadas para administração vaginal também incluem pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações em spray que contêm tais carreadores que são conhecidos na técnica como apropriados. As formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica de composições desta invenção incluem pós, sprays, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um carreador farmacologicamente aceitável e com quaisquer conservantes, tampões ou propulsores que possam ser necessários.

[0254] As frases “administração parenteral” e “administrado parenteralmente”, conforme usado no presente documento, significam modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e incluem, sem limitação, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, injeção intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intraesternal e infusão.

[0255] Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e similares) e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como azeite e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pelo uso de tensoativos.

[0256] Essas composições também podem conter adjuvantes, tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de micro-organismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra, quanto pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por

exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

[0257] Quando os compostos da presente invenção são administrados como produtos farmacêuticos, a seres humanos e animais, os mesmos podem ser dados isoladamente ou como uma composição farmacêutica que contém, por exemplo, de 0,001 a 90% (com mais preferência, de 0,005 a 70%, tal como 0,01 a 30%) de ingrediente ativo em combinação com um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0258] Independentemente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção, que podem ser usados em uma forma hidratada adequada e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção, são formuladas sob formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis por métodos convencionais conhecidos por aqueles de habilidade na técnica.

[0259] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem ser tóxico 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 o éster, sal ou amida do mesmo, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto específico que é empregado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições específicas empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente a ser tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas. Um médico ou veterinário com habilidade comum na técnica pode facilmente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica necessária. Por

exemplo, o médico ou veterinário pode iniciar doses dos compostos da invenção empregados na composição farmacêutica em níveis inferiores aos necessários para atingir o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado. Em geral, uma dose diária adequada de uma composição da invenção será aquela quantidade do composto que é a menor dose eficaz para produzir um efeito terapêutico. Tal dose eficaz geralmente dependerá dos fatores descritos acima. É preferível que a administração seja intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea, de preferência, administrada proximal ao local do alvo. Se desejado, a dose diária eficaz de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas, três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriados ao longo do dia, opcionalmente, em formas de dosagem unitária. Embora seja possível que um composto da presente invenção seja administrado sozinho, é preferível administrar o composto como uma formulação (composição) farmacêutica.

[0260] As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade preferencial, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos divulgados nas Patentes nºs. US 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 bem-conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente nº. US 4.487.603, que divulga uma bomba de microinfusão implantável para dispensar medicação a uma taxa controlada; Patente nº. US 4.486.194, que divulga um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente nº. US 4.447.233, que divulga uma bomba de infusão de medicamento para entregar medicamento a uma taxa de infusão precisa; Patente US nº. 4.447.224, que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para administração contínua de fármacos; Patente nº. US 4.439.196, que divulga um sistema de entrega osmótica de fármaco que tem compartimentos de múltiplas câmaras; e Patente nº. US 4.475.196, que divulga

um sistema de entrega osmótica de fármacos. Muitos outros implantes, sistemas de entrega e módulos são conhecidos pelos versados na técnica.

[0261] Em determinadas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser formulados para garantir uma distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção cruzem a BBB (se desejado), os mesmos podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação de lipossomas, consultar, por exemplo, as Patentes US 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais porções que são transportadas seletivamente para células ou órgãos específicos, aumentando assim a distribuição direcionada do fármaco (consultar, por exemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Porções químicas de alvejamento exemplificativas incluem folato ou biotina (consultar, por exemplo, Patente US 5.416.016 de Low *et al.*); manósídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1.038); anticorpos (PG Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A de tensoativo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1.233:134), diferentes espécies das quais podem compreender as formulações das invenções, bem como componentes das moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9.090); consultar também K. Keinänen; ML Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. Em uma modalidade da invenção, os compostos terapêuticos da invenção são formulados em lipossomas; em uma modalidade mais preferencial, os lipossomas incluem uma porção química de alvejamento. Em uma modalidade mais preferencial, os compostos terapêuticos nos lipossomas são administrados por injeção em bólus em um sítio próximo ao tumor ou infecção. A composição deve ser fluida na medida em que exista fácil seringabilidade. A mesma deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos.

[0262] A capacidade de um composto de inibir o câncer pode ser avaliada em um sistema de modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, essa propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando-se a capacidade do composto para inibir, tal inibição *in vitro* por ensaios conhecidos do praticante versado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor ou, de outra forma, melhorar os sintomas em um sujeito. Um versado na técnica será capaz de determinar tais quantidades com base em fatores como o tamanho do sujeito, a gravidade dos sintomas do sujeito e a composição específica ou via de administração selecionada.

[0263] A composição deve ser estéril e fluida na medida em que a composição pode ser administrada por seringa. Além da água, o carreador pode ser uma solução salina tamponada isotônica, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e similares) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, é preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tal como manitol ou sorbitol, e cloreto de sódio na composição. A absorção a longo prazo das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

[0264] Quando o composto ativo é adequadamente protegido, conforme descrito acima, o composto pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um carreador comestível assimilável.

F. ÁCIDOS NUCLEICOS

[0265] O termo “molécula de ácido nucleico”, conforme usado no presente documento, se destina a incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de fita única ou dupla, mas, de preferência é DNA de fita dupla.

[0266] O termo “molécula de ácido nucleico isolada”, conforme usado no presente documento em referência a ácidos nucleicos que codificam domínios de ligação, anticorpos ou porções de anticorpos (por exemplo, V_H, V_L, CDR3) que se ligam a CD27 e/ou PD-L1, se destina a se referir a uma molécula de ácido nucleico na qual as sequências de nucleotídeos que codificam o domínio de ligação, anticorpos ou porções de anticorpos estão livres de outras sequências de nucleotídeos que codificam o domínio de ligação, anticorpos ou porções de anticorpos que se ligam a antígenos diferentes de CD27 e/ou PD-L1, cujas outras sequências podem flanquear naturalmente o ácido nucleico no DNA genômico humano.

[0267] Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado celular ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é “isolado” ou “tornado substancialmente puro” quando purificado a partir de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, por técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografia em coluna, agarose eletroforese em gel e outras bem-conhecidas na técnica. Consultar, F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[0268] As moléculas de ácido nucleico da presente invenção, embora frequentemente em uma sequência nativa (exceto para sítios de restrição modificados e similares), de cDNA, genômico ou misturas dos mesmos, podem ser mutadas, de acordo com técnicas padrão para fornecer sequências de genes. Para sequências de codificação, essas mutações podem afetar a sequência de aminoácidos, conforme desejado. Em particular, sequências de DNA substancialmente idênticas ou derivadas de V, D, J, constantes, comutadores e outras sequências aqui descritas são contempladas (em que “derivado” indica que uma sequência é idêntica ou modificada a partir de outra sequência).

[0269] Um ácido nucleico é “operacionalmente ligado” ou “operativamente ligado” quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou intensificador está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se afetar a transcrição da sequência. No que diz respeito às sequências reguladoras de transcrição, operacionalmente ligadas significa que as sequências de DNA a serem ligadas são contíguas e, quando necessário para juntar duas regiões de codificação da proteína, contíguas e em quadro de leitura. Para sequências de troca, operacionalmente ligado indica que as sequências são capazes de efetuar recombinação de troca.

[0270] Moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam os domínios de ligação, anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e construtos multiespecíficos descritos no presente documento também são fornecidos, bem como vetores de expressão que compreendem tais ácidos nucleicos e células hospedeiras que compreendem tais vetores de expressão. Em outra modalidade, é fornecida uma molécula de ácido nucleico que codifica qualquer um dos domínios de ligação, anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico está sob a forma de um vetor de expressão. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico está sob a forma de um vetor de expressão que expressa o domínio de ligação, anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo, construto biespecífico ou construto multiespecífico quando administrado a um sujeito *in vivo*.

[0271] Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável de anticorpo, em que a região variável de anticorpo compreende a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 ou uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a uma ou mais das sequências

acima mencionadas). Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, ou uma sequência de nucleotídeos pelo menos 90% idêntica à mesma (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a uma ou mais das sequências acima mencionadas).

[0272] Em outra modalidade, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica regiões variáveis de cadeias pesada e leve de um anticorpo, em que as regiões variáveis de cadeias pesada e leve compreendem as sequências de aminoácidos representadas nas SEQ ID NOs: 17 e 18, SEQ ID NOs: 19 e 20, SEQ ID NOs: 77 e 78, SEQ ID NOs: 79 e 80, SEQ ID NOs: 81 e 82, SEQ ID NOs: 83 e 84, SEQ ID NOs: 85 e 86, ou SEQ ID NOs: 87 e 88, respectivamente, ou sequências de aminoácidos pelo menos 90% idênticas às mesmas (por exemplo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências acima mencionadas).

[0273] O termo “vetor”, conforme usado no presente documento, se destina a se referir a uma molécula de ácido nucleico com capacidade para transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que se refere a uma alça de DNA de fita duplo circular na qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados ao genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que têm uma origem de replicação bacteriana e vetores episomais de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não episomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e, portanto, são replicados junto com o genoma de hospedeiro. Além disso, determinados vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Esses vetores são referidos no presente documento como “vetores de expressão recombinantes”

(ou simplesmente, “vetores de expressão”). Em geral, os vetores de expressão úteis em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados de forma intercambiável, pois o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. No entanto, a invenção pretende incluir outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus defeituosos quanto à replicação, adenovírus e vírus adenoassociados), que desempenham funções equivalentes.

[0274] O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente “célula hospedeira”), conforme usado no presente documento, se destina a se referir a uma célula na qual um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos se destinam a se referir não apenas à célula em questão em particular, mas à descendência de tal célula. Como certas modificações podem ocorrer nas gerações seguintes devido a mutações ou influências ambientais, tal progênie pode não ser, de fato, idêntica à célula-mãe, mas ainda está incluída no escopo do termo “célula hospedeira”, conforme usado no presente documento.

G. TERAPIAS DE COMBINAÇÃO

[0275] Qualquer um dos domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento, podem ser administrados em combinação com uma terapia adicional, isto é, combinados com outros agentes. O termo “coadministrado”, conforme usado no presente documento, inclui qualquer uma ou todas as administrações simultâneas, separadas ou sequenciais dos domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos ou construtos multiespecíficos descritos neste documento com adjuvantes e outros agentes, incluindo a administração como parte de um regime de dosagem. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir a administração de qualquer um dos domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no

presente documento com pelo menos um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tais como agentes anti-inflamatórios, DMARDs (fármacos antirreumáticos modificadores de doença), agentes imunossuppressores, quimioterápicos, radioterapia, outros anticorpos, citotoxinas e/ou fármacos, bem como adjuvantes, agentes imunoestimuladores e/ou agentes imunossuppressores.

[0276] Os agentes quimioterápicos adequados para a coadministração com os domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento no tratamento de tumores incluem, por exemplo: taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, di-hidróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Outros agentes incluem, por exemplo, antimetabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucila, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina) e temozolomida.

[0277] Agentes que deletam ou inibem atividades imunossuppressoras, por exemplo, por células imunes (por exemplo, células T reguladoras, células NKT, macrófagos, células supressoras derivadas de mieloides, células dendríticas imaturas ou supressoras) ou fatores supressores produzidos pelo tumor ou células hospedeiras no microambiente local do tumor (por exemplo, TGF β , indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO), também pode ser

administrado com os domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento. Esses agentes incluem anticorpos e fármacos de moléculas pequenas, tais como inibidores de IDO, tais como 1 metil triptofano ou derivados.

[0278] Os agentes adequados para coadministração com os domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento para o tratamento de tais distúrbios imunes incluem, por exemplo, agentes imunossuppressores, tais como rapamicina, ciclosporina e FK506; agentes anti-TNF, tais como etanercept, adalimumabe e infliximabe; e esteroides. Exemplos de esteroides naturais e sintéticos específicos incluem, por exemplo: aldosterona, beclometasona, betametasona, budesonida, cloprednol, cortisona, cortivazol, desoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, difluorocortolona, fluclorolona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, fluocinonida, fluocortina butila, fluorocortisona, fluorocortolona, fluorometolona, flurandrenolona, fluticasona, halcinonida, hidrocortisona, icometasona, meprednisona, metilprednisolona, parametasona, prednisolona, prednisona, tixocortol e triancinolona.

[0279] Os agentes adequados para coadministração com os domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento para indução ou aumento de uma resposta imunológica incluem, por exemplo, adjuvantes e/ou agentes imunoestimuladores, cujos exemplos não limitantes foram divulgados anteriormente. Em uma modalidade, o agente imunoestimulador é um agonista de TLR3, tal como Poly IC.

[0280] Conforme usado no presente documento, o termo “agente imunoestimulador” inclui, mas sem limitação, compostos capazes de estimular células de apresentação de antígenos (APCs), tais como células dendríticas (DCs) e macrófagos. Por exemplo, os agentes imunoestimuladores adequados para uso na presente invenção são capazes de estimular APCs, de

modo que o processo de maturação das APCs seja acelerado, a proliferação de APCs seja aumentada e/ou o recrutamento ou liberação de moléculas coestimuladoras (por exemplo, CD80, CD86, ICAM-1, moléculas de MHC e CCR7) e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15 e IFN- γ) seja regulado positivamente. Os agentes imunoestimuladores adequados também são capazes de aumentar a proliferação de células T. Esses agentes imunoestimuladores incluem, mas sem limitação, ligante de CD40; ligante de FLT 3; citocinas, tais como IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IL-2; fatores estimuladores de colônias, tais como G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos); um anticorpo anti-CTLA-4, anticorpo anti-PD1, anticorpo anti-41BB ou anticorpo anti-OX-40; LPS (endotoxina); ssRNA; dsRNA; Bacille Calmette-Guerin (BCG); Cloridrato de levamisol; e imunoglobulinas intravenosas. Em uma modalidade, um agente imunoestimulador pode ser um agonista de Receptor do tipo Toll (TLR). Por exemplo, o agente imunoestimulador pode ser um agonista de TLR3, tal como polinucleotídeo de inosina:citosina de fita dupla (Poly I:C, por exemplo, disponível como AmpligenTM da Hemispherx Bipharma, PA, EUA ou Poly IC:LC da Oncovir) ou Poly A:U; um agonista de TLR4, tal como monofosforil lipídio A (MPL) ou RC-529 (por exemplo, disponível junto à GSK, UK); um agonista de TLR5, tal como flagelina; um agonista de TLR7 ou TLR8, tal como um agonista de imidazoquinolina TLR7 ou TLR 8, por exemplo, imiquimod (por exemplo, AldaraTM) ou resiquimod e agentes imidazoquinolina relacionados (por exemplo, como disponíveis junto à 3M Corporation); ou um agonista de TLR 9, tal como um desoxinucleotídeo com motivos CpG não metilados (os assim denominados “CpGs”, por exemplo, como disponível junto à Coley Pharmaceutical). Tais agentes imunoestimuladores podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou sequencialmente com os domínios de ligação, anticorpos, fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos e/ou construtos multiespecíficos descritos no presente documento.

H. USOS E MÉTODOS DA INVENÇÃO

[0281] São fornecidos no presente documento métodos de estimulação de atividade de células T, métodos de indução ou aumento de uma resposta imunológica e métodos de tratamento de uma doença ou condição (por exemplo, câncer) pela administração de construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, ou composições descritas no presente documento para um paciente em necessidade dos mesmos.

[0282] Conforme usado no presente documento, o termo “resposta mediada por células T” ou “atividade de células T” se refere a qualquer resposta mediada por células T, incluindo células T efectoras (por exemplo, células CD8⁺) e células T auxiliares (por exemplo, células CD4⁺). As respostas mediadas por células T incluem, por exemplo, citotoxicidade e proliferação de células T. A estimulação da atividade das células T pode ser avaliada com o uso de qualquer um de uma série de indicadores de atividade de células T conhecidos na técnica. Por exemplo, o aumento da produção de interferon-gama por células T estimuladas por OKT3 pode ser usado como uma medida de ativação de células T. A estimulação da atividade de células T também pode ser avaliada com o uso de um sistema de gene-repórter acionado por NFκB em uma célula que expressa CD27. Outros ensaios adequados de ativação de células T estão bem-estabelecidos na técnica.

[0283] Os termos “indução de uma resposta imunológica” e “aumento de uma resposta imunológica” são usados de forma intercambiável e se referem à estimulação de uma resposta imunológica (isto é, passiva ou adaptativa) a um antígeno específico.

[0284] Os termos “tratar”, “tratando” e “tratamento”, conforme usados no presente documento, se referem a medidas terapêuticas ou preventivas descritas no presente documento. Os métodos de “tratamento” empregam a administração a um sujeito, em necessidade de tal tratamento, de um construto biespecífico, construto multiespecífico, anticorpo, fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou composição, conforme descrito no presente

documento, por exemplo, um sujeito em necessidade de uma resposta imunológica aumentada contra um antígeno específico ou um sujeito que, em última análise, pode adquirir tal distúrbio, a fim de prevenir, curar, atrasar, reduzir a gravidade de, ou melhorar um ou mais sintomas do distúrbio ou distúrbio recorrente, ou para prolongar a sobrevivência de um sujeito além do esperado na ausência de tal tratamento.

[0285] O termo “dose eficaz” ou “dosagem eficaz” é definido como uma quantidade suficiente para atingir ou pelo menos atingir parcialmente o efeito desejado. O termo “dose terapeuticamente eficaz” é definido como uma quantidade suficiente para curar ou pelo menos interromper parcialmente a doença e suas complicações em um paciente que já sofre da doença. As quantidades eficazes para esse uso dependerão da gravidade da doença a ser tratada e do estado geral do sistema imunológico do próprio paciente.

[0286] O termo “paciente” inclui seres humanos e outros mamíferos que recebem tratamento profilático ou terapêutico.

[0287] Conforme usado no presente documento, o termo “inibe o crescimento” (por exemplo, referindo-se a células) se destina a incluir qualquer diminuição mensurável no crescimento de uma célula, por exemplo, a inibição do crescimento de uma célula em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 100%.

[0288] Em um aspecto, métodos de estimulação de atividade de células T são fornecidos, os quais compreendem colocar as células T em contato com qualquer um dos anticorpos, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou composições descritas no presente documento. A estimulação da atividade de células T pode compreender, por exemplo, estimular a produção de IFN-gama.

[0289] Em outro aspecto, métodos para induzir ou aumentar uma resposta imunológica (por exemplo, contra um antígeno) em um sujeito, que compreendem a administração ao sujeito de qualquer um dos anticorpos, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos

biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritos no presente documento, em uma quantidade eficaz para induzir ou aumentar uma resposta imunológica no sujeito (por exemplo, contra um antígeno).

[0290] Em outro aspecto, são fornecidos métodos para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método compreende administrar ao sujeito qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritas no presente documento, em uma quantidade eficaz para tratar a condição ou doença.

[0291] Em outro aspecto, são fornecidos métodos para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método compreende administrar ao sujeito qualquer um dos anticorpos anti-CD27, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento em combinação com qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento. Por exemplo, em uma modalidade:

(i) o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente, e (b) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que

compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente; (b) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente; (c) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente; (d) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente; (e) anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente; e (f) anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente.

[0292] Em outra modalidade,

(i) o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que

compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e um região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e (b) um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em: (a) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78; (b) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80; (c) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82; (d) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84; (e) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; e (f) um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

[0293] Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados separadamente. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do

mesmo, são administrados sequencialmente. Por exemplo, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, pode ser administrado primeiramente seguido por (por exemplo, imediatamente seguido por) administração do anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, ou vice-versa. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados juntos. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados simultaneamente. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados simultaneamente em uma única formulação. Alternativamente, o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são formulados para administração separada e são administrados simultaneamente ou sequencialmente. Tal administração simultânea ou sequencial resulta, de preferência, na presença simultânea de ambos os anticorpos em pacientes tratados.

[0294] Em determinadas modalidades, a administração de qualquer um dos anticorpos anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno dos mesmos, descritos neste documento em combinação com qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, descritos no presente documento, resulta em efeitos sinérgicos (por exemplo, na intensificação das respostas imunológicas *in vivo*) em comparação com o uso de qualquer um dos anticorpos isoladamente.

[0295] O sujeito pode ser, por exemplo, alguém que sofre de uma condição ou doença em que a estimulação de uma resposta imunológica é desejada. Em uma modalidade, a condição ou doença é câncer. Tipos de cânceres incluem, mas sem limitação, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, mieloblastos, promielócitos, eritroleucemia

monocítica mielomonocítica, leucemia crônica, leucemia mielocítica crônica (granulocítica), leucemia mielocítica aguda, linfoma de células do manto, linfoma primário do sistema nervoso central, linfoma de Burkitt e linfoma de células B da zona marginal, Linfoma de policitemia vera, doença de Hodgkin, doença não Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, tumores sólidos, sarcomas e carcinomas, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, osteossarcoma, cordoma, angiossarcoma, endoteliosarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, sarcoma de cólon, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais, adenocarcinoma, carcinoma de glândulas sudoríparas, carcinoma das glândulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma do duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma de pulmão de células pequenas, carcinoma de pulmão de células não pequenas, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma basocelular, câncer do trato biliar, câncer de bexiga, câncer ósseo, câncer do sistema nervoso central (SNC) e cerebral, câncer cervical, coriocarcinoma, cânceres colorretais, câncer de tecido cognitivo, câncer do sistema digestivo, câncer endometrial, câncer esofágico, câncer do olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, neoplasma intraepitelial, câncer de rim, câncer de laringe, câncer de fígado, câncer de pulmão (células pequenas, células grandes), melanoma, neuroblastoma; câncer da cavidade oral (por exemplo, lábio, língua, boca e faringe), câncer de ovário, câncer de pâncreas, retinoblastoma, rabdomiossarcoma, câncer retal; câncer do sistema respiratório,

sarcoma, câncer de pele, câncer de estômago, câncer de testículo, câncer de tireoide, câncer de útero e câncer do sistema urinário. Cânceres particulares incluem tumores que expressam CD27 selecionados a partir do grupo que consiste em leucemia linfocítica crônica, linfoma de células do manto, linfoma do sistema nervoso central primário, linfoma de Burkitt e linfoma de células B da zona marginal.

[0296] Outras indicações de doenças incluem doenças infecciosas bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias.

[0297] Os métodos de indução ou intensificação de uma resposta imunológica (por exemplo, contra um antígeno) em um sujeito descrito no presente documento podem compreender ainda a administração do antígeno ao sujeito. Conforme usado no presente documento, o termo “antígeno” se refere a qualquer substância imunogênica natural ou sintética, tais como uma proteína, peptídeo, hapteno, polissacarídeo e/ou lipídeo. O construto biespecífico, construto multiespecífico, anticorpo, fragmento de ligação a antígeno ou composição descritos no presente documento e o antígeno podem ser administrados ao mesmo tempo ou, alternativamente, o construto biespecífico, construto multiespecífico, anticorpo, fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou composição podem ser administrados antes ou depois de o antígeno ser administrado.

[0298] Em uma modalidade, um construto biespecífico, construto multiespecífico, anticorpo, fragmento de ligação a antígeno do mesmo ou composição descrita no presente documento é administrada em combinação com uma vacina, para aumentar a resposta imunológica contra o antígeno de vacina, por exemplo, um antígeno tumoral (para assim aumentar a resposta imunológica contra o tumor) ou um antígeno de um patógeno de doença infecciosa (para assim aumentar a resposta imunológica contra o patógeno de doença infecciosa). Consequentemente, em uma modalidade, um antígeno de vacina pode compreender, por exemplo, um antígeno ou composição antigênica capaz de desencadear uma resposta imunológica contra um tumor ou contra um patógeno de doença infecciosa, tal

como um vírus, uma bactéria, um parasita ou um fungo. O antígeno ou antígenos são derivados de tumores, tais como os vários antígenos tumorais previamente divulgados no presente documento. Alternativamente, o antígeno ou antígenos podem ser derivados de patógenos, tais como vírus, bactérias, parasitas e/ou fungos.

[0299] Os antígenos preferenciais a serem coadministrados com os anticorpos, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou as composições descritas no presente documento incluem antígenos tumorais e antígenos de vacina (por exemplo, antígenos bacterianos, virais ou outros antígenos patogênicos contra os quais deseja-se que seja criada imunidade protetora em um sujeito para fins de vacinação). Exemplos adicionais de antígenos de patógenos adequados incluem antígenos associados a tumor (TAAs), incluindo, mas sem limitação, sequências que compreendem todas ou parte das sequências de EGFR, EGFRvIII, gp100 ou Pmel17, HER2/neu, mesotelina, CEA, MART1, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MUC-1, GPNMB, HMW-MAA, TIM1, ROR1, CD19 e antígenos tumorais derivados de células germinativas.

[0300] Outros antígenos adequados incluem antígenos virais para a prevenção ou o tratamento de doenças virais. Exemplos de antígenos virais incluem, mas sem limitação, antígenos de env do HIV-1, HBsAg, HPV, FAS, HSV-1, HSV-2, p17, ORF2 e ORF3. Além disso, os antígenos virais ou determinantes antigênicos podem ser derivados de, por exemplo: citomegalovírus (especialmente humano, tal como gB ou derivados do mesmo); Vírus Epstein Barr (tal como gp350); flavivírus (por exemplo, Vírus da Febre Amarela, Vírus da Dengue, Vírus da encefalite transmitida por carrapatos, Vírus da Encefalite Japonesa); vírus da hepatite, tal como o vírus da hepatite B (por exemplo, antígeno de superfície da hepatite B, tais como os antígenos PreS1, PreS2 e S descritos nos documentos EP-A-414 374; EP-A-0304 578 e EP-A-198474), vírus da hepatite A, vírus da hepatite C e vírus da hepatite E; HIV-1 (tal como tat, nef, gpl20 ou gpl60); vírus da herpes humana, tal como gD ou

derivados do mesmo ou Proteína Inicial Imediata, tal como ICP27 de HSV1 ou HSV2; vírus do papiloma humano (por exemplo HPV6, 11, 16, 18); Vírus da influenza (vírus inteiro vivo ou inativado, vírus da influenza dividido, cultivado em ovos ou células MDCK, ou células Vero ou virossomas da gripe inteiros (conforme descrito por Gluck, Vaccine, 1992,10, 915 a 920) ou proteínas purificadas ou recombinantes das mesmas, tais como proteínas NP, NA, HA ou M); vírus do sarampo; vírus da caxumba; vírus da parainfluenza; vírus da raiva; Vírus Sincicial Respiratório (tais como proteínas F e G); rotavírus (incluindo vírus vivos atenuados); vírus da varíola; Vírus Varicella Zoster (tais como gpl, II e IE63); e os vírus HPV responsáveis pelo câncer cervical (por exemplo, as proteínas precoces E6 ou E7 em fusão com um carreador de proteína D para formar fusões de Proteínas D-E6 ou E7 de HPV 16, ou combinações dos mesmos; ou combinações de E6 ou E7 com L2 (consultar, por exemplo, documento WO 96/26277).

[0301] Exemplos de antígenos bacterianos incluem, mas sem limitação, *Toxoplasma gondii* ou *Treponema pallidum*. Os antígenos bacterianos podem ser usados no tratamento ou na prevenção de várias doenças bacterianas, tais como Antraz, Botulismo, Tétano, Clamídia, Cólera, Difteria, Doença de Lyme, Sífilis e Tuberculose. Antígenos bacterianos ou determinantes antigênicos podem ser derivados de, por exemplo: *Bacillus* spp., incluindo *B. anthracis* (por exemplo, toxina botulínica); *Bordetella* spp, incluindo *B. pertussis* (por exemplo pertactina, toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fímbrias); *Borrelia* spp., incluindo *B. burgdorferi* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Campylobacter* spp, incluindo *C. jejuni* (por exemplo, toxinas, adesinas e invasinas) e *C. coli*; *Chlamydia* spp., incluindo *C. trachomatis* (por exemplo, MOMP, proteínas de ligação à heparina), *C. pneumoniae* (por exemplo, MOMP, proteínas de ligação à heparina), *C. psittaci*; *Clostridium* spp., incluindo *C. tetani* (tal como a toxina do tétano), *C. botulinum* (por exemplo, toxina botulínica), *C. difficile* (por exemplo, toxinas A ou B de

clostridium); *Corynebacterium spp.*, incluindo *C. diphtheriae* (por exemplo, toxina da difteria); *Ehrlichia spp.*, incluindo *E. equi* e o agente da Erliquiose Granulocítica Humana; *Rickettsia spp.*, incluindo *R.rickettsii*; *Enterococcus spp.*, incluindo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Escherichia spp.*, incluindo *E. coli* enterotóxica (por exemplo fatores de colonização, toxina lábil ao calor ou seus derivados, ou toxina estável ao calor), *E. coli* entero-hemorrágica, *E. coli* enteropatogênica (por exemplo, toxina semelhante à toxina shiga); *Haemophilus spp.*, incluindo *H. influenzae* tipo B (por exemplo, PRP), *H. influenzae* não tipável, por exemplo, OMP26, adesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D e lipoproteína D, e peptídeos derivados de fimbrina e fimbrina (consultar, por exemplo, documento nº. US 5.843.464); *Helicobacter spp.*, incluindo *H. pylori* (por exemplo, urease, catalase, toxina vacuolizante); *Pseudomonas spp.*, incluindo *P. aeruginosa*; *Legionella spp.*, incluindo *L. pneumophila*; *Leptospira spp.*, incluindo *L. interrogans*; *Listeria spp.*, incluindo *L. monocytogenes*; *Moraxella spp.*, incluindo *M. catarrhalis*, também conhecido como *Branhamella catarrhalis* (por exemplo, adesinas e invasinas de alto e baixo peso molecular); *Morexella Catarrhalis* (incluindo suas vesículas de membrana externa e OMP106 (consultar por exemplo W097/41731)); *Mycobacterium spp.*, incluindo *M. tuberculosis* (por exemplo, ESAT6, Antígeno 85A, -B ou -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Neisseria spp.*, incluindo *N. gonorrhea* e *N. meningitidis* (por exemplo, polissacarídeos capsulares e seus conjugados, proteínas de ligação à transferrina, proteínas de ligação à lactoferrina, PilC, adesinas); *Neisseria meningitidis* B (incluindo vesículas de membrana externa das mesmas, e NspA (consultar, por exemplo, documento WO 96/29412); *Salmonella spp.*, incluindo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Shigella spp.*, incluindo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Staphylococcus spp.*, incluindo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Streptococcus spp.*, incluindo *S. pneumoniae* (por exemplo, polissacarídeos capsulares e seus conjugados, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de ligação à colina) e o antígeno proteico Pneumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989,67,1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337 a 342), e seus derivados destoxificados mutantes

(consultar, por exemplo, documentos WO 90/06951; WO 99/03884); *Treponema spp.*, incluindo *T. pallidum* (por exemplo, as proteínas da membrana externa), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Vibrio spp.*, incluindo *V. cholera* (por exemplo, toxina da cólera); e *Yersinia spp.*, incluindo *Y. enterocolitica* (por exemplo, uma proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.

[0302] Antígenos parasitas/fúngicos ou determinantes antigênicos podem ser derivados de, por exemplo: *Babesia spp.*, incluindo *B. microti*; *Candida spp.*, incluindo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluindo *C. neoformans*; *Entamoeba spp.*, incluindo *E. histolytica*; *Giardia spp.*, incluindo; *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluindo *L. major*; *Plasmodium. faciparum* (MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, PfsI6, Pfs48/45, Pfs230 e seus análogos em *Plasmodium spp.*); *Pneumocystis spp.*, incluindo *P. carinii*; *Schistosoma spp.*, incluindo *S. mansoni*; *Trichomonas spp.*, incluindo *T. vaginalis*; *Toxoplasma spp.*, incluindo *T. gondii* (por exemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Trypanosoma spp.*, incluindo *T. cruzi*.

[0303] Será observado que de acordo com este aspecto da presente invenção, antígenos e determinantes antigênicos podem ser usados em muitas formas diferentes. Por exemplo, antígenos ou determinantes antigênicos podem estar presentes como proteínas ou peptídeos isolados (por exemplo, nas denominadas “vacinas de subunidade”) ou, por exemplo, como antígenos associados a células ou vírus ou determinantes antigênicos (por exemplo, em quaisquer cepas de patógenos vivos ou mortos). Patógenos vivos serão, de preferência, atenuados de maneira conhecida. Alternativamente, antígenos ou determinantes antigênicos podem ser gerados *in situ* no sujeito pelo uso de um polinucleotídeo que codifica um antígeno ou determinante antigênico (como na denominada “vacinação de DNA”), embora seja observado que os polinucleotídeos que podem ser usados com essa abordagem não estão limitados a DNA e também podem incluir RNA e polinucleotídeos modificados, conforme discutido acima.

[0304] Em uma modalidade, um antígeno de vacina também pode ser direcionado, por exemplo, para determinados tipos de células ou para determinados tecidos. Por exemplo, o antígeno de vacina pode ser direcionado a Células de Apresentação de Antígeno (APCs), por exemplo, pelo uso de agentes, tais como anticorpos direcionados a receptores de superfície APC, tal como DEC-205, por exemplo, conforme discutido no documento WO 2009/061996 (Celldex Therapeutics, Inc.), ou o receptor de manose (CD206), por exemplo, conforme discutido no documento WO 03040169 (Medarex, Inc.).

I. KITS

[0305] Também são fornecidos kits (por exemplo, kits de diagnóstico) que compreendem um ou mais domínios de ligação anti-CD27, domínios de ligação anti-PD-L1, construtos biespecíficos, construtos multiespecíficos ou composições, conforme descrito neste documento, opcionalmente com instruções de uso. Os kits também podem incluir panfletos informativos, por exemplo, panfletos informando como usar reagentes para praticar um método divulgado no presente documento. O termo “panfleto” inclui qualquer material escrito, materiais de marketing ou material gravado fornecido com o kit ou que de outra forma acompanha o kit.

[0306] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como uma limitação adicional. O conteúdo das figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados citados ao longo deste pedido são expressamente incorporados ao presente documento a título de referência.

V. EXEMPLOS

EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS ESPECÍFICOS PARA CD27

[0307] Os anticorpos monoclonais anti-CD27 humanos foram gerados por imunização da cepa H2L2 de camundongos transgênicos Harbour® com um antígeno CD27 humano solúvel. Os camundongos transgênicos Harbour® tiveram as sequências de DNA de cadeia pesada (HC) e de cadeia leve kappa (cadeia κ) endógena de camundongo

nocauteadas e tiveram sequências para as regiões variáveis (V) humanas e regiões constantes (C) de rato incorporadas de forma estável ao genoma de camundongo.

[0308] Antígeno e imunização: o antígeno era uma proteína de fusão solúvel que compreende um domínio extracelular de CD27 com uma etiqueta Fc (R&D Systems). O antígeno foi misturado com sistema adjuvante MPL mais TDM (Sigma) para imunizações. O antígeno CD27 recombinante solúvel de 5 a 25 microgramas em PBS foi misturado 1:1 com o adjuvante. Os camundongos foram injetados com 200 microlitros do antígeno preparado na cavidade peritoneal a cada 14 dias. Os animais que desenvolveram títulos anti-CD27 receberam uma injeção iv de antígeno de CD27 recombinante solúvel de 5 a 10 microgramas três a quatro dias antes da fusão. Os baços de camundongos foram colhidos e os esplenócitos isolados usados para a preparação do hibridoma.

[0309] Preparação de hibridoma: a linhagem celular de mieloma murino P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) foi usada para as fusões. RPMI 1640 (Invitrogen) que contém 10% de FBS foi usado para cultivar as células de mieloma. Suplementos de meio adicionais foram adicionados aos meios de crescimento de hibridoma, que incluíram: até 10% de suplemento de aumento de hibridoma (Sigma), 10% de FBS (Sigma), L-glutamina (Gibco), 0,1% de gentamicina (Gibco), 2-mercaptoetanol (Gibco), com HAT (Sigma; $1,0 \times 10^4$ M de hipoxantina, $4,0 \times 10^{-7}$ M de aminopterina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de meios de timidina).

[0310] As células do baço foram misturadas com as células de mieloma P3x63Ag8.653 em uma proporção de 6:1 e peletizadas por centrifugação. Polietilenoglicol foi adicionado gota a gota com mistura cuidadosa para facilitar a fusão. Os hibridomas foram deixados crescer por uma a duas semanas até que colônias visíveis se estabelecessem. O sobrenadante foi colhido e usado para a triagem inicial de IgG de rato através de ELISA com o uso de uma proteína de fusão CD27 humana solúvel e uma detecção específica de Fc de rato. Os sobrenadantes de IgG positivos foram, então, testados quanto à especificidade de CD27 por meio de citometria de fluxo. Os hibridomas também

foram triados quanto à reatividade cruzada com a CD27 de macaco cinomolgo e todos foram positivos para ligação.

[0311] As células de hibridoma foram expandidas e os sedimentos celulares foram congelados para isolamento e sequenciamento de RNA. As regiões de codificação de V_H e V_L de anticorpos monoclonais humanos foram identificadas com o uso de RNA dos hibridomas correspondentes. O RNA foi transcrito de forma inversa para cDNA, as regiões codificantes V foram amplificadas por PCR e os produtos de PCR foram sequenciados, inseridos em um vetor de IgG1kappa humano, transitoriamente expressos e purificados por cromatografia em coluna de proteína A que levou ao isolamento de anticorpos de interesse específico, que foram designados como 2B3 e 3C2.

EXEMPLO 2: ENSAIOS PARA DETERMINAR AS CARACTERÍSTICAS DE LIGAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO À CD27

[0312] As placas de microtitulação foram revestidas com CD27-FLAG-HIS humana recombinante em PBS e, em seguida, bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. Anticorpos monoclonais humanos purificados com proteína A foram adicionados em várias concentrações e incubados a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS/Tween e, então, incubadas com um reagente policlonal específico para Fc de IgG anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de raiz forte silvestre a 37 °C. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato HRP e analisadas a DO 450-650 nm com o uso de um leitor de placas de microtitulação. **A Figura 1** mostra que os anticorpos anti-CD27 2B3 e 3C2 se ligam à CD27 humana.

[0313] Para estabelecer que macacos cinomolgos são um modelo relevante para testar anticorpos monoclonais anti-CD27, placas de microtitulação foram revestidas com CD27-FLAG-HIS de cinomolgo recombinante em PBS e, em seguida, bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. Sobrenadantes de hibridoma ou controle de IgG de rato foram adicionados e incubados a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS/Tween e,

em seguida, incubadas com um reagente policlonal específico para Fc IgG antirrato de camundongo conjugado com peroxidase de raiz forte a 37 °C. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato HRP e analisadas a DO 450-650 nm com o uso de um leitor de placas de microtitulação. **A Figura 2** mostra que os anticorpos anti-CD27 2B3 e 3C2 se ligam à CD27 de cinomolgo.

EXEMPLO 3: LIGAÇÃO A CÉLULAS CD27

[0314] A capacidade de anticorpos monoclonais humanos anti-CD27 de se ligarem à CD27 em células que expressam CD27 humana em sua superfície foi investigada por citometria de fluxo da seguinte forma:

[0315] Os anticorpos foram testados quanto à ligação a uma linhagem celular humana que expressa CD27 humana em sua superfície. Os anticorpos monoclonais humanos purificados com proteína A (3 µg/ml) foram incubados com células Ramos que expressam CD27 humana à temperatura ambiente em um agitador de placas. Após 20 minutos, as células foram lavadas com PBS que contém 0,1% de BSA e 0,05% de NaN₃ (PBA) e os anticorpos ligados foram detectados por incubação das células com uma sonda específica para Fc de IgG anti-humano de cabra marcado com PE. O excesso de sonda foi lavado a partir das células com PBA e a fluorescência associada à célula foi determinada por análise com o uso de um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

[0316] Conforme mostrado na **Figura 3**, os anticorpos monoclonais humanos anti-CD27 demonstraram altos níveis de ligação a células que expressam CD27 humana.

EXEMPLO 4: LIGAÇÃO A CÉLULAS T HUMANAS

[0317] A capacidade dos anticorpos monoclonais humanos anti-CD27 de se ligarem à CD27 em células T humanas foi investigada por citometria de fluxo da seguinte forma:

[0318] Os anticorpos foram testados quanto à ligação a células T CD3⁺ humanas que expressam CD27 humana em sua superfície. Células mononucleares de sangue periférico humano foram isoladas a partir de

camadas leucocitárias com o uso de separação Ficoll, e células CD3⁺ foram isoladas adicionalmente de PBMC com o uso de tecnologia de separação de microesferas magnéticas da Miltenyi Biotec. Os anticorpos monoclonais humanos purificados com proteína A (3 µg/ml) foram incubados com as células T à temperatura ambiente em um agitador de placas. Após 20 minutos, as células foram lavadas com PBS que contém 0,1% de BSA e 0,05% de NaN₃ (PBA) e os anticorpos ligados foram detectados por incubação das células com uma sonda específica para Fc de IgG anti-humano de cabra marcado com PE. O excesso de sonda foi lavado a partir das células com PBA e a fluorescência associada à célula foi determinada por análise com o uso de um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

[0319] Conforme mostrado na **Figura 4**, os anticorpos monoclonais humanos anti-CD27 demonstraram altos níveis de ligação a células T humanas.

EXEMPLO 5: BLOQUEIO DE LIGAÇÃO DE CD70

[0320] O efeito dos anticorpos monoclonais humanos na ligação de CD70 solúvel à CD27 na superfície celular foi medido por citometria de fluxo. Células Ramos que expressam CD27 foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos (50 µg/ml), seguido pela adição de CD70-biotina humana ([final] = 0,5 µg/ml) por 20 minutos à temperatura ambiente em um agitador com placas. A CD70 capturada de CD27 foi detectada com estreptavidina PE e analisada em um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA). **A Figura 5** mostra que os anticorpos anti-CD27 2B3 e 3C2 bloqueiam a ligação de CD70 a CD27 em células.

EXEMPLO 6: ATIVAÇÃO DE NFκB

[0321] Uma linhagem celular repórter de luciferase que expressa CD27 foi incubada durante 6 horas a 37 °C, 6% de CO₂ com várias concentrações dos anticorpos anti-CD27 humanos. A luciferase é expressa após a ativação e foi detectada com o Luciferase Assay System da Promega de acordo com as orientações do fabricante. **A Figura 6** mostra o alto nível de

ativação de NFkB induzida por anticorpos 2B3 e 3C2 em função da concentração de anticorpos.

EXEMPLO 7: PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T

[0322] Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano (PBMCs) isoladas de preparações de camada leucocitária e células CD3⁺ foram isoladas adicionalmente a partir de PBMCs com o uso de tecnologia de separação de microesferas magnéticas de Miltenyi Biotec. As células T foram marcadas com éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) a 1 mM à temperatura ambiente durante a rotação durante 5 minutos. As PBMCs marcadas com CFSE (1×10^6) foram dispensadas em poços revestidos a secas com anticorpo anti-CD3 (OKT3, eBioscience) a 1 µg/ml e os anticorpos anti-CD27 ou controle de IgG1 humano a 10 µg/ml. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 72 horas. As células foram colhidas e analisadas por citometria de fluxo em um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. **A Figura 7** mostra que os anticorpos 2B3 e 3C2 aumentam significativamente a proliferação de células T.

EXEMPLO 8: GERAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS ESPECÍFICOS PARA PD-L1

[0323] Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 humanos foram gerados por imunização da cepa de H2L2 de camundongos transgênicos Harbour® com um antígeno PD-L1 humano solúvel. Os camundongos transgênicos Harbour® tiveram as sequências de DNA de cadeia pesada (HC) e de cadeia leve kappa (cadeia κ) endógena de camundongo nocauteadas e tiveram sequências para as regiões variáveis (V) humanas e regiões constantes (C) de rato incorporadas de forma estável ao genoma de camundongo.

[0324] Antígeno e imunização: o antígeno era uma proteína de fusão solúvel que compreende um domínio extracelular PD-L1 com um marcador HIS (R&D Systems) ou uma proteína quimérica PD-L1 – msG2a humana recombinante (produzida internamente). O antígeno foi misturado com sistema adjuvante MPL mais TDM (Sigma) para imunizações. O antígeno PD-L1

recombinante solúvel de 5 a 25 microgramas em PBS foi misturado 1:1 com o adjuvante. Os camundongos foram injetados com 200 microlitros do antígeno preparado na cavidade peritoneal a cada 14 dias. Os animais que desenvolveram titulações anti-PD-L1 receberam uma injeção iv de antígeno PD-L1 recombinante solúvel de 5 a 10 microgramas três a quatro dias antes da fusão. Os baços de camundongos foram colhidos e os esplenócitos isolados usados para a preparação do hibridoma.

[0325] Preparação de hibridoma: a linhagem celular de mieloma murino P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) foi usada para as fusões. RPMI 1640 (Invitrogen) que contém 10% de FBS foi usado para cultivar as células de mieloma. Suplementos de meio adicionais foram adicionados aos meios de crescimento de hibridoma, que incluíram: até 10% de suplemento de aumento de hibridoma (Sigma), 10% de FBS (Sigma), L-glutamina (Gibco), 0,1% de gentamicina (Gibco), 2-mercaptoetanol (Gibco), com HAT (Sigma; $1,0 \times 10^4$ M de hipoxantina, $4,0 \times 10^{-7}$ M de aminopterina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de meios de timidina).

[0326] As células do baço foram misturadas com as células de mieloma P3x63Ag8.653 em uma proporção de 6:1 e peletizadas por centrifugação. Polietilenoglicol foi adicionado gota a gota com mistura cuidadosa para facilitar a fusão. Os hibridomas foram deixados crescer por uma a duas semanas até que colônias visíveis se estabelecessem. O sobrenadante foi colhido e usado para a triagem inicial de IgG de rato através de ELISA com o uso de uma proteína de fusão PD-L1 humana solúvel e uma detecção específica de Fc de rato. Os sobrenadantes positivos para IgG foram, então, testados quanto à especificidade de PD-L1 por meio de citometria de fluxo. Os hibridomas também foram triados quanto à reatividade cruzada com a PD-L1 de macaco cinomolgo e todos foram positivos para ligação.

[0327] As células de hibridoma foram expandidas e os sedimentos celulares foram congelados para isolamento e sequenciamento de RNA. As regiões de codificação de V_H e V_L de anticorpos monoclonais humanos foram identificadas com o uso de RNA dos hibridomas correspondentes. O RNA foi transcrito de forma inversa para cDNA, as regiões

codificantes V foram amplificadas por PCR e os produtos de PCR foram sequenciados, inseridas no vetor de IgG1kappa humano, transitoriamente expressas e purificadas por cromatografia em coluna de proteína A que levou ao isolamento de uma série de anticorpos de interesse particular, que foram designados como 1B3, 3B6, 4A3, 7H7, 8B1 e 9H9.

EXEMPLO 9: ENSAIOS PARA DETERMINAR AS
CARACTERÍSTICAS DE LIGAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO
A PD-L1

[0328] As placas de microtitulação foram revestidas com PD-L1-msFc humano recombinante em PBS e, em seguida, bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. Anticorpos monoclonais humanos purificados com proteína A foram adicionados em várias concentrações e incubados a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS/Tween e, então, incubadas com um reagente policlonal específico para Fc de IgG anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de raiz forte silvestre a 37 °C. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato HRP e analisadas a DO 450-650 nm com o uso de um leitor de placas de microtitulação. **A Figura 8** mostra que os anticorpos anti-PD-L1 se ligam fortemente a PD-L1 humano em função da concentração de anticorpo.

[0329] Para estabelecer que macacos cinomolgo são um modelo relevante para testar anticorpos monoclonais anti-PD-L1, as placas de microtitulação foram revestidas com PD-L1-FLAG-HIS de cinomolgo recombinante em PBS e, em seguida, bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. Sobrenadantes de hibridoma ou controle de IgG de rato foram adicionados e incubados a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS/Tween e, em seguida, incubadas com um reagente policlonal específico para Fc IgG antirrato de camundongo conjugado com peroxidase de raiz forte a 37 °C. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato HRP e analisadas a DO 450-650 nm com o uso de um leitor de placas de microtitulação. **A Figura 9** mostra que os anticorpos anti-PD-L1 se ligam a PD-L1 de cinomolgo.

EXEMPLO 10: BLOQUEIO DE LIGAÇÃO DE PD1

[0330] O efeito dos anticorpos monoclonais humanos na ligação de PD1 solúvel a PD-L1 na superfície celular foi medido por citometria de fluxo. As células 293 que expressam PD-L1 foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos, seguido pela adição de biotina-PD1 humana ([final] = 0,5 mg/ml). PD1 capturada por PD-L1 foi detectada com estreptavidina PE e analisada em um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA). **A Figura 10** mostra que os anticorpos anti-PD-L1 bloqueiam a ligação de PD-L1 a PD1 em função da concentração de anticorpo.

EXEMPLO 11: LIGAÇÃO A CÉLULAS DE PD-L1

[0331] A capacidade dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 de se ligarem a PD-L1 em células que expressam PD-L1 humana em sua superfície foi investigada por citometria de fluxo da seguinte forma:

[0332] Os anticorpos foram testados quanto à ligação a uma linhagem celular humana que expressa PD-L1 humana em sua superfície. Os anticorpos monoclonais humanos purificados com proteína A foram incubados com células 293 que expressam PD-L1 humana à temperatura ambiente em um agitador com placas. Após 20 minutos, as células foram lavadas com PBS que contém 0,1% de BSA e 0,05% de NaN₃ (PBA) e os anticorpos ligados foram detectados por incubação das células com uma sonda específica para Fc de IgG anti-humano de cabra marcado com PE. O excesso de sonda foi lavado a partir das células com PBA e a fluorescência associada à célula foi determinada por análise com o uso de um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

[0333] Conforme mostrado na **Figura 11**, os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 demonstraram altos níveis de ligação a células que expressam PD-L1 humano como uma função de concentração de anticorpo.

EXEMPLO 12: LIGAÇÃO A CÉLULAS DENDRÍTICAS

HUMANAS

[0334] A capacidade dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 de se ligarem a PD-L1 em células dendríticas humanas foi investigada por citometria de fluxo da seguinte forma:

[0335] Os anticorpos foram testados quanto à ligação a células dendríticas humanas que expressam PD-L1 humano em sua superfície. As células dendríticas foram geradas da seguinte maneira: PMBCs foram adicionadas a frascos T de 175 cm² e os monócitos foram deixados aderir por aproximadamente 2 horas a 37 °C, 6% de CO₂. As células não aderentes foram removidas e os monócitos cultivados por 7 dias em RPMI que contém 10% de FBS, 10 ng/ml de IL-4 (R&D Systems) e 100 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems). As células não aderentes foram colhidas e confirmadas como sendo células dendríticas por expressão de CD11c (não mostrado). Os anticorpos monoclonais humanos purificados com proteína A foram incubados com as células dendríticas à temperatura ambiente em um agitador com placas. Após 20 minutos, as células foram lavadas com PBS que contém 0,1% de BSA e 0,05% de NaN₃ (PBA) e os anticorpos ligados foram detectados por incubação das células com uma sonda específica para Fc de IgG anti-humano de cabra marcado com PE. O excesso de sonda foi lavado a partir das células com PBA e a fluorescência associada à célula foi determinada por análise com o uso de um instrumento FACSCanto II™ (BD Biosciences, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

[0336] Conforme mostrado na **Figura 12**, os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 demonstraram altos níveis de ligação a células dendríticas humanas em função de concentração de anticorpos.

EXEMPLO 13: BIOENSAIO DE BLOQUEIO DE PD1/PD-

L1 DE CÉLULAS T

[0337] O efeito dos anticorpos de PD-L1 no bloqueio da interação de PD1/PD-L1 foi determinado com o uso do ensaio de bloqueio de PD1/PD-L1 da Promega. Duas linhagens celulares modificadas, células PD1 efetoras e células PD-L1 aAPC/CHO-K1, foram cocultivadas na presença dos

anticorpos por 6 horas. O bloqueio da interação de PD1/PD-L1 resulta na ativação de TCR e induz a luminescência através da via de NFAT. A luminescência foi detectada pela adição do reagente Bio-Glo e quantificada em um luminômetro Perkin Elmer Victor X. Conforme mostrado na **Figura 13**, os anticorpos anti-PD-L1 bloqueiam efetivamente a interação de PD1/PD-L1 entre as células, levando à ativação da via de NFAT.

EXEMPLO 14: REAÇÃO DE LINFÓCITOS MISTOS

[0338] Células mononucleares de sangue periférico humano foram isoladas a partir de camadas leucocitárias com o uso de separação de Ficoll, e células CD4⁺ foram ainda isoladas das PBMCs com o uso de tecnologia de separação de microesferas magnéticas da Miltenyi Biotec. Células dendríticas alogênicas foram geradas da seguinte forma: as PMBCs foram adicionadas a frascos T de 175 cm² e monócitos deixados aderir por aproximadamente 2 horas a 37 °C, 6% de CO₂. As células não aderentes foram removidas e os monócitos cultivados por 7 dias em RPMI que contêm 10% de FBS, 10 ng/ml de IL-4 (R&D Systems) e 100 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems). As células não aderentes foram colhidas e confirmadas como sendo células dendríticas por expressão de CD11c (não mostrado). As células CD4⁺ e DCs foram coincubadas em uma proporção de 10:1 na presença das diluições de anticorpos por 3 dias. Os sobrenadantes foram colhidos e analisados quanto à produção de IL-2 por ELISA (R&D Systems). Conforme mostrado na **Figura 14**, os anticorpos anti-PD-L1 foram capazes de induzir uma resposta significativa de linfócitos mistos.

EXEMPLO 15: DESENVOLVIMENTO E TESTE FUNCIONAL DE CONSTRUTOS BIESPECÍFICOS

[0339] Construtos biespecíficos tetravalentes foram desenvolvidos com o uso de uma estrutura principal de IgG1 totalmente humana para o anticorpo monoclonal PD-L1 e o scFv do anticorpo monoclonal de CD27 geneticamente ligado ao C-terminal da cadeia pesada. Construtos biespecíficos alternativos também foram desenvolvidos com o uso de uma estrutura principal de IgG1 totalmente humana para o anticorpo monoclonal de CD27 e o scFv do

anticorpo monoclonal de PD-L1. **A Figura 15A** mostra um vetor representativo que contém a cadeia leve de CD27, a cadeia pesada de CD27 e o polipeptídeo Fv (VL + VH) de cadeia simples de PD-L1 de c-terminal. **As Figuras 15B e 15C são duas** representações **alternativas** do formato biespecífico de CD27/PD-L1. **A Figura 15B** mostra a proteína de anticorpo biespecífico de CD27/PD-L1, em que um anticorpo anti-PD-L1 está ligado a um scFv anti-CD27 (referido no presente documento como “CDX-527” quando o anticorpo anti-PD-L1 é 9H9 e o scFv anti-CD27 é derivado de 2B3. Caso contrário, AbXx2B3) e a **Figura 15C** mostra a proteína do anticorpo biespecífico de CD27/PD-L1 em que um anticorpo anti-CD27 está ligado a um scFv anti-PD-L1. **A Figura 15D** é uma tabela de construtos biespecíficos anti-CD27/anti-PD-L1 representativos gerados.

[0340] A sequência completa de cadeia pesada de 9H9x2B3 (CDX-527) foi a seguinte (com a sequência de região constante de IgG1 mostrada em negrito):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVR
QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRVED
TAMYYCARDPRPVAGASALWGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT**
AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG
SSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPR
LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSENFAVYYCQQYNNWPLTFG
CGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC
KASGYTFTGYYIHWRQAPGQCLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRV
TSINTAYMELSRLRSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEIFPDADFIDWGQGTLLTVS
S (SEQ ID NO:179)

[0341] A sequência de cadeia leve 9H9x2B3 (CDX-527) foi a seguinte (com a sequência de região constante mostrada em negrito):

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSSISGWLAWYQQ
 KPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYY
 GSSRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:180)

EXEMPLO 16: ENSAIOS PARA DETERMINAR
 ATIVIDADE FUNCIONAL E CARACTERÍSTICAS DE LIGAÇÃO DE
 ANTICORPO MONOCLONAL BIESPECÍFICO

[0342] A ligação de construtos biespecíficos a CD27 e PD-L1 foi avaliada com o uso de um ELISA bifuncional. O anticorpo AbX é um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 conhecido. Em suma, uma placa de microtitulação foi revestida com CD27-FLAG-HIS humano. Permitiu-se que as diluições dos construtos biespecíficos se ligassem antes da adição de PD-L1-msFc humano que foi detectado com um anticorpo IgG antirrato de cabra marcado com HRP (específico para Fc). Curvas de ligação representativas para três construtos biespecíficos (CD27xAbX, CD27x8B1 e CD27x9H9) são mostradas na **Figura 16**. Todos os três anticorpos demonstraram ligação significativa a CD27 e PD-L1.

[0343] A ativação da via CD27 foi avaliada pela medição de ativação de NFκB. Em suma, a CD27 foi transfectada em uma linhagem celular repórter de NFκB-luciferase (Signosis). As células foram incubadas por 6 horas com cada construto ou anticorpo biespecífico (1F5xAbX, 2B3x8B1, 2B3x9H9, 1F5, 2B3 ou hulgG1) e a expressão de luciferase foi detectada com o sistema Brite-Glo™ (Promega). Observação: a linhagem celular repórter é positiva para PD-L1 humano. **A Figura 17** mostra o nível de ativação de NFκB induzida pelos anticorpos em função da concentração. Além disso, os construtos biespecíficos 1F5xAbX, 2B3x8B1 e 2B3x9H9 mostraram ativação de NFκB significativamente maior do que 1F5 ou 2B3 isoladamente.

[0344] O bloqueio da sinalização de PD-1 foi avaliado medindo-se a ativação da via de NFAT. Em suma, as células efectoras de PD-1 e células aAPC de PD-L1 foram cocultivadas na presença de diluições de cada

construto biespecífico ou do anticorpo de controle (CD27xAbX, CD27x8B1, CD27x9H9 ou hulgG1). A ativação da via de NFAT através de bloqueio de PD-L1/PD-1 é detectada pela adição do reagente Bio-Glo™. (Kit comercialmente disponível junto à Promega). Conforme mostrado na **Figura 18**, os construtos biespecíficos induziram uma forte ativação da via de NFAT em função da concentração de anticorpo.

[0345] A produção/secreção de IL-2 também foi medida em uma reação mista de linfócitos. Em suma, as células CD4 foram incubadas na presença de células dendríticas alogênicas e diluições de cada construto biespecífico ou anticorpo (CD27xAbX, CD27x8B1, CD27x9H9, hulgG1, AbX, 8B1 ou 9H9) por 3 dias. Os sobrenadantes foram colhidos e os níveis de IL-2 foram avaliados por ELISA (R&D Systems). As curvas de concentração de IL-2 representativas são mostradas na **Figura 19**. Os construtos biespecíficos CD27xAbX, CD27x8B1 e CD27x9H9 mostraram produção/secreção de IL-2 significativamente maior do que AbX (um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 conhecido), 8B1 ou 9H9 isoladamente (por exemplo, produção de IL-2 aproximadamente 2x maior).

EXEMPLO 17: ENSAIOS PARA DETERMINAR A ATIVIDADE IN VIVO DE CONSTRUTOS BIESPECÍFICOS DE CD27/PD-L1

[0346] Camundongos HuCD27-Tg foram injetados com 0,1 mg de construto biespecífico de CD27xAbX (BsAb) ou anticorpo monoespecífico de CD27 (mAb) e 5 mg de ovalbumina no dia 0, conforme indicado no eixo geométrico x de cada gráfico. No Dia 7, as células do baço foram colhidas e a citocina intracelular IFN γ e IL2, e a granzima de enzima de citólise B (GrB) foram detectadas por análise de citometria de fluxo com e sem estimulação *ex vivo* do peptídeo SIINFEKL. A porcentagem de IFN- γ ⁺ e IL2⁺ específicos de SIINFEKL em células T CD8 (**Figura 20A**) e a porcentagem de GrB⁺ em células T CD8 sem estimulação de SIINFEKL (**Figura 20B**) são mostradas, indicando que o construto biespecífico CD27xAbX induz uma resposta de célula T CD8 significativa em comparação com o anticorpo

monoclonal de CD27 isoladamente (por exemplo, resposta cerca de 2,5x a cerca de 8x maior).

[0347] O crescimento do tumor, a sobrevivência e os números de infiltrados tumorais também foram medidos em camundongos tratados com BsAb ou mAbs. Camundongos HuCD27-Tg foram injetados iv com células BCL1 (5×10^6) no dia 0. Os anticorpos ou o construto biespecífico foram injetados ip (0,2 mg) no dia 5. Os camundongos foram divididos em dois grupos. Um grupo foi usado para medir a sobrevivência ($n = 8$). **A Figura 21** mostra a porcentagem de sobrevivência ao longo do tempo de camundongos tratados com anticorpo monoclonal de CD27, anticorpo monoclonal de PD-L1, combinação de anticorpos monoclonais de CD27 + PD-L1 e CD27xAbX BsAb. Os camundongos tratados com anticorpos CD27 + PD-L1 sobreviveram significativamente mais do que os camundongos tratados com anticorpo monoclonal de CD27, anticorpo monoclonal de PD-L1 ou Hu IgG1 isoladamente (por exemplo, 1,5x a 2x mais). Além disso, os camundongos tratados com o CD27xAbX BsAb sobreviveram significativamente mais do que os camundongos tratados com qualquer um dos outros anticorpos testados isoladamente ou em combinação. De fato, 70% a 80% dos camundongos tratados com CD27xAbX BsAb ainda estavam vivos após 80 dias após a inoculação do tumor, enquanto os camundongos de outros grupos morreram. Três camundongos sobreviventes foram desafiados novamente com o mesmo número de células BCL1 após 180 dias de acompanhamento, e eles foram protegidos do novo desafio.

[0348] O segundo grupo de camundongos foi usado para medir o peso do tumor e os níveis de células T no dia 11. **As Figuras 22A a 22D** mostram o peso do tumor, porcentagem de células T CD8, porcentagem de células T CD4 e células T CD8 duplamente positivas para IFN γ e GrB, respectivamente. Semelhante aos dados de sobrevivência, CD27xAbX BsAb reduziu significativamente o peso do tumor (por exemplo, 1,5x a 3x menos) e aumentou significativamente o número e a atividade de células T (por exemplo, 1,5x a 4x mais), em comparação com qualquer um dos outros anticorpos testados isoladamente ou em combinação. **As Figuras 23A e 23B** mostram a

regulação positiva do nível de expressão de PD-L1 na superfície de células de linfoma de BCL1 (**Figura 23A**) e células infiltradas de microambiente tumoral (**Figura 23B**) após o tratamento com mAb CD27 (CDX-1127), fornecendo a justificativa para a combinação ou BsAb de anti-CD27 e anti-PD-L1.

EXEMPLO 18: ELISA BIFUNCIONAL

[0349] A caracterização e a ligação do construto biespecífico CDX-527 (preparado como no Exemplo 15) foram analisadas. **A Figura 15E** mostra a caracterização do anticorpo biespecífico CDX-527 por HPLC e eletroforese em gel (condições de redução). A ligação a CD27 e PD-L1 foi determinada com o uso de um ELISA bifuncional geralmente conforme descrito no Exemplo 16. Os resultados são mostrados na **Figura 24** a partir da qual pode ser visto que CDX-527 demonstrou ligação significativa a CD27 e PD-L1.

EXEMPLO 19: ATIVAÇÃO DE NFκB PELO CONSTRUTO BIESPECÍFICO DE CDX-527

[0350] A ativação de NFκB pelo construto biespecífico de CDX-527 (preparado como no Exemplo 15) foi determinada, de modo geral, conforme descrito no Exemplo 16, com a exceção de que utilizou-se o reagente SteadyGlo™ da Promega em vez de BriteGlo™.

[0351] Os resultados são mostrados na **Figura 25**, que mostra o maior nível de ativação por CDX-527 em comparação com os anticorpos monoespecíficos anti-CD27 1F5 e 2B3 isoladamente. A ativação também foi medida na presença de FcγR1 solúvel, que aumentou ainda mais a ativação de NFκB, conforme mostrado.

EXEMPLO 20: REAÇÃO DE LINFÓCITOS MISTOS

[0352] A capacidade do construto biespecífico CDX-527 (preparado como no Exemplo 15) para induzir uma resposta mista de linfócitos foi determinada pelo método descrito de modo geral no Exemplo 14, com teste para IL-2.

[0353] Os resultados são mostrados na **Figura 26**, a partir da qual pode ser visto que CDX-527 foi capaz de induzir uma resposta de

linfócitos mista significativa que também foi significativamente maior do que a dos anticorpos monoespecíficos 2B3 e 9H9 quando usados isoladamente ou em combinação.

EXEMPLO 21: ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T

[0354] Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano (PBMCs) foram isoladas de preparações de camada leucocitária e células CD3⁺ foram isoladas adicionalmente de PBMCs com o uso de tecnologia de separação magnética de esferas da Miltenyi Biotec. Células CD3⁺ (1×10^5) foram dispensadas em poços revestidos com anticorpo anti-CD3 (OKT3, eBioscience) e PD-L1 humano solúvel. Os anticorpos 2B3 e 9H9 ou CDX-527 (preparados como no Exemplo 15) foram adicionados às células em concentrações entre 0,1 nM e 10 nM. As placas foram incubadas a 37,5% de CO₂ durante 72 horas, no momento em que os níveis de IL-2 nos sobrenadantes foram medidos.

[0355] Os resultados são mostrados na **Figura 27** a partir da qual pode ser visto que CDX-527 ativou significativamente as células T e o fez em uma extensão significativamente maior do que os anticorpos monoespecíficos 2B3 e 9H9 quando usados em combinação.

EXEMPLO 22: FARMACOCINÉTICA

[0356] A farmacocinética de CDX-527 foi estudada em primatas não humanos (NHPs) em um nível de dose de 7,0 mg/kg e volume de 3,0 ml/kg iv. Nenhuma mudança significativa foi observada em quaisquer parâmetros clínicos durante o estudo de 21 dias. Os níveis séricos de CDX-527 foram determinados por ELISA.

[0357] Os resultados são mostrados na **Figura 28**. A análise farmacocinética resultou em T_{1/2} de aproximadamente 110 horas.

EXEMPLO 23: ENSAIO DE BLOQUEIO DE PD1/PDL1 BASEADO EM CÉLULAS

[0358] Os anticorpos biespecíficos 9H9x2B3 e a configuração oposta 2B3x9H9 foram comparados em um ensaio de bloqueio de PD1/PDL1 baseado em células geralmente conforme descrito no Exemplo 13.

[0359] Os resultados são mostrados na **Figura 29** a partir da qual pode ser visto que a configuração 9H9x2B3 foi mais potente no bloqueio da sinalização de PD-1 do que a configuração de 2B3x9H9.

EXEMPLO 24: REAÇÃO DE LINFÓCITOS MISTOS

[0360] Os anticorpos biespecíficos 9H9x2B3 e a configuração oposta 2B3x9H9 foram comparados em uma reação de linfócitos mista, de modo geral, conforme descrito no Exemplo 14.

[0361] Os resultados são mostrados na Figura 30 a partir da qual pode ser visto que a configuração 9H9x2B3 foi mais potente na ativação de células T do que a configuração 2B3x9H9.

EXEMPLO 25: RESPOSTA DE CÉLULAS T CD8 INDUZIDA POR VACINA

[0362] Os anticorpos biespecíficos AbXx2B3 e a configuração oposta 2B3xAbX foram comparados em um modelo de vacina de resposta de células T, de modo geral, conforme descrito no Exemplo 17.

[0363] Os resultados são mostrados na **Figura 31** a partir da qual pode ser visto que AbXx2B3 foi mais potente do que 2B3xAbX na estimulação de uma resposta de células T CD8+ induzida por vacina.

EXEMPLO 26: MODELO DE TUMOR DE BCL1

[0364] Os anticorpos biespecíficos AbXx2B3 e a configuração oposta 2B3xAbX foram comparados em um modelo de tumor BCL1, conforme descrito, de modo geral, no Exemplo 17.

[0365] Os resultados são mostrados na **Figura 32** a partir da qual pode ser visto que AbXx2B3 teve maior atividade antitumoral do que 2B3xAbX.

EXEMPLO 27: BLOQUEIO DE LIGAÇÃO DE PD-L1 A CD80

[0366] Uma placa de microtitulação foi revestida com CD80 humana recombinante e depois bloqueada. O huPD-L1 biotinilado foi pré-incubado por 1 hora à temperatura ambiente com 50 µg/ml do controle de hulG1

ou dos anticorpos anti-PD-L1 (AbX ou 9H9) e, em seguida, adicionado à placa. Estreptavidina-HRP foi usada para detectar a ligação de PD-L1 a CD80.

[0367] Os resultados são mostrados na **Figura 33**, a partir da qual pode ser visto que os anticorpos anti-PD-L1 bloquearam completamente a ligação de PD-L1 a CD80.

EXEMPLO 28: LIGAÇÃO DE 2B3 A HUCD27

[0368] O domínio extracelular do tipo selvagem de comprimento total (ECD) de CD27 humana ou CD27 humana com os aminoácidos 85, 87, 88 e 89 mutados (A85S, R87A, N88A e G89A; consultar **Figura 34**) foram revestidos em uma placa e, em seguida, bloqueados. O sobrenadante de células transfectadas transitoriamente que expressam mAb 2B3 foi adicionado e a ligação foi detectada com um anticorpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humano conjugado com HRP.

[0369] Os resultados são mostrados na **Figura 35** a partir da qual pode ser visto que o anticorpo anti-CD27 2B3 não se ligou a ECD de CD27 mutada. Consequentemente, isso indica que o anticorpo 2B3 se liga a um epítopo na CD27 humana envolvendo ou incluindo um ou mais resíduos dentro dos aminoácidos 80 a 95, por exemplo, um ou mais resíduos dentro dos aminoácidos 85 a 89, do domínio extracelular (ECD) da CD27 humana (SEQ ID NO: 183), por exemplo, aminoácidos 85, 87, 88 e/ou 89 de ECD de CD27 humana (SEQ ID NO: 183).

EXEMPLO 29: AUMENTO DE EXPRESSÃO DE 9H9X2B3 POR MEIO DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE PROTEÍNA: 9H9-2B3 (DD)

[0370] Para aumentar a expressão do produto biespecífico, o resíduo raro de valina (V) em H72 em FR3 da cadeia pesada de 2B3 e o resíduo raro de asparagina (N) em L82 em FR3 da cadeia leve de 2B3 foram, cada um, alterados para resíduos de ácido aspártico (D) (isto é, V72D e N82D respectivamente).

[0371] A sequência de cadeia pesada de 2B3 modificada foi a seguinte (as CDRs estão sublinhadas e o resíduo modificado em FR3 está duplamente sublinhado):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**GYIHWVR**
 QAPGQGLEWMG**WINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRD**TSINTAYMELSRLRSDD
 TAVYFCARD**DRLVLPWFGEIFPD**AFDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:177)

[0372] A sequência de cadeia leve de 2B3 modificada foi a seguinte (as CDRs estão sublinhadas e o resíduo modificado em FR3 está duplamente sublinhado):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC**RASQSIRSNLAWYQQK**
 PGQAPRLLIY**GA**STRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE**D**FAVYYC**QQYNN**
WPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:178)

[0373] Essas sequências (designadas 2B3 (DD)) foram utilizadas em um formato de scFv que foi geneticamente ligado ao C-terminal das cadeias pesadas do anticorpo 9H9. O anticorpo biespecífico 9H9x2B3 (DD) resultante foi designado 9H9x2B3 (DD).

[0374] A sequência de cadeia pesada de 9H9x2B3 completa (DD) foi a seguinte (com a sequência de “estrutura principal” constante de IgG1 mostrada em negrito):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVR
 QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRVED
 TAMYCARDPRPVAGASALWGQGTTLVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT**
AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GSSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPR
LLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEFAVYYC**QQYNNWPLTFG**
CGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK
 ASGYTFTGYIHWVRQAPGQ**C**LEWMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRD
 TSINTAYMELSRLRSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEIFPD**AFDIWGQGT**LVTVSS
 S (SEQ ID NO:181)

[0375] A sequência de cadeia pesada 9H9x2B3 (DD) foi a seguinte (com a região constante mostrada em negrito):

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSSISGWLAWYQQ
KPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYY
GSSRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:182)

[0376] A sequência de DNA da sequência de domínio variável 9H9x2B3(DD) foi a seguinte:

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCGGGTGGTGGACTCGTG
CAGCCCGGCGGATCCCTGAGACTCTCTTGTGCCGCATCGGGCGGCATTAT
TAGCACTTACTGGATGTCATGGGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCTTGG
AATGGGTGGCGAATATCAAGCAGGATGGATCCGAGAAGTACTACGTGGAC
TCCGTGAAGGGCAGATTCACCATTTCCCGGGACAACGCCAAGAAGTCTCGCT
CTATCTGCAAATGAACTCGTTGCGGGTGAAGATACTGCCATGTACTACTG
CGCCCGGGACCGGCCTGTGGCCGGGGCGTCGGCCCTCTGGGGCCAGGG
CACTCTGGTCACCGTGTCTCT (SEQ ID NO:185)

[0377] A sequência de DNA da sequência de domínio scFv 9H9x2B3 (DD) era a seguinte (as sequências de conector e ligante são mostradas em negrito):

GGCTCCAGCGGGGGTGGCGGTTCCGAGATCGTGAT
GACTCAGAGCCCGGCAACCCTGTCCGTGTCTCCGGGGGAGCGGGCTACT
CTTTCCTGCCGGGCATCCCAGTCCATCCGGTCGAACCTTGCGTGGTACCA
ACAGAAGCCTGGACAGGCGCCCCGCCTGCTGATCTACGGGGCGTCGACT
AGGGCCACCGGCATCCCGGCCCCGCTTCTCCGGGTCCGGATCCGGCACCG
AATTCACCCTCACCATCTCGAGCCTGCAGTCCGAAAACCTTCGCCGTCTACT
ACTGCCAGCAGTACAACAACCTGGCCGCTGACATTCGGATGCGGAACCAAA
GTGGAAATCAAG**GGCGGCGGCGGATCCGGCGGTGGCGGCAGCGGCGGT**
GGAGGATCCGGTGGCGGCGGTTCCAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGC
GCCGAAGTCAAGAAGCCCGGGGCCAGCGTGAAAGTCAGCTGCAAGGCTT
CCGGATACACCTTCACGGGTACTACATTCAGTGGGTTCGCCAAGCGCCC

GGGCAGTGTCTGGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACTCGGGGGGAA
 CCAACTCGGCCCCAAAAGTTCCAGGACCGGGTCACCATTACAAGAGTCACG
 TCCATCAACACTGCCTACATGGAGTTGAGCCGGCTGCGATCAGACGACAC
 CGCCGTGTACTTCTGCGCGAGGGACCGCCTCGTCCTCCCGTGGTTTGA
 GAGATCTTCCCGGATGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGGACCCTCGTGAC
 TGTGTCCAGC (SEQ ID NO:186)

[0378] A sequência de DNA da sequência variável de cadeia leve de 9H9x2B3 (DD) foi a seguinte:

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCCACCCTTTCCG
 CGAGCGTCGGCGACAGAGTGACCATTACTTGTCGGGCCTCGCAAAGCATC
 TCCGGCTGGCTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCTGGAAAGGCCCTAAGCT
 GCTGATCTACAAGGCCTCATCCCTGGAGTCCGGAGTGCCTTCACGCTTTT
 CGGGGAGCGGATCGGGGACTGAGTTCACCCTCACCATTTCCTCCCTGCAA
 CCCGACGATTTTCGCGACATACTACTGCCAGCAGTACTACGGTTCCTCGCG
 CACGTTCGGACAGGGCACTAACGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO:187)

[0379] Como pode ser visto na **Figura 36**, as transfecções transitórias mostraram uma produção (expressão) melhorada do construto modificado 9H9-2B3 (DD) em comparação com o construto de 9H9-2B3 original (não modificado).

RESUMO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1 3C2 V _H CDR1	GYYSWS
SEQ ID NO: 2 3C2 V _H CDR2	YNYYSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO: 3 3C2 V _H CDR3	YPLIRGAFDY
SEQ ID NO: 4 3C2 V _L CDR1	RSSQNLLHTNGYNYLD
SEQ ID NO: 5 3C2 V _L CDR2	LGSNRAS
SEQ ID NO: 6 3C2 V _L CDR3	MQALQTPLT
SEQ ID NO: 7 2B3 V _H CDR1	GYYIH
SEQ ID NO: 8 2B3 V _H CDR2	WINPNSGGTNSAQKFQD
SEQ ID NO: 9 2B3 V _H CDR3	DRLVLPWFGEIFPDAFDI
SEQ ID NO: 10 2B3 V _L CDR1	RASQSIRSNLA
SEQ ID NO: 11 2B3 V _L CDR2	GASTRAT
SEQ ID NO: 12 2B3 V _L CDR3	QQYNNWPLT
SEQ ID NO: 13 3C2 V _H - com sequência- sinal	MKHLWFCLLLVAAPRWVLSQAQLQESGPGLVKP SETLSLTCTVSTGSISGYYSWSWIRQPPGKGLEWI GYNYYSGSTNYPNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLN SVTAADTAVYYCARYPLIRGAFDYWGQGTLLTVS S
SEQ ID NO: 14 3C2 V _L - com sequência- sinal	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQNLLHTNGYNYLDWYLQKPGQ SPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO: 15 2B3 V _H - com sequência- sinal	MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCASGYTFTGYIHWVRQAPGQGLEW MGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRVTSINTAYM ELSRLRSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEVIFPD AFDIWGQT
SEQ ID NO: 16 2B3 V _L - com sequência- sinal	MEAPAQLLFLLLLWLPDSTGEIVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSENFA VYYCQQYNNWPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 17 3C2 V _H - sem sequência- sinal	QAQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSTGSISGYW SWIRQPPGKGLEWIGYNYYSGSTNYNPSLKSRT ISIDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARYPLIRGA FDYWGQGTTLVTVSS
SEQ ID NO: 18 3C2 V _L - sem sequência- sinal	DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQNLLHTNGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP LTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 19 2B3 V _H - sem sequência- sinal	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYI HWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQ DRVTITRVTSINTAYMELSRLRSDDDTAVYFCARD RLVLPWFGEIFPDADFIDWGQGTTLVTVSS
SEQ ID NO: 20 2B3 V _L - sem sequência- sinal	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSENFVYYCQQYNNWPLTFGGGT KVEIK
SEQ ID NO: 21 Sequência de DNA 3C2 V _H - com sequência- sinal	ATGAAACATCTGTGGTTCTGCCTTCTCCTGGTG GCAGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGCGCA GCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAG CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGT CTCTACTGGCTCCATCAGTGGTTACTACTGGAG CTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTG GAGTGGATTGGGTATAATTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTC ACCATATCAATAGACACGTCCAAGAACCAGTTC TCCCTGAAGCTGAATTCTGTGACCGCTGCGGA CACGGCCGTATATTACTGTGCGAGATATCCTCT GATTCGGGGAGCTTTTACTACTGGGGCCAGG GAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 22 Sequência de DNA 3C2 V _L - com sequência- sinal	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCT AATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATAT TGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGT CACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGTA GGTCTAGTCAGAACCTCCTGCATACTAATGGCT ACAACATTTTGATTGGTACCTGCAGAAGCCAG GGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGT CTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTC AGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTG AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGG GGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCC GCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA TCAAA
SEQ ID NO: 23 Sequência de DNA 2B3 V _H -	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGT GGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTG CAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA

com sequência- sinal	GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG CTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATAC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT GAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGG TGGCACAACCTCTGCACAGAAGTTTCAGGACAG GGTCACCATCACAGGGTTCACGTCCATCAACA CAGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCT GACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGA TCGGCTCGTATTACCATGGTTCGGGGAAATATT CCCAGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGA CATTGGTCACCGTCTCTTCA
SEQ ID NO: 24 Sequência de DNA 2B3 V _L - com sequência- sinal	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCT GCTACTCTGGCTCCCAGATTCCAAGGAGAAAT AGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC AGGGCCAGTCAGAGTATTAGGAGCAACTTAGC CTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCC ACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGTCTGAAAATTTTGAGTTTATTACT GTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCTCACTTTCG GCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
SEQ ID NO: 25 Sequência de DNA 3C2 V _H - sem sequência- sinal	CAGGCGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGAC TGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACC TGCACTGTCTCTACTGGCTCCATCAGTGGTTAC TACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAA GGGACTGGAGTGGATTGGGTATAATTATTACAG TGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGA GTCGAGTCACCATATCAATAGACACGTCCAAGA ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAATTCTGTGACCG CTGCGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGA TATCCTCTGATTTCGGGGAGCTTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 26 Sequência de DNA 3C2 V _L - sem sequência- sinal	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCAAGTCTCCCTG CCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTC CTGTAGGTCTAGTCAGAACCTCCTGCATACTAA TGGCTACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAA GCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTT GGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT GTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAA ACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA

SEQ ID NO: 27 Sequência de DNA 2B3 V _H - sem sequência- sinal	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGT GAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT GCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACT ATATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA GGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAA CAGTGGTGGCACAACCTCTGCACAGAAGTTTCA GGACAGGGTCACCATCACCAGGGTCACGTCCA TCAACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTG AGATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGC GAGAGATCGGCTCGTATTACCATGGTTCCGGGG AAATATTCCCAGATGCTTTTGATATCTGGGGCC AAGGGACATTGGTTCACCGTCTCTTCA
SEQ ID NO: 28 Sequência de DNA 2B3 V _L - sem sequência- sinal	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCT GTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGGAGCAAC TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGC TCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAG GGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGTCTGAAAATTTTGCAGTTTAT TACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCTCACT TTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
SEQ ID NO: 29 7H7 V _H CDR1	TSWMS
SEQ ID NO: 30 7H7 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 31 7H7 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 32 7H7 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 33 7H7 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO: 34 7H7 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 35 1B3 V _H CDR1	TSWMS
SEQ ID NO: 36 1B3 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 37 1B3 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 38 1B3 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 39 1B3 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO: 40 1B3 V _L CDR3	QQYYGSSRT

SEQ ID NO: 41 3B6 V _H CDR1	TYWMS
SEQ ID NO: 42 3B6 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 43 3B6 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 44 3B6 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 45 3B6 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO: 46 3B6 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 47 8B1 V _H CDR1	THWMS
SEQ ID NO: 48 8B1 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 49 8B1 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 50 8B1 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 51 8B1 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO: 52 8B1 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 53 4A3 V _H CDR1	SSWMS
SEQ ID NO: 54 4A3 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 55 4A3 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 56 4A3 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 57 4A3 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO: 58 4A3 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 59 9H9 V _H CDR1	TYWMS
SEQ ID NO: 60 9H9 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 61 9H9 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 62 9H9 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 63	KASSLES

9H9 V _L CDR2	
SEQ ID NO: 64 9H9 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 65 7H7 V _H - com sequência- sinal	MELGLSXVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGGTISTWMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRVEDTAIYYCARDRPVAGASALWGQGT TVSS
SEQ ID NO: 66 7H7 V _L - com sequência- sinal	MRVPAQLLGLLLLWLP GAKCDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQ SISGWLA WYQQKQ GKAPKLLI YKASSLESGVPSR FSGSGSG SGTEFTLT ISSSLQP DDFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO: 67 1B3 V _H - com sequência- sinal	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQ P GSLRLSCAASGGTISTWMSWVRQAPGKGLE WVANIKQDGSEKYYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRVEDTAMYYCARDRPVAGASALWGQG TLVTVSS
SEQ ID NO: 68 1B3 V _L - com sequência- sinal	MRVPAQLLGLLLLWLP GAKCDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQ SISGWLA WYQQKQ GKAPKLLI YKASSLESGVPSR FSGSGSG SGTEFTLT ISSSLQP DDFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO: 69 3B6 V _H - com sequência- sinal	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQ P GSLRLSCAASGGTTSTYWMSWVRQAPGKGLE WVANIKQDGSEKYYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLN LQMNSLRVEDTAIYYCARDRPVAGASALWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 70 3B6 V _L - com sequência- sinal	MRVPAQLLGLLLLWLP GAKCDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQ SISGWLA WYQQKQ GKAPKLLI YKASSLESGVPSR FSGSGSG SGTEFTLT ISSSLQP DDFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO: 71 8B1 V _H - com sequência- sinal	MELGLSWVFLVAILEGVKCEVRLVESGGGLVQ P GSLRLSCAASGDIISTHWMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNTLRVEDTAIYYCTRDRPVAGASALWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 72 8B1 V _L - com sequência- sinal	MRVPAQLLGLLLLWLP GAKCDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQ SISGWLA WYQQKQ GKAPKLLI YKASSLESGVPLR FSGSGSG SGTEFTLT ISSSLQP DDFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO: 73 4A3 V _H - com sequência- sinal	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQ P GSLRLSCAASGGIISSSWMSWVRQAPGKGLEW VANIKQDGSEKYYYVDSVKGRFTISRDNANKDLLYLQ MNSLRVEDTALYYCARDRPVAGASALWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 74	MRVPAQLLGLLLLWLP GAKCDIQMTQSPSTLSAS VGDRVTITCRASQ SISGWLA WYQQKQ GKAPKLLI

4A3 V _L - com sequência-sinal	YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFF ATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO: 75 9H9 V _H - com sequência-sinal	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVRQAPGKGLEW VANIQDQSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLRVEDTAMYYCARD RPVAGASALWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 76 9H9 V _L - com sequência-sinal	MRVPAQLLGLLLLWLP GAKCDIQMTQSPSTLSAS VGDRVITICRASQSISGWLA WYQQKPGKAPKLLI YKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFF ATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO: 77 7H7 V _H - sem sequência-sinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTISTSW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRVEDTAIYYCARD RPVAGASALWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 78 7H7 V _L - sem sequência-sinal	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISGWLA WYQQKQKGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK
SEQ ID NO: 79 1B3 V _H - sem sequência-sinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTISTSW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARD RPVAGASALWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 80 1B3 V _L - sem sequência-sinal	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISGWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPDFFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIK
SEQ ID NO: 81 3B6 V _H - sem sequência-sinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTISTYW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVK GRFTISRDNANKNSLNLQMNSLRVEDTAIYYCARD RPVAGASALWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 82 3B6 V _L - sem sequência-sinal	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISGWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPDFFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIK
SEQ ID NO: 83 8B1 V _H - sem sequência-sinal	EVRLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIISTHWM SWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVKGR FTISRDNANKNSLYLQMNTLRVEDTAIYYCTRDRPV AGASALWGQGT LTVSS
SEQ ID NO: 84 8B1 V _L - sem sequência-sinal	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISGWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPLRFSGSGSG TEFTLTISLQPDFFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIK
SEQ ID NO: 85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISSSWM SWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVKGR

4A3 V _H - sem sequência-sinal	FTISRDNAKDLLYLQMNSLRVEDTALYYCARD RP VAGASALWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 86 4A3 V _L - sem sequência-sinal	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIK
SEQ ID NO: 87 9H9 V _H - sem sequência-sinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWM SWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARD RP VAGASALWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 88 9H9 V _L - sem sequência-sinal	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIK
SEQ ID NO: 89 Sequência de DNA 7H7 V _H - com sequência-sinal	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGNGTTTTCTTGTT GCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAA CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGAGGCACCATTAGTACCTCTTGGATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA ATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTG AGAAATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAC TGTATTTGCAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGG ACACGGCTATATATTACTGTGCGAGAGATCGTC CAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 90 Sequência de DNA 7H7 V _L - com sequência-sinal	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCCAGTCAGAGTATAAGTGGCTGGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACAAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 91 Sequência de DNA 1B3 V _H - com sequência-sinal	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTT GCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAA CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGAGGCACCATTAGTACCTCTTGGATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA

	ATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTG AGAAATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAC TGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAAG ACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGATCGTC CAGTGGCTGGTGCGTCGGCCCTCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 92 Sequência de DNA 1B3 V _L - com sequência- sinal	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 93 Sequência de DNA 3B6 V _H - com sequência- sinal	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTT GCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAA CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGAGGCACAACCAGTACCTATTGGATGAGC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG AATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGT GAGAAATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCA CTGAATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAG GACACGGCTATATATTACTGTGCGAGAGATCGT CCAGTGGCTGGTGCGTCGGCCCTCTGGGGCC AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 94 Sequência de DNA 3B6 V _L - com sequência- sinal	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 95	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTT GCTATTTTAGAAGGTGTCAAGTGTGAGGTGCGA

Sequência de DNA 8B1 V _H - com sequência-sinal	CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGAGACATAATTAGTACCCATTGGATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA ATGGGTGGCCAACATAAAACAAGATGGAAGTG AGAAGTATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAC TGTATTTGCAAATGAACACCCTGAGAGTCGAGG ACACGGCTATATATTACTGTACGAGAGATCGTC CAGTGGCTGGTGCGTCGGCCCTCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 96 Sequência de DNA 8B1 V _L - com sequência-sinal	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAG TGGGGTCCCATTAAGGTTTACGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 97 Sequência de DNA 4A3 V _H - com sequência-sinal	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTT GCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAA CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC GGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGAGGCATCATTAGTTCCTCTTGGATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA ATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTG AGAAATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGACTTAC TGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGG ACACGGCTTTATATTACTGTGCGAGAGATCGTC CAGTGGCTGGTGCGTCGGCCCTCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCT
SEQ ID NO: 98 Sequência de DNA 4A3 V _L - com sequência-sinal	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC

	AACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 99 Sequência de DNA 9H9 V _H - com sequência- sinal	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTT GCTATTTTAGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAA CTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGAGGCATCATTAGTACCTATTGGATGAGCT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA ATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTG AGAAATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCAC TGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGG ACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGATCGTC CAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 100 Sequência de DNA 9H9 V _L - com sequência- sinal	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCT GCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCC GGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA GCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGAT CTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCC AACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCC AAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 101 Sequência de DNA 7H7 V _H - sem sequência- sinal	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGAGGCACCATAGTACCTCTT GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAG ATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTATATATTACTGTGCG AGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCT CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
SEQ ID NO: 102 Sequência de DNA 7H7 V _L - sem sequência- sinal	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCCAGTCAGAGTATAAGTGGCTGGTT GGCCTGGTATCAGCAGAAACAAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAG AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC

	AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTAC TGCCAACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTT GGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 103 Sequência de DNA 1B3 V _H - sem sequência- sinal	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGAGGCACCATTAGTACCTCTT GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAG ATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAAGACACGGCTATGTATTACTGTGCG AGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCGTCGGCCCT CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
SEQ ID NO: 104 Sequência de DNA 1B3 V _L - sem sequência- sinal	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTT GGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAG AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTAC TGCCAACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTT GGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 105 Sequência de DNA 3B6 V _H - sem sequência- sinal	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGAGGCACAACCAGTACCTAT TGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAG ATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCACTGAATTTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTATATATTACTGTGCG AGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCGTCGGCCCT CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
SEQ ID NO: 106 Sequência de DNA 3B6 V _L - sem sequência- sinal	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTT GGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAG AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTAC

	TGCCAACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTG GGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 107 Sequência de DNA 8B1 V _H - sem sequência- sinal	GAGGTGCGACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGAGACATAATTAGTACCCAT TGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAACAAG ATGGAAGTGAGAAGTATTATGTGGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACACCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACG AGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCT CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
SEQ ID NO: 108 Sequência de DNA 8B1 V _L - sem sequência- sinal	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTT GGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAG AAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTAC TGCCAACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTG GGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 109 Sequência de DNA 4A3 V _H - sem sequência- sinal	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTCCAGCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGAGGCATCATTAGTTCCTCTT GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAG ATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAAGACTTACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTTTATATTACTGTGCG AGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCT CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CT
SEQ ID NO: 110 Sequência de DNA 4A3 V _L - sem sequência- sinal	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTT GGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAG AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTAC TGCCAACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTG GGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA

SEQ ID NO: 111 Sequência de DNA 9H9 V _H - sem sequência- sinal	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGAGGCATCATTAGTACCTATT GGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAG ATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGACTCTGTGA AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTG AGAGTCGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGC GAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCC TCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
SEQ ID NO: 112 Sequência de DNA 9H9 V _L - sem sequência- sinal	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGCTGGTT GGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAG AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACAGAATTCATCTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTAC TGCCAACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTT GGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 113 3C2 V _H CDR1 (Chothia)	TGSISGY
SEQ ID NO: 114 3C2 V _H CDR2 (Chothia)	YYSGS
SEQ ID NO: 115 3C2 V _H CDR3 (Chothia)	YPLIRGAFDY
SEQ ID NO: 116 3C2 V _L CDR1 (Chothia)	RSSQNLLHTNGYNYLD
SEQ ID NO: 117 3C2 V _L CDR2 (Chothia)	LGSNRAS
SEQ ID NO: 118 3C2 V _L CDR3 (Chothia)	MQALQTPLT

SEQ ID NO: 119 2B3 V _H CDR1 (Chothia)	GYTFTGY
SEQ ID NO: 120 2B3 V _H CDR2 (Chothia)	NPNSGG
SEQ ID NO: 121 2B3 V _H CDR3 (Chothia)	DRLVLPWFGEIFPDAFDI
SEQ ID NO: 122 2B3 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSIRSNLA
SEQ ID NO: 123 2B3 V _L CDR2 (Chothia)	GASTRAT
SEQ ID NO: 124 2B3 V _L CDR3 (Chothia)	QQYNNWPLT
SEQ ID NO: 125 7H7 V _H CDR1 (Chothia)	GGTISTS
SEQ ID NO: 126 7H7 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 127 7H7 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 128 7H7 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO: 129 7H7 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO: 130	QQYYGSSRT

7H7 V _L CDR3 (Chothia)	
SEQ ID NO: 131 1B3 V _H CDR1 (Chothia)	GGTOSTS
SEQ ID NO: 132 1B3 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 133 1B3 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 134 1B3 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 135 1B3 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO: 136 1B3 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 137 3B6 V _H CDR1 (Chothia)	GGTTSTY
SEQ ID NO: 138 3B6 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 139 3B6 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 140 3B6 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 141 3B6 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES

SEQ ID NO: 142 3B6 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 143 8B1 V _H CDR1 (Chothia)	GDIISTH
SEQ ID NO: 144 8B1 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 145 8B1 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 146 8B1 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 147 8B1 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO: 148 8B1 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 149 4A3 V _H CDR1 (Chothia)	GGIISS
SEQ ID NO: 150 4A3 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 151 4A3 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 152 4A3 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSIGWLA
SEQ ID NO: 153	KASSLES

4A3 V _L CDR2 (Chothia)	
SEQ ID NO: 154 4A3 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 155 9H9 V _H CDR1 (Chothia)	GGIISTY
SEQ ID NO: 156 9H9 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO: 157 9H9 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO: 158 9H9 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO: 159 9H9 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO: 160 9H9 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 161 Sequência consenso de anticorpo de V _H CDR1 de anticorpo de CD27 (Kabat)	GYW(W,I)(S,H)
SEQ ID NO: 162 Sequência consenso de V _H CDR2 de anticorpo de CD27 (Kabat)	(-,W)(Y,I)N(Y,P)(Y,N)SG(S,G)TN(Y, S)(N,A)(P,Q)(S,K)(L,F)(K,Q) (S,D)

SEQ ID NO: 163 Sequência consenso de V _H CDR3 de anticorpo de CD27 (Kabat)	(-,D)(-,R)(-,L)(-,V)(-,L)(-,P)(-,W)(-,F)(-,G)(-,E)(-,I)(- Y,F)P(L,-)(I,-)(R,-)(G,D)AFD(Y,I)
SEQ ID NO: 164 Sequência consenso de V _L CDR1 de anticorpo de CD27 (Kabat)	R(S, A)SQ(-,S)(-,I)(-,R)(-,S)NL(L,A)(H,-)(T,-)(N,-)(G,-)(Y,-) (N,-)(Y,-)(L,-)(D,-)
SEQ ID NO: 165 Sequência consenso de V _L CDR2 de anticorpo de CD27 (Kabat)	(L,G)(G,A)S(N,T)RA(S,T)
SEQ ID NO: 166 Sequência consenso de V _L CDR3 de anticorpo de CD27 (Kabat)	(M,Q)Q(A,Y)(L,N)(Q,N)(T,W)PLT
SEQ ID NO: 167 Sequência consenso de V _H CDR1 de anticorpo de PD-L1 (Kabat)	(T,S)(S,Y,H)WMS
SEQ ID NO: 168 Sequência consenso de V _H CDR2 de anticorpo de PD-L1 (Kabat)	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO: 169 Sequência consenso de	DRPVAGASAL

V _H CDR3 de anticorpo de PD-L1 (Kabat)	
SEQ ID NO: 170 Sequência consenso de V _L CDR1 de anticorpo de PD-L1 (Kabat)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO: 171 Sequência consenso de V _L CR2 de anticorpo de PD-L1 (Kabat)	KASSLES
SEQ ID NO: 172 Sequência consenso de V _L CDR3 de anticorpo de PD-L1 (Kabat)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO: 173 Sequência de aminoácidos de CD27 (nº. de Acesso AAH12160.1)	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYW AQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCI PGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVNCTITA NAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSS QALSPHPQPTHLPYVSEMLEARAGHMQLADF RQLPARTLSTHWPPQSRSLCSDFFIRILVIFSGMFL VFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSC CPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
SEQ ID NO: 174 Sequência de aminoácidos de CD70 (nº. de Acesso NP_001243)	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICL VVCIRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGP QQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHR DGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPA SRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTP LARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP
SEQ ID NO: 175 Sequência de aminoácidos de PD1 (nº. de Acesso NP_005009)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPW NPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVT QLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKA QIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQF QTLVVGWVGGLLGSLLVLLVWVLAVICSRAARGTIG ARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKT

	PEPPVPCVPEQTEYATIVFSPSGMGTSSPARRGSA DGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
SEQ ID NO: 176 Sequência de aminoácidos de PD-L1 (precursor de isoforma b) (nº. de Acesso NP_00125463 5)	MRIFAVFIFMTYWHLNAPYNKINQRILVVDPTSE HELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNS KREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH TAE LVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTF IFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
SEQ ID NO: 177 2B3 V _H (modificado)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>GYI</u> <u>HWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQ</u> <u>DRVTITRDT</u> SINTAYMELSRLRSDDTAVYFCARD <u>DR</u> <u>LVLPWFGEIFPDAFDI</u> WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 178 2B3 V _L (modificado)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSIRSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTRAT</u> GIPARFSGSGSG TEFTLTISLQSE <u>D</u> FAVYYC <u>QQYNNWPLT</u> FGGGT KVEIK
SEQ ID NO: 179 A sequência de cadeia pesada de 9H9-2B3 completa (CDX-527) foi a seguinte (com a sequência de região constante de IgG1 mostrada em negrito)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWM SWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARDRP VAGASALWGQGLTVTVSS <u>ASTKGPSVFPLAPSS</u> <u>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u> <u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI</u> <u>CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP</u> <u>ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV</u> <u>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST</u> <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> <u>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD</u> <u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u> <u>HNHYTQKSLSLSPGKGSSSGGGGSEIVMTQSPAT</u> LSVSPGERATLSC <u>RASQSIRSNLA</u> WYQQKPGQA PRLLIY <u>GASTRAT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQ SE <u>N</u> FAVYYC <u>QQYNNWPLT</u> FG <u>C</u> GTKVEIK <u>GGGGS</u> <u>GGGGSGGGSGGGGS</u> QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTGYI <u>HWVRQAPGQGLEWMG</u> WINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRVTSINTAYMELS RLRSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEIFPDAFDIWG QGTLTVTVSS

SEQ ID NO: 180 A sequência de cadeia leve de 9H9-2B3 (CDX-527) foi a seguinte (com a sequência de região constante mostrada em negrito)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 181 A sequência completa de cadeia pesada de 9H9-2B3 (DD) foi a seguinte (com a sequência de “estrutura principal” constante de IgG1 mostrada em negrito)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWM SWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARDRP VAGASALWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GSSGGGGSEIVMTQSPAT LSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SEDFAVYYCQQYNNWPLTFGCGTKVEIKGGGGS GGGGSGGGGSGGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTGYYIHWRQAPGQCLEWMG WINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRDTSINTAYMEL SRLRSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEIFPDAFDIW GQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 182 A sequência de cadeia leve de 9H9-2B3 (DD) foi a seguinte (com a região constante	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGSWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSSRTFGQGT NVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

mostrada em negrito)	
SEQ ID NO: 183 ECD de huCD27	TPAPKSCPER HYWAQGKLCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDPCIPGVS FSPDHHTRPH CESCRHCNSG LLVRNCTITA <u>NAECACRNGW</u> QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPTHLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRS LCSSD
SEQ ID NO: 184 ECD de huCD27 mutado	TPAPKSCPER HYWAQGKLCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDPCIPGVS FSPDHHTRPH CESCRHCNSG LLVRNCTITA <u>NAECSCAAAW</u> QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPTHLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRS LCSSD
SEQ ID NO: 185 Sequência de NA de domínio variável 9H9x2B3 (DD)	GAAGTGCAACTGGTGGAGTCGGGTGGTGGACT CGTG CAGCCCGGCGGATCCCTGAGACTCTCTT GTGCCGCATCGGGCGGCATTATTAGCACTTACT GGATGTCATGGGTCAGACAGGCACCGGGAAAG GGCTTGGAATGGGTGGCGAATATCAAGCAGGA TGGATCCGAGAAGTACTACGTGGACTCCGTGA AGGGCAGATTACCATTTCCCGGGACAACGCC AAGAACTCGCTCTATCTGCAAATGAACTCGTTG CGGGTGGAAGATACTGCCATGTACTACTGCGC CCGGGACCGGCCTGTGGCCGGGGCGTCGGCC CTCTGGGGCCAGGGCACTCTGGTCACCGTGTCTCT
SEQ ID NO: 186 Sequência de NA de domínio scFv 9H9x2B3 (DD) (sequências de conector e ligante são mostradas em negrito)	<u>GGCTCCAGCGGGGGTGGCGGTTCC</u> GAGATCG TGATGACTCAGAGCCCGGCAACCCTGTCCGTG TCTCCGGGGGAGCGGGCTACTCTTTCCTGCCG GGCATCCCAGTCCATCCGGTCGAACCTTGCGT GGTACCAACAGAAGCCTGGACAGGCGCCCCGC CTGCTGATCTACGGGGCGTCGACTAGGGCCAC CGGCATCCCGGCCCGCTTCTCCGGGTCCGGAT CCGGCACCGAATTACCCCTCACCATCTCGAGC CTGCAGTCCGAAAACCTTCGCCGTCTACTACTGC CAGCAGTACAACAAGTGGCCGCTGACATTCGG ATGCGGAACCAAAGTGGAATCAAG <u>GGCGGCG</u> <u>GCGGATCCGGCGGTGGCGGCAGCGGCGGTG</u> <u>GAGGATCCGGTGGCGGCGGTTCA</u> CAAGTGCA GCTGGTGAGTCAGGCGCCGAAGTCAAGAAGC CCGGGGCCAGCGTGAAAGTCAGCTGCAAGGCT

	TCCGGATACACCTTCACGGGTTACTACATTAC TGGGTTTCGCCAAGCGCCCGGGCAGTGTCTGGA GTGGATGGGATGGATCAACCCTAACTCGGGGG GAACCAACTCGGCCCAAAGTTCCAGGACCGG GTCACCATTACAAGAGTCACGTCCATCAACACT GCCTACATGGAGTTGAGCCGGCTGCGATCAGA CGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCGAGGGACC GCCTCGTCCTCCCGTGGTTTGGAGAGATCTTC CCGGATGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGGAC CCTCGTGACTGTGTCCAGC
SEQ ID NO: 187 Sequência de NA do domínio variável de cadeia leve 9H9x2B3 (DD)	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCCACCCT TTCCGCGAGCGTCGGCGACAGAGTGACCATT CTTGTCGGGCCTCGCAAAGCATCTCCGGCTGG CTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCTGGAAAGGC CCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCCTCATCCCT GGAGTCCGGAGTGCCTTCACGCTTTTCGGGGA GCGGATCGGGGACTGAGTTCACCCTCACCATT TCCTCCCTGCAACCCGACGATTTGCGGACATAC TACTGCCAGCAGTACTACGGTTCCTCGCGCAC GTTCCGGACAGGGCACTAACGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO:187)

EQUIVALENTES

[0380] Os versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das modalidades específicas da invenção descritas no presente documento. Pretende-se que tais equivalentes sejam abrangidos pelas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1, em que:

(i) o domínio de ligação anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

(ii) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende:

a. uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da sequência consenso: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO:167) ou modificações de sequência conservativas da mesma;

b. uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 168 ou modificações de sequência conservativas da mesma;

c. uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 169 ou modificações de sequência conservativas da mesma;

d. uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 170 ou modificações de sequência conservativas da mesma;

e. uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 171 ou modificações de sequência conservativas da mesma; e

f. uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 172 ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

2. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1, em que:

(i) o domínio de ligação anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente; ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e

(ii) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas; ou

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

3. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18.

4. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20.

5. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3

de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

6. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

7. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

8. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

9. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 44, 45 e 46, respectivamente ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

10. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-

PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

11. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

12. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

13. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

14. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

15. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

16. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

17. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente; ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

18. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

19. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

20. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

21. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

22. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

23. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência

conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

24. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

25. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

26. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

27. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

28. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

29. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia

leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

30. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável da cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78.

31. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

32. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80.

33. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

34. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82.

35. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

36. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

37. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

38. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86.

39. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOS: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

40. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a. o domínio de ligação anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

b. o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

41. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que (a) o domínio de ligação anti-PD-L1 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano ou (b) o domínio de ligação anti-CD27 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano.

42. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que (a) o domínio de ligação anti-CD27 está ligado ao C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-PD-L1 ou (b) o domínio de ligação anti-PD-L1 está ligado ao C-terminal da cadeia pesada do domínio de ligação anti-CD27.

43. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-CD27 é um scFv ou (b) o domínio de ligação anti-PD-L1 é um scFv.

44. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 e o domínio de ligação anti-CD27 são geneticamente fundidos.

45. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 e o domínio de ligação anti-CD27 são quimicamente conjugados.

46. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

c. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

d. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

e. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; ou

f. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável da cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

g. um domínio constante de IgG1 humano;.

47. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; ou

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; ou

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88; e

g. um domínio constante de IgG1 humano.

48. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve,

conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e um domínio constante de IgG1 humano.

49. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 e um domínio constante de IgG1 humano.

50. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e um domínio constante de IgG1 humano.

51. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 ligado a um scFv anti-CD27, em que:

(i) o scFv anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 e um domínio constante de IgG1 humano.

52. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, ou

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

c. um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende:

a. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

b. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

c. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

d. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

e. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; ou

f. CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

53. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; ou

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20; e

c. um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; ou

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

54. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

55. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84.

56. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

57. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-CD27 ligado a um scFv anti-PD-L1, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19, uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 e um domínio constante de IgG1 humano; e

(ii) o scFv anti-PD-L1 compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

58. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo é caracterizado pelo fato de que se liga a um ou mais resíduos dentre os resíduos de aminoácidos 85 a 89, do domínio extracelular (ECD) da CD27 humana (SEQ ID NO: 183).

59. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo é caracterizado pelo fato de que se liga ao ECD do tipo selvagem de CD27 humana (SEQ ID NO: 183), mas não se liga a uma versão mutada do ECD do tipo selvagem de CD27 humana com as seguintes substituições de aminoácidos: A85S, R87A, N88A e G89A.

60. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve,

conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

61. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

62. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

63. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

64. Anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 63, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tem uma ou mais das seguintes características:

- a. induz ou aumenta uma resposta imunológica mediada por células T;
- b. bloqueia a ligação de sCD70 a CD27;
- c. se liga à CD27 humana com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10^{-9} M ou menos, ou alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10^{+9} M⁻¹ ou mais;
- d. induz citotoxicidade mediada por complemento específico (CDC) de células que expressam CD27;

e. induz lise específica de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam CD27;

f. induz ou aumenta as respostas imunológicas específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;

g. induz ou aumenta as respostas imunológicas de TH1 específicas para antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;

h. induz ou aumenta a proliferação ou ativação *in vivo* de células T específicas para antígeno em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno; e/ou

i. induz ou aumenta a atividade de células T quando combinado com ativação de TCR simultânea, separada ou sequencial.

65. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 63, ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1.

66. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

b. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende a região variável de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e

CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

c. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

d. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

e. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

f. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

67. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 65 ou 66, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;

b. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;

c. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;

d. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;

e. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; e

f. uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

68. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 64 a 66, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-PD-L1 é um scFv.

69. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

70. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

71. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

72. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

73. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

74. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

75. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2

e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

76. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

77. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

78. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

79. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

80. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região

variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88 ou sequências pelo menos 95% idênticas às mesmas.

81. Anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 80, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, tem uma ou mais das seguintes características:

- a. bloqueia a ligação de PD1 a PD-L1;
- b. induz a ativação da via de NFAT; e/ou
- c. induz uma resposta mista de linfócitos.

82. Construto biespecífico caracterizado pelo fato de que compreende o fragmento de ligação a antígeno anti-PD-L1, de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 80, ligado a um domínio de ligação anti-CD27.

83. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-CD27 é selecionado a partir do grupo que consiste em:

- a. um anticorpo anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e
- b. um anticorpo anti-CD27 que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

84. Construto biespecífico, de acordo com a reivindicação 82 ou 83, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-CD27 é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18; e

b. um anticorpo anti-CD27 que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20.

85. Construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 84, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação anti-CD27 compreende ainda um domínio constante de IgG1 humano.

86. Anticorpo multiespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 com um domínio Fc, em que pelo menos um domínio de ligação ao anticorpo anti-CD27 está ligado ao domínio Fc.

87. Anticorpo multiespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 com um domínio Fc, em que pelo menos um peptídeo scFv anti-CD27 está ligado ao domínio Fc.

88. Anticorpo multiespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 com um domínio Fc, em que um peptídeo scFv anti-CD27 está ligado a um terminal carboxi de pelo menos uma das cadeias pesadas de anticorpo.

89. Anticorpo multiespecífico caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo anti-PD-L1 que tem um domínio Fc, em que um peptídeo scFv anti-CD27 está ligado ao terminal carboxi de uma das cadeias pesadas de anticorpo e um outro peptídeo scFv está ligado ao terminal carboxi da outra cadeia pesada.

90. Composição caracterizada pelo fato de que compreende o construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, 65 a 68 e 82 a 85 ou o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 64

e 69 a 81, ou o anticorpo multiespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89 e um carreador farmacologicamente aceitável.

91. Kit caracterizado pelo fato de que compreende o construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, 66 a 69 e 82 a 85, o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 64 e 69 a 81, o anticorpo multiespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, ou a composição, de acordo com a reivindicação 90, e instruções de uso.

92. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma região variável de anticorpo, em que a região variável de anticorpo compreende a sequência de aminoácidos representada na SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

93. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 ou 112.

94. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve de um anticorpo, em que as regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos representadas nas SEQ ID NOs: 17 e 18, SEQ ID NOs: 19 e 20, SEQ ID NOs: 77 e 78, SEQ ID NOs: 79 e 80, SEQ ID NOs: 81 e 82, SEQ ID NOs: 83 e 84, SEQ ID NOs: 85 e 86 ou SEQ ID NOs: 87 e 88, respectivamente.

95. Molécula de ácido nucleico caracterizada pelo fato de que codifica o construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, 65 a 68 e 82 a 85.

96. Molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92 a 95, caracterizada pelo fato de estar sob a forma de um vetor de expressão.

97. Molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 92 a 96, caracterizada pelo fato de estar sob a forma de um vetor de expressão que expressa o construto biespecífico quando administrado a um sujeito *in vivo*.

98. Método para estimular a atividade de células T caracterizado pelo fato de que compreende colocar as células T em contato com o construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, 65 a 68 e 82 a 85, o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 64 e 69 a 81, o anticorpo multiespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, ou a composição, de acordo com a reivindicação 90.

99. Método para induzir ou aumentar uma resposta imunológica em um sujeito caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao sujeito o construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, 65 a 68 e 82 a 85, o anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 64 e 69 a 81, o anticorpo multiespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, ou a composição, de acordo com a reivindicação 90, em uma quantidade eficaz para induzir ou aumentar uma resposta imunológica no sujeito.

100. Método para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método é caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao sujeito o construto biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, 65 a 68 e 82 a 85, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 64 e 69 a 81, o anticorpo multiespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 89, ou a composição, de acordo com a reivindicação 88 em uma quantidade eficaz para tratar a condição ou doença.

101. Método para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método é caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao sujeito um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a

antígeno do mesmo, em combinação com um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 1, 2 e 3, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 4, 5 e 6, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e

b. um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável da cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 32, 33 e 34, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

b. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende a região variável de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 35, 36 e 37, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e

CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 38, 39 e 40, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

c. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 41, 42 e 43, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

d. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 47, 48 e 49, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente; ou modificações de sequência conservativas das mesmas;

e. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 53, 54 e 55, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 56, 57 e 58, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas; e

f. anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia pesada, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 59, 60 e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e CDR1, CDR2 e CDR3 de região variável de cadeia leve, conforme estabelecido nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

102. Método para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método é caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao sujeito um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, em combinação com um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, em que:

(i) o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 18 e

b. um anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende a SEQ ID NO: 19 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 20 ou sequências; e

(ii) o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 77 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 78;

b. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 80;

c. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 81 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 82;

d. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que

compreende a SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 84;

e. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 85 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 86; e

f. um anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 87 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 88.

103. Método, de acordo com a reivindicação 101 ou 102, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados separadamente.

104. Método, de acordo com a reivindicação 101 ou 102, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CD27, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, e o anticorpo anti-PD-L1, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, são administrados juntos.

105. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 104, caracterizado pelo fato de que o sujeito sofre de uma condição ou doença em que deseja-se a estimulação de uma resposta imunológica.

106. Método, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença é câncer.

107. Método, de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer colorretal, câncer de ovário, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e glioblastoma.

108. Anticorpo biespecífico tetravalente caracterizado pelo fato de que compreende:

- i) duas cadeias pesadas de IgG;
- ii) duas cadeias leves; e
- iii) dois domínios Fv de cadeia simples (scFv);

em que as duas cadeias pesadas de IgG e duas cadeias leves formam uma fração de IgG que se liga especificamente a PD-L1 humana e em que os dois domínios scFv se ligam cada um especificamente à CD27 humana e em que cada domínio scFv está conectado ao resíduo de C-terminal de uma das cadeias pesadas de IgG por uma sequência de conector.

109. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que as cadeias pesadas de IgG são cadeias pesadas de IgG1.

110. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com a reivindicação 108 ou reivindicação 109, caracterizado pelo fato de que as cadeias leves são cadeias leves kappa.

111. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 110, caracterizado pelo fato de que cada domínio scFv tem uma ordem de estrutura de i) N-terminal-domínio pesado variável-ligante-domínio leve variável-C-terminal ou ii) N-terminal-domínio leve variável-ligante-domínio pesado variável-C-terminal, e em que em cada caso o ligante compreende uma sequência de aminoácidos de $(G_4S)_m$; em que m é um número inteiro de pelo menos 3.

112. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 111, caracterizado pelo fato de que a sequência de conector compreende uma sequência de aminoácidos de G_4S .

113. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 112, caracterizado pelo fato de que a sequência de conector compreende uma sequência de aminoácidos de GS_2G_4S .

114. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 113, caracterizado pelo fato de que a sequência de ligante compreende uma sequência de aminoácidos de $(G_4S)_4$.

115. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 114, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos domínios scFv anti-CD27 compreende domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 7, 8 e 9, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve que têm as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 10, 11 e 12, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

116. Anticorpo biespecífico tetravalente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 115, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das cadeias pesadas de IgG anti-PD-L1 compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada com as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 59, 60 , e 61, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas, e pelo menos uma das cadeias leves anti-PD-L1 compreende os domínios de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve com as sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 62, 63 e 64, respectivamente, ou modificações de sequência conservativas das mesmas.

117. Composição caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo tetravalente biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 116, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

118. Kit caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo tetravalente biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 116, ou a composição, de acordo com a reivindicação 117, e instruções de uso.

119. Método para estimular a atividade de células T caracterizado pelo fato de que compreende colocar as células T em contato com o anticorpo tetravalente biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 116, ou a composição, de acordo com a reivindicação 117.

120. Método para induzir ou aumentar uma resposta imunológica em um sujeito caracterizado pelo fato de que compreende

administrar ao sujeito o anticorpo tetravalente biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 116, ou a composição, de acordo com a reivindicação 117, em uma quantidade eficaz para induzir ou aumentar uma resposta imunológica no sujeito.

121. Método para tratar uma condição ou doença em um sujeito, em que o método é caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao sujeito o anticorpo tetravalente biespecífico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 108 a 116, ou a composição, de acordo com a reivindicação 117, em uma quantidade eficaz para tratar a condição ou doença.

122. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 119 a 121, caracterizado pelo fato de que o sujeito sofre de uma condição ou doença em que se deseja a estimulação de uma resposta imunológica.

123. Método, de acordo com a reivindicação 122, caracterizado pelo fato de que a condição ou doença é câncer.

124. Método, de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer colorretal, câncer de ovário, carcinoma de células renais, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e glioblastoma.

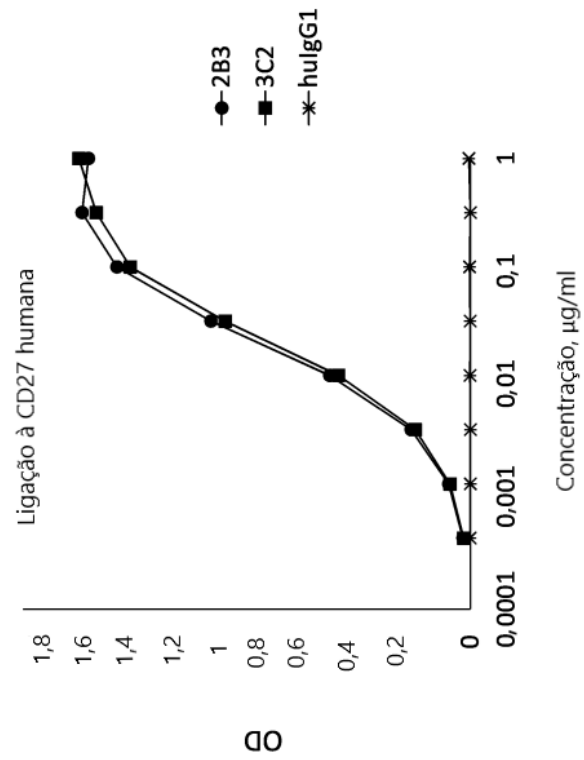
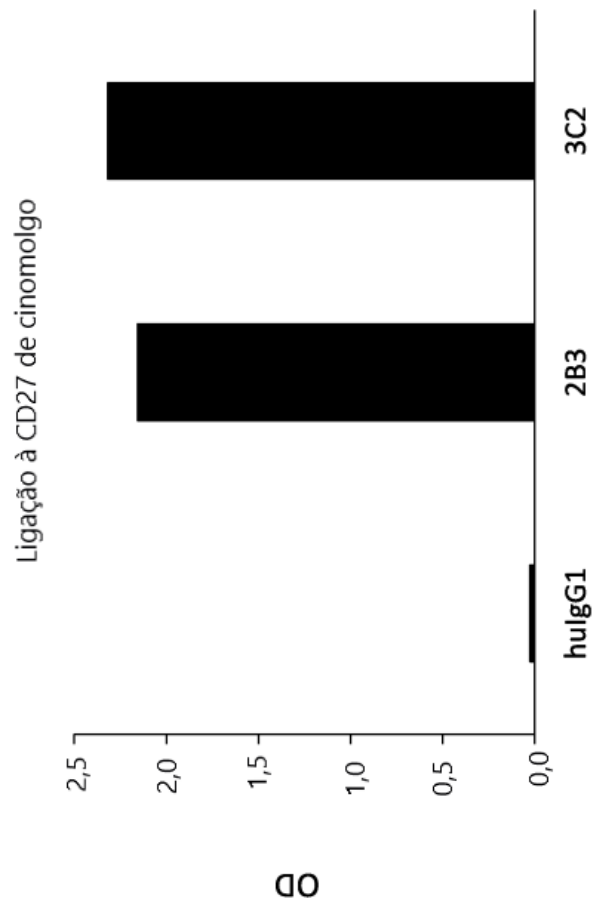
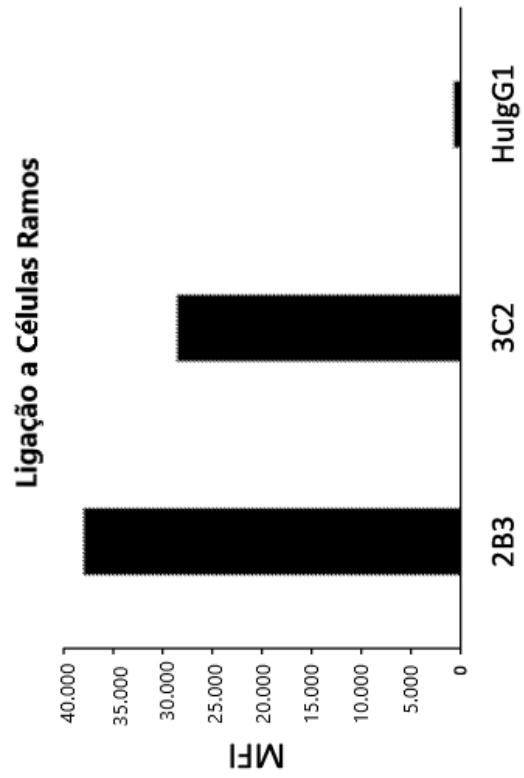
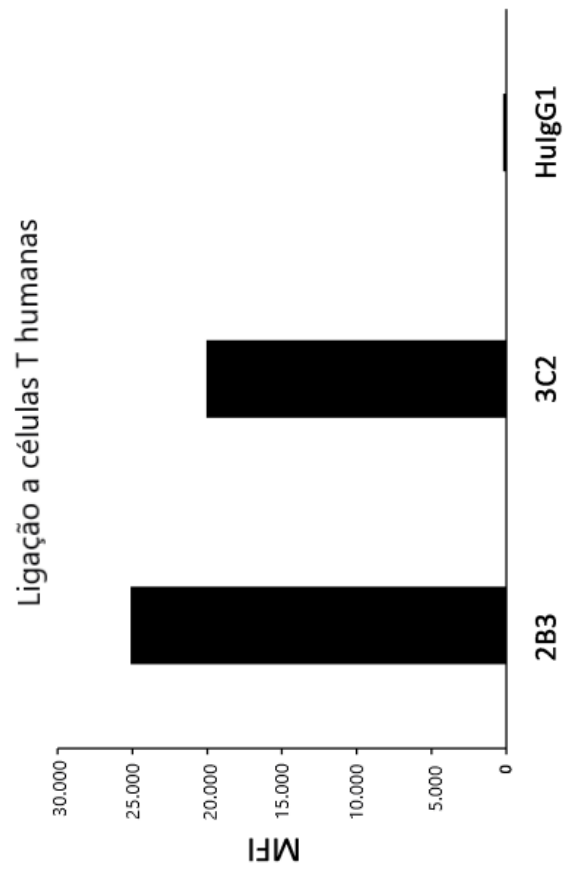
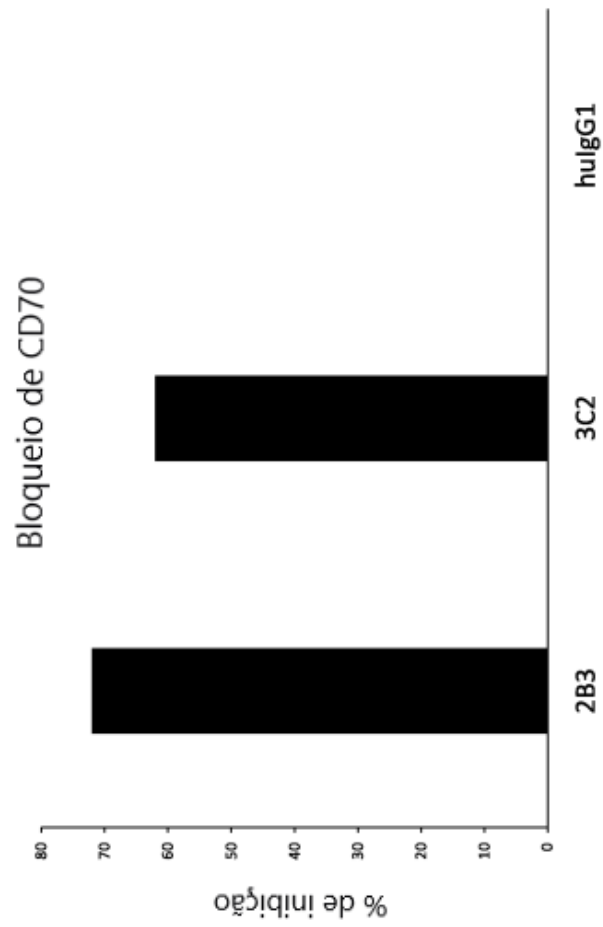


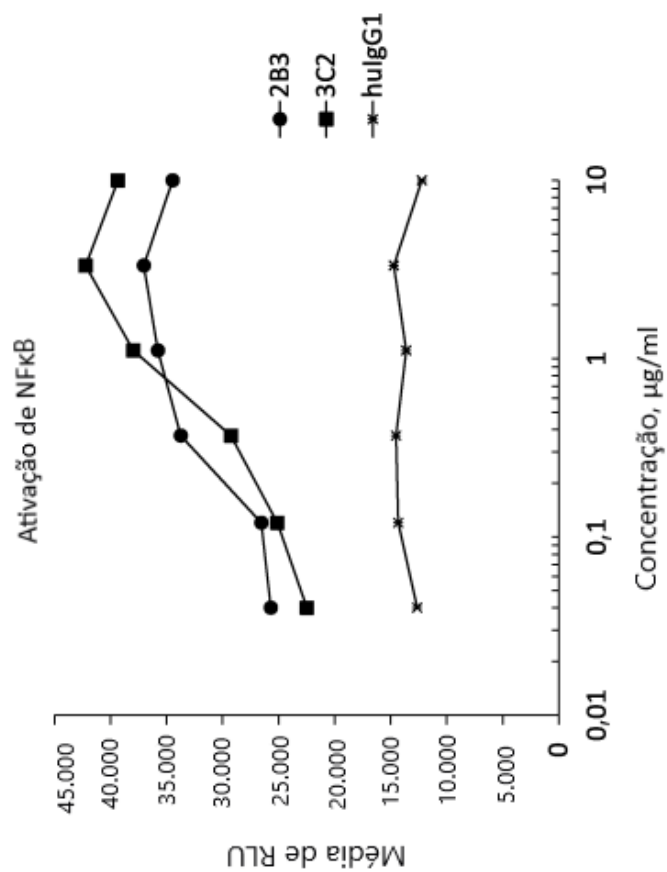
FIG. 1

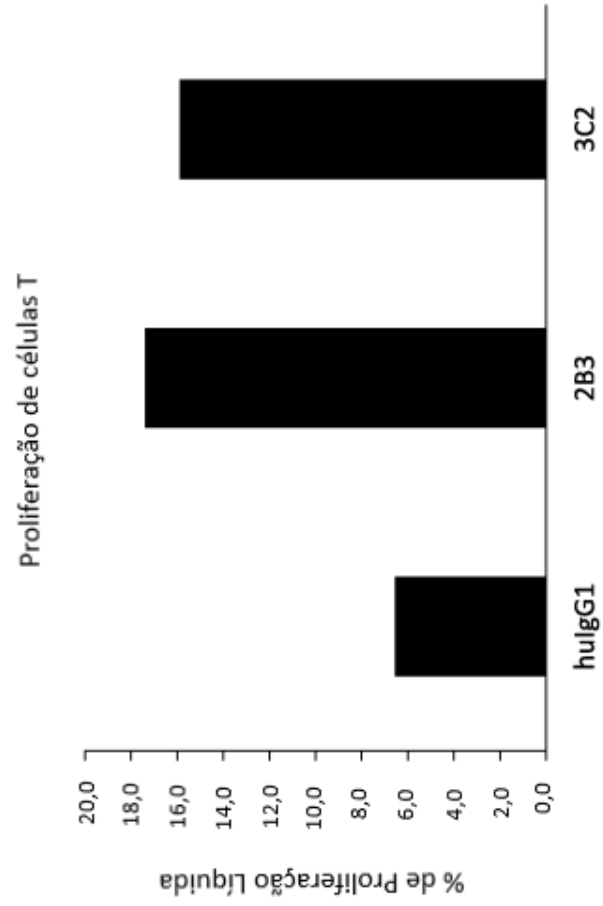
**FIG. 2**

**FIG. 3**

**FIG. 4**

**FIG. 5**

**FIG. 6**

**FIG. 7**

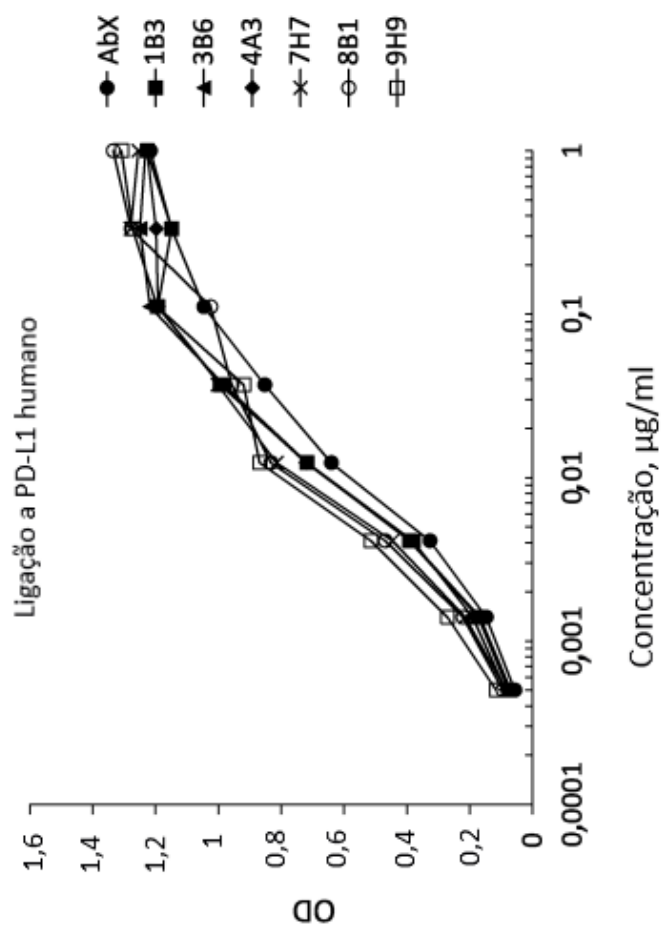
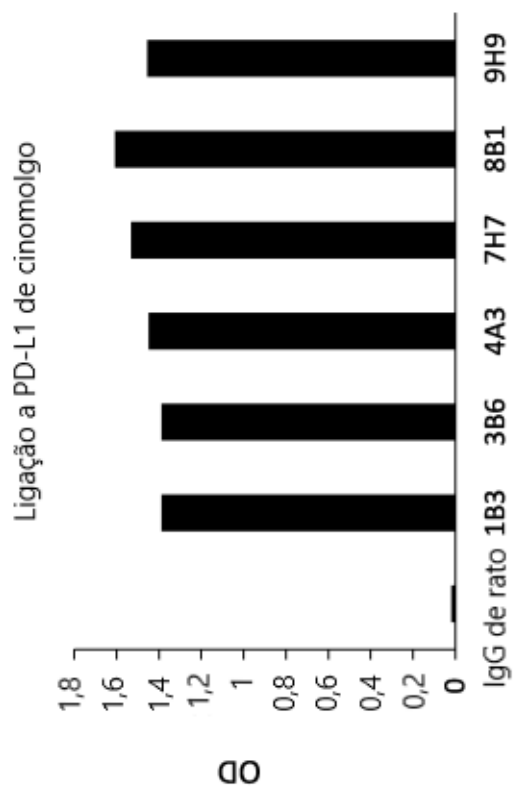


FIG. 8

**FIG. 9**

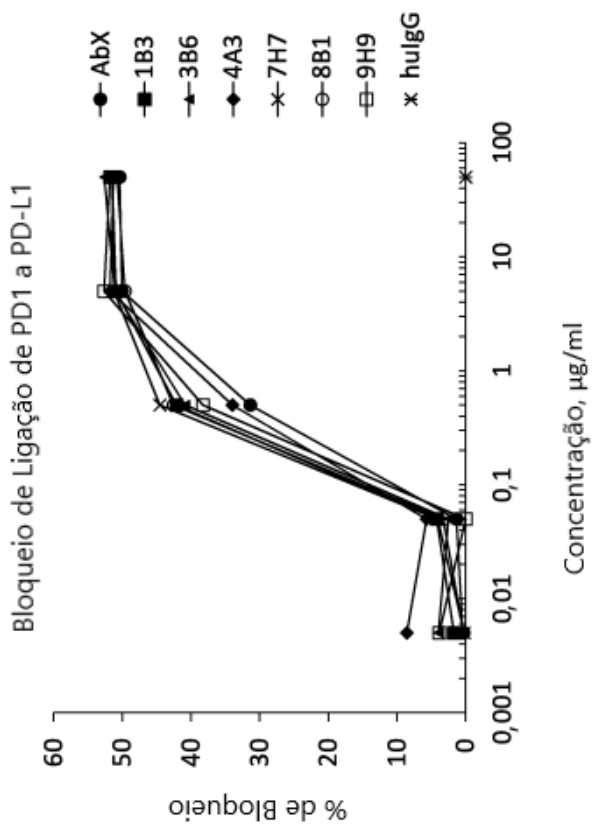


FIG. 10

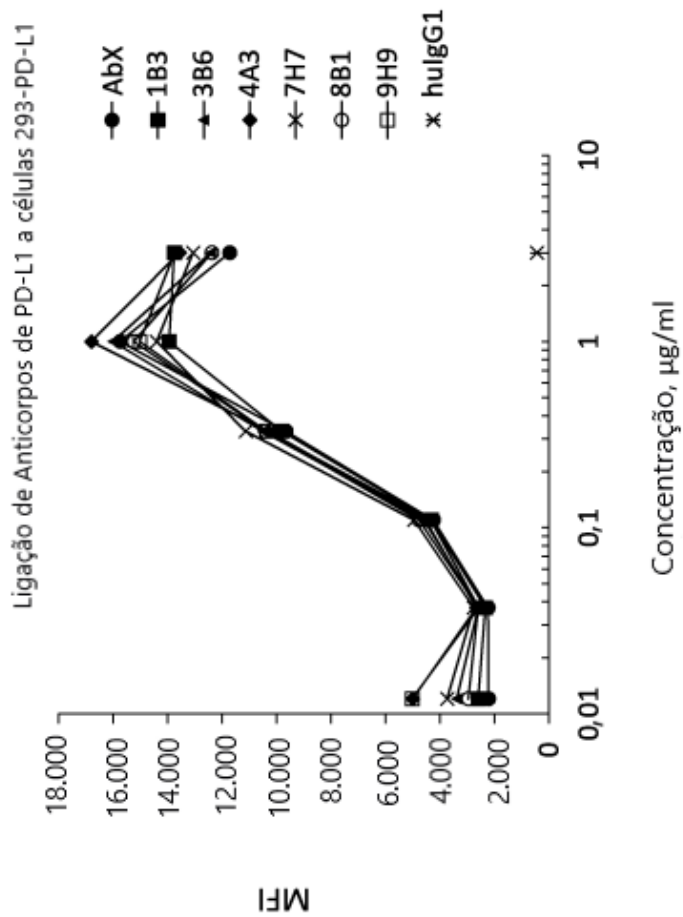


FIG. 11

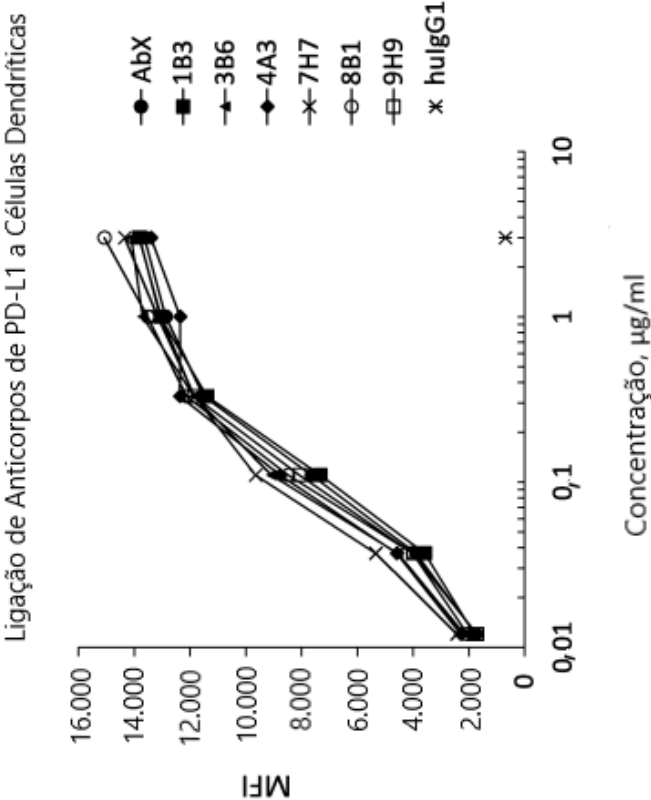


FIG. 12

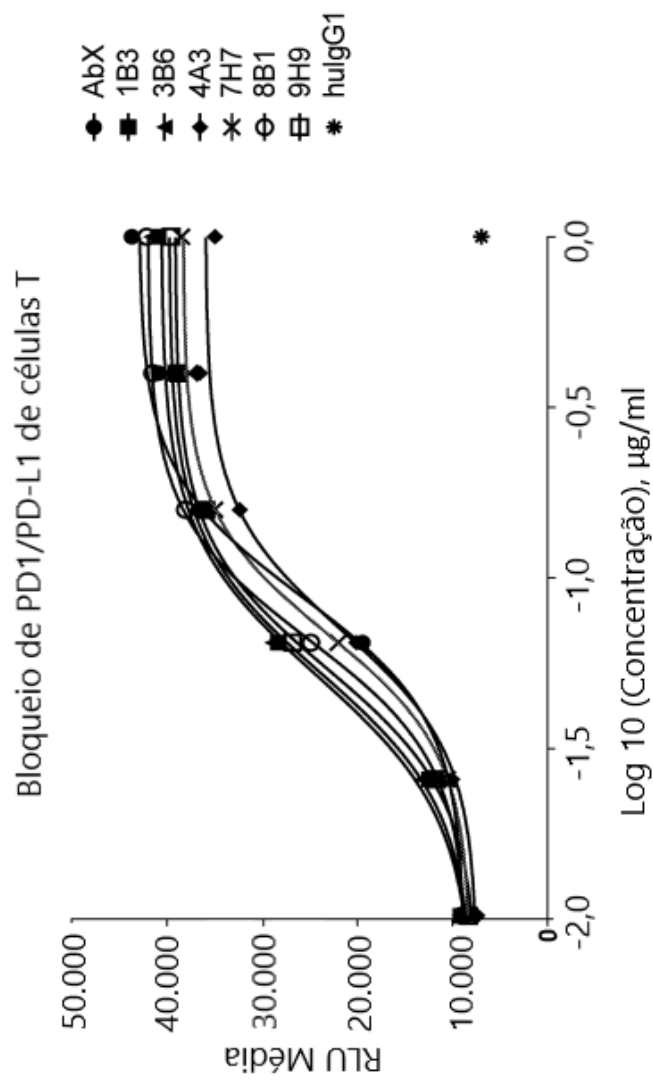


FIG. 13

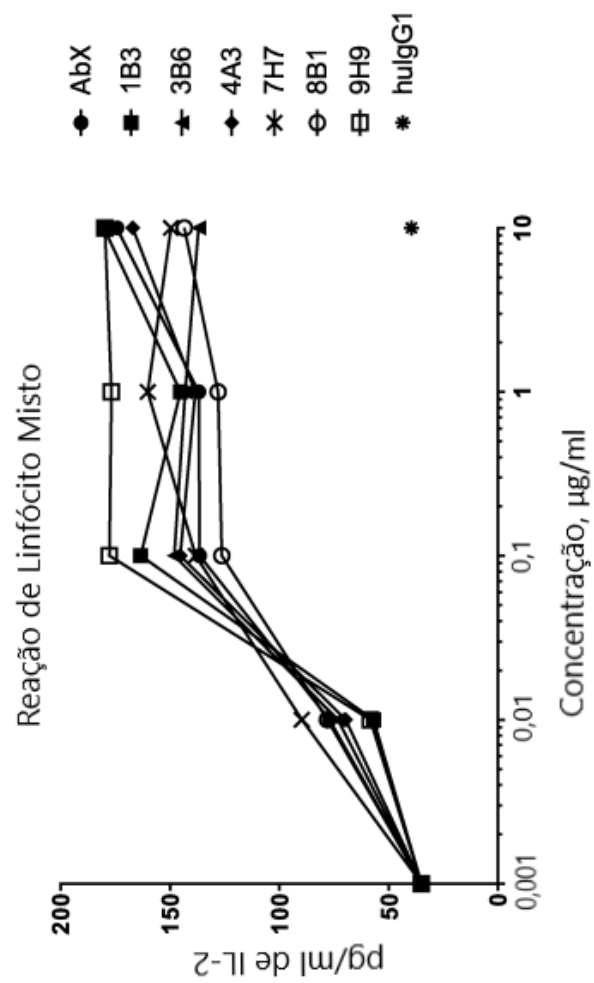


FIG. 14

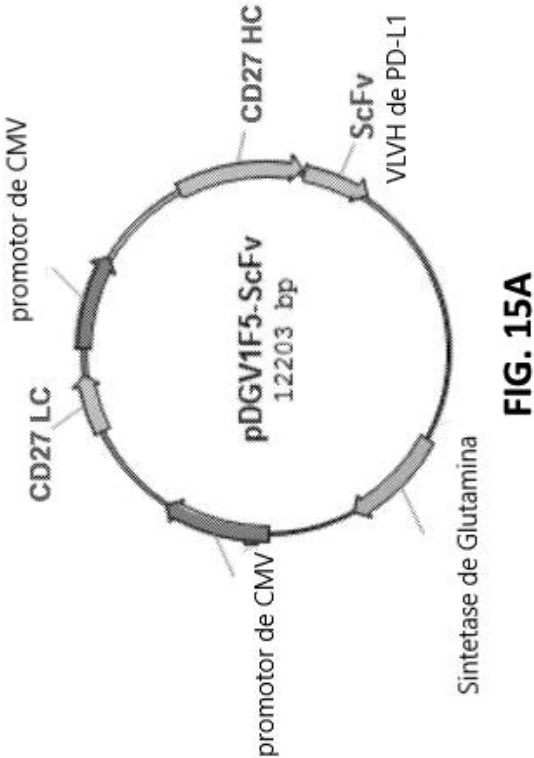


FIG. 15A

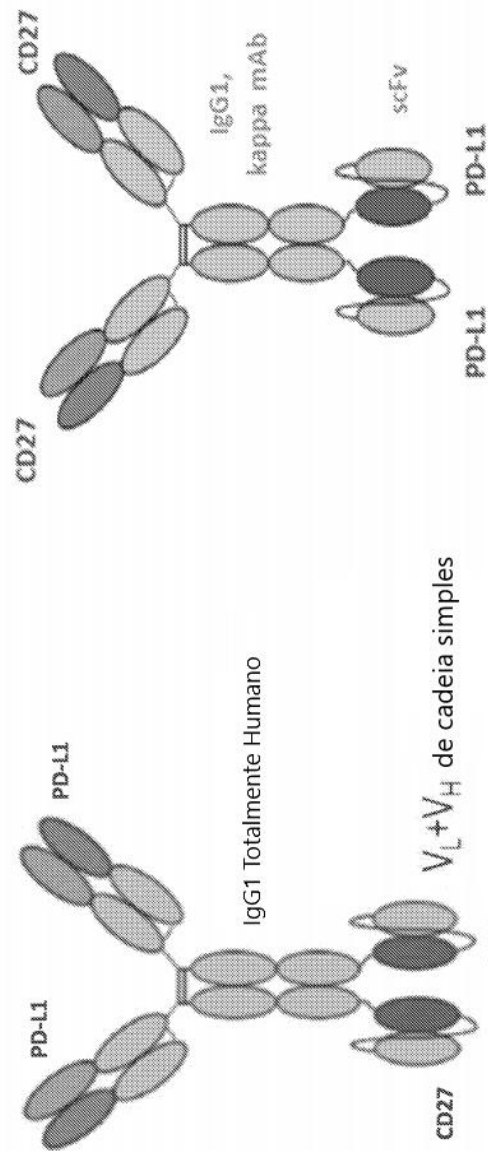
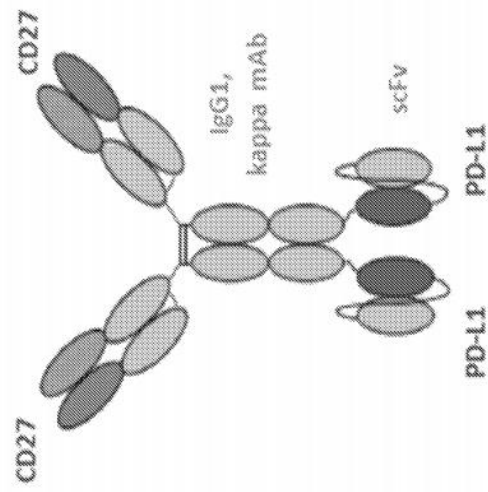


FIG. 15C



BsAb	Anti-CD27 mAb	Anti-PD-L1 mAb	Reatividade com PD-L1 de camundongo
CD27xAbX	1F5	AbX	Sim
CD27x8B1	2B3	8B1	Não
CD27x9H9	2B3	9H9	Não

FIG. 15D

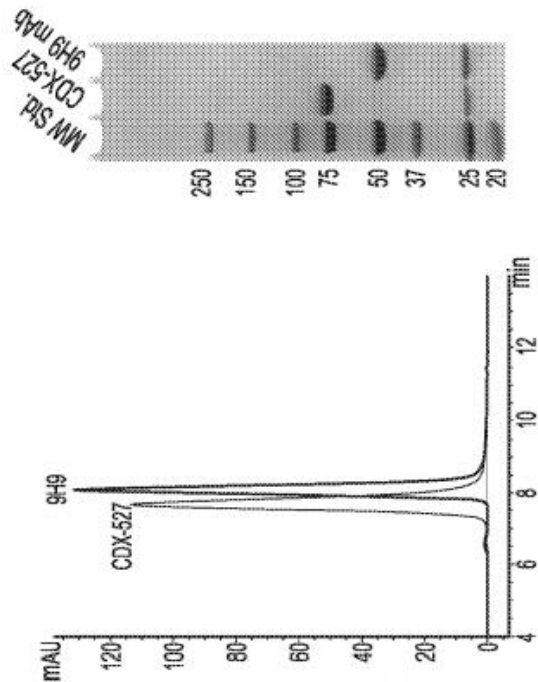


FIG. 15E

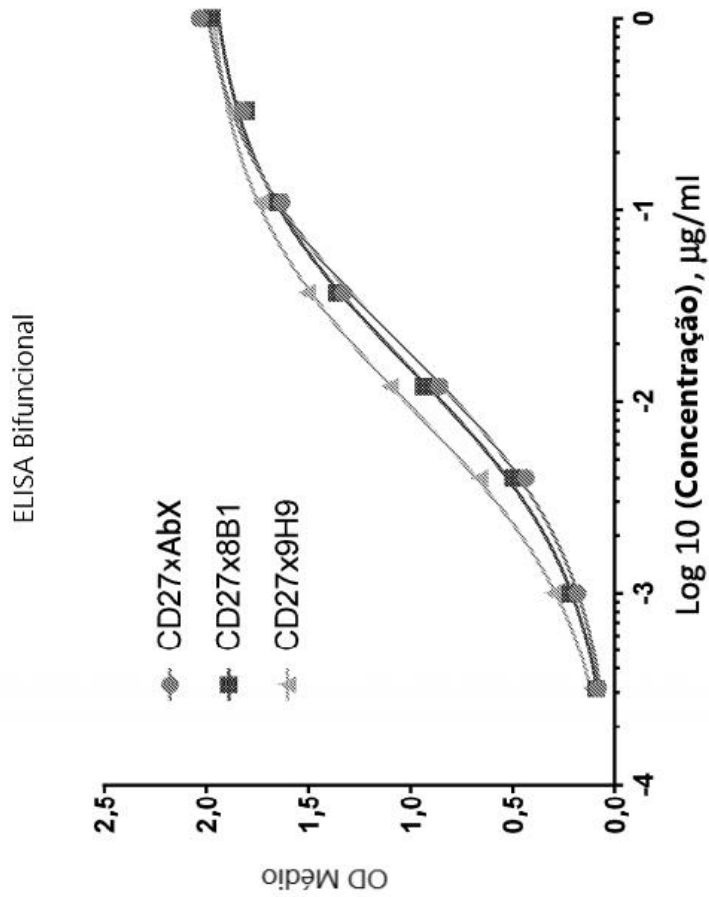


FIG. 16

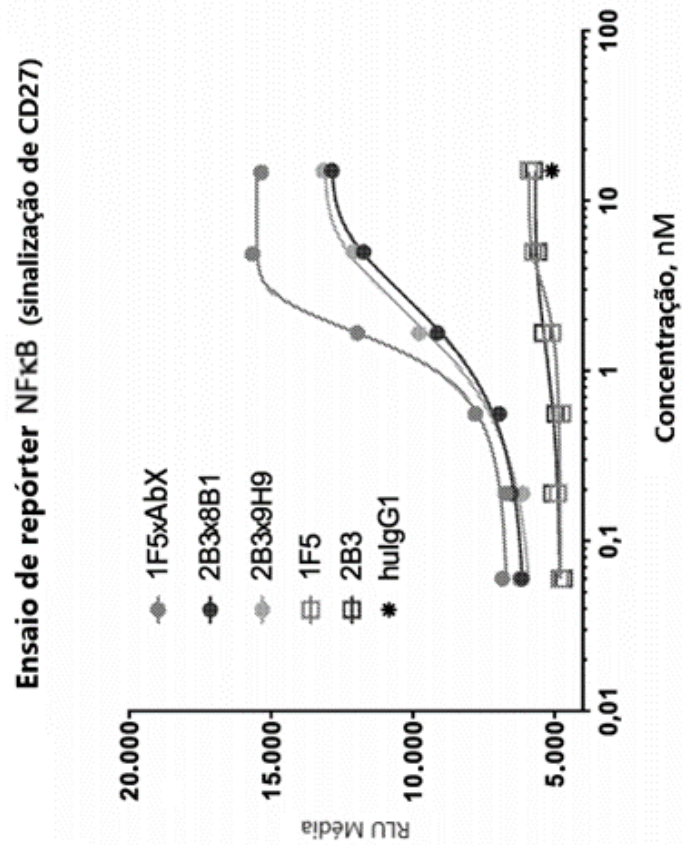


FIG. 17

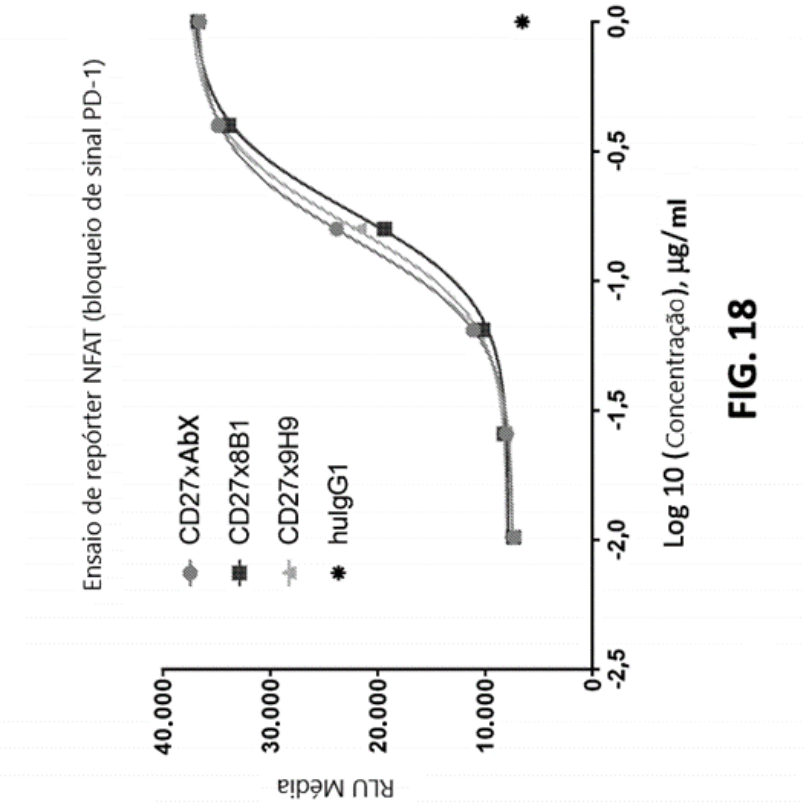


FIG. 18

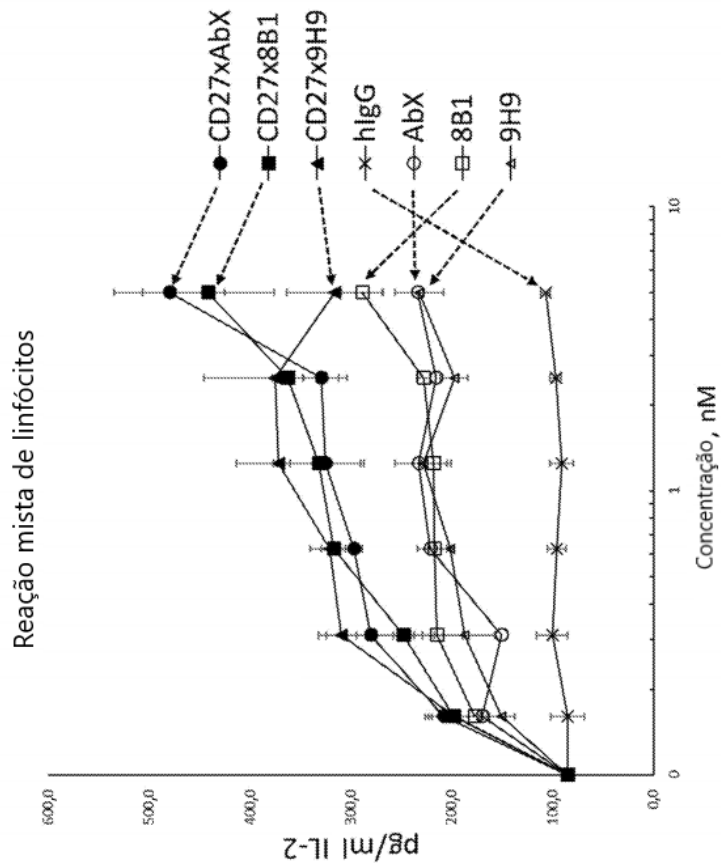


FIG. 19

Resposta de célula CD8 T

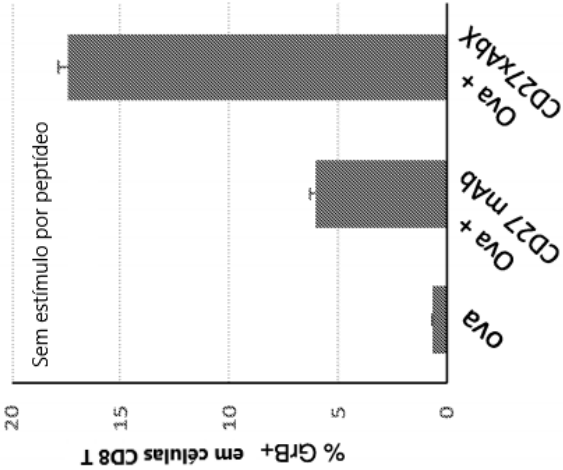


FIG. 20B

Resposta antígeno específica de célula CD8 T

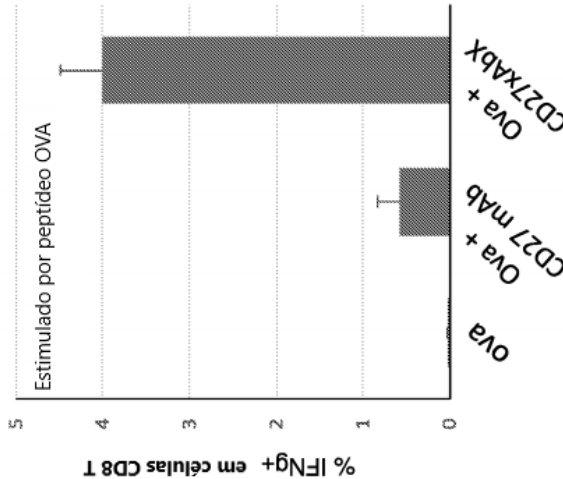


FIG. 20A

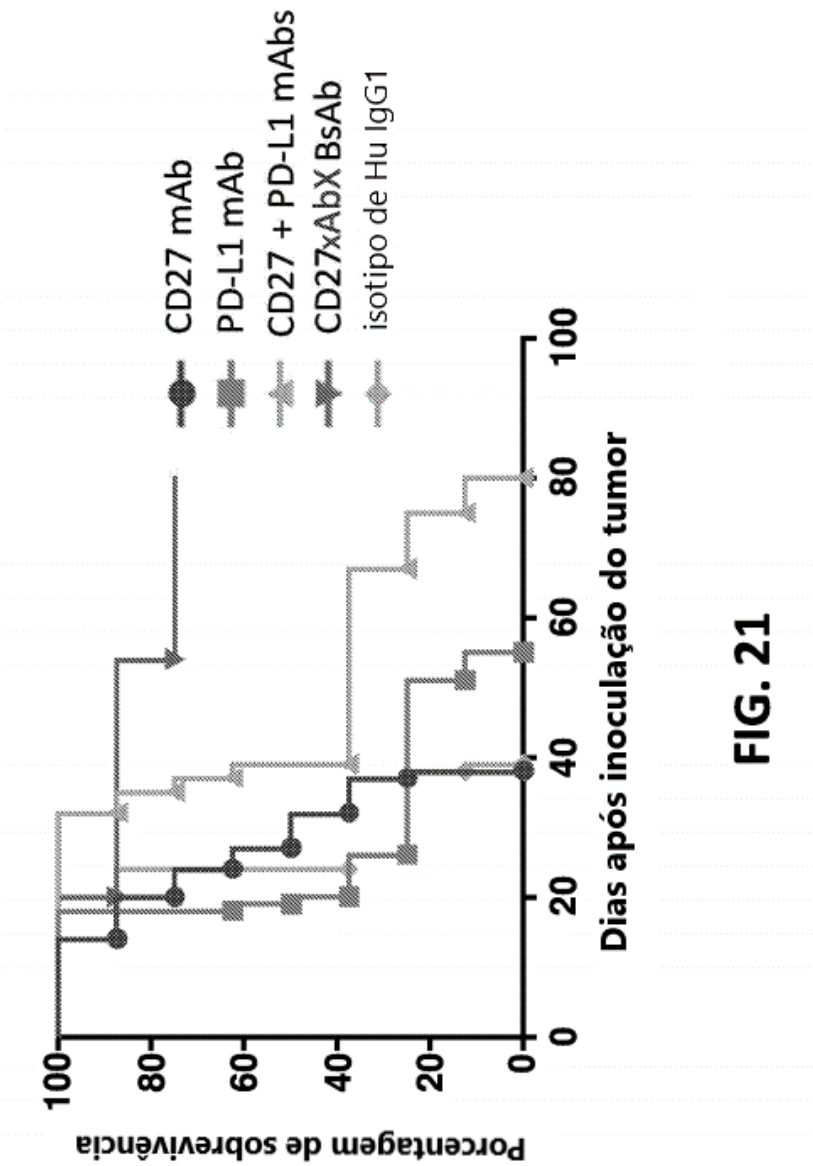
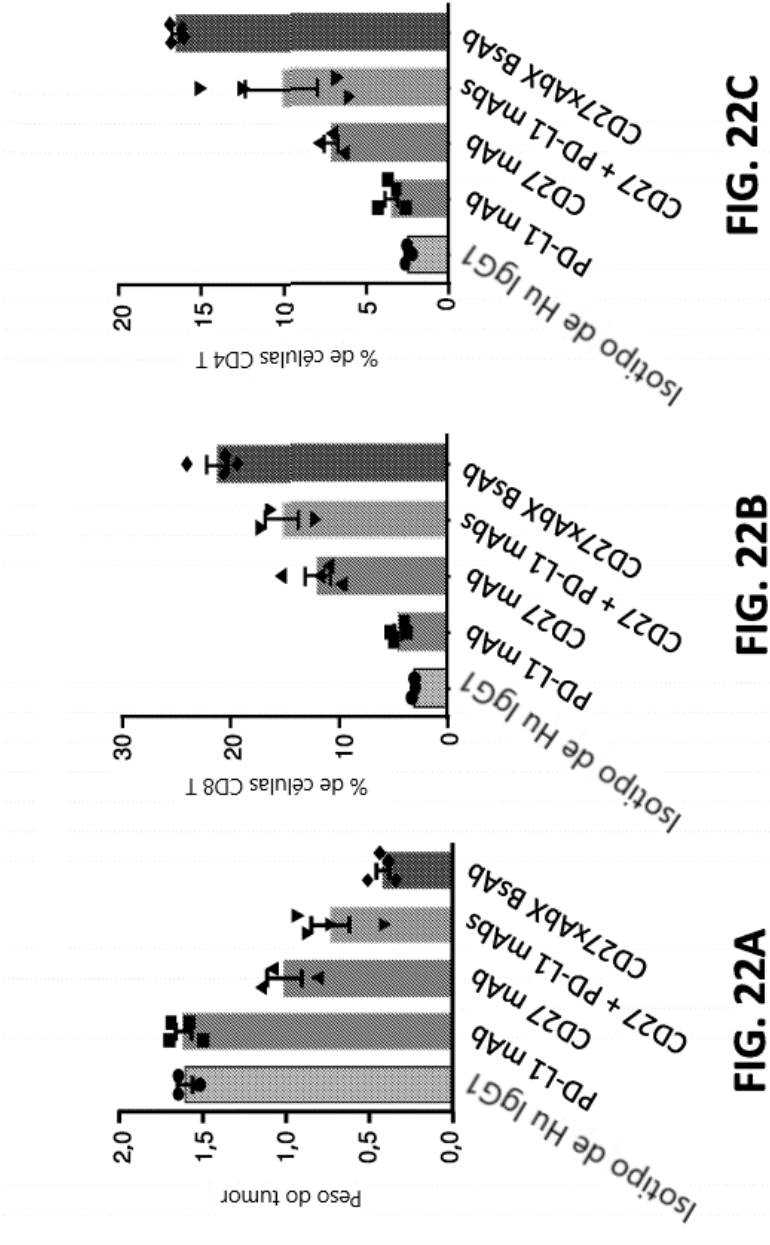
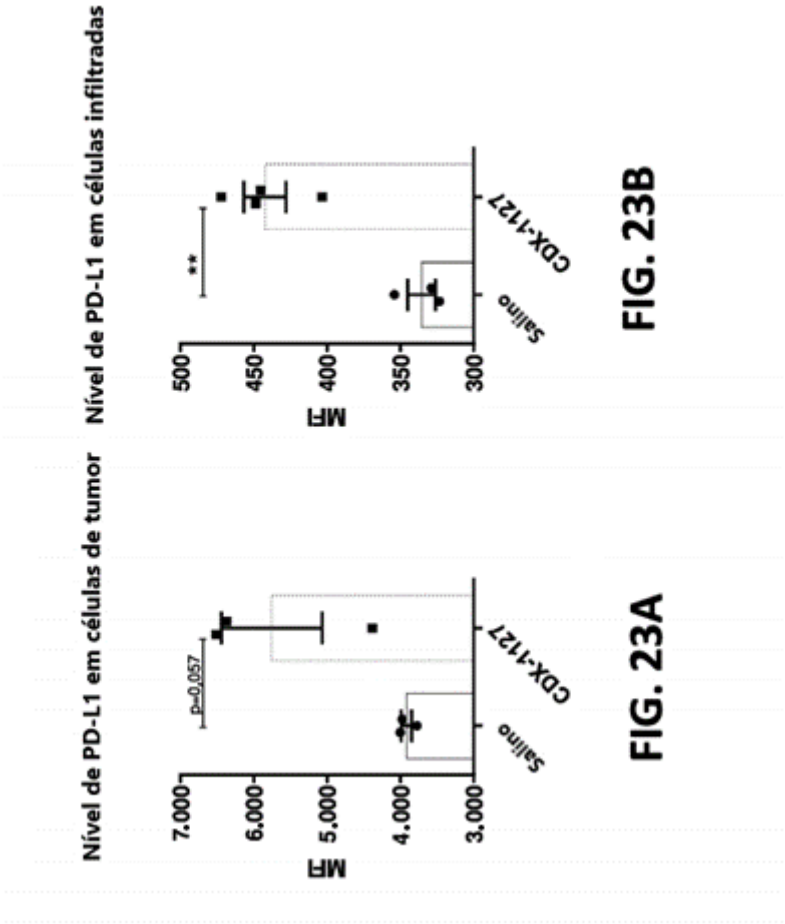
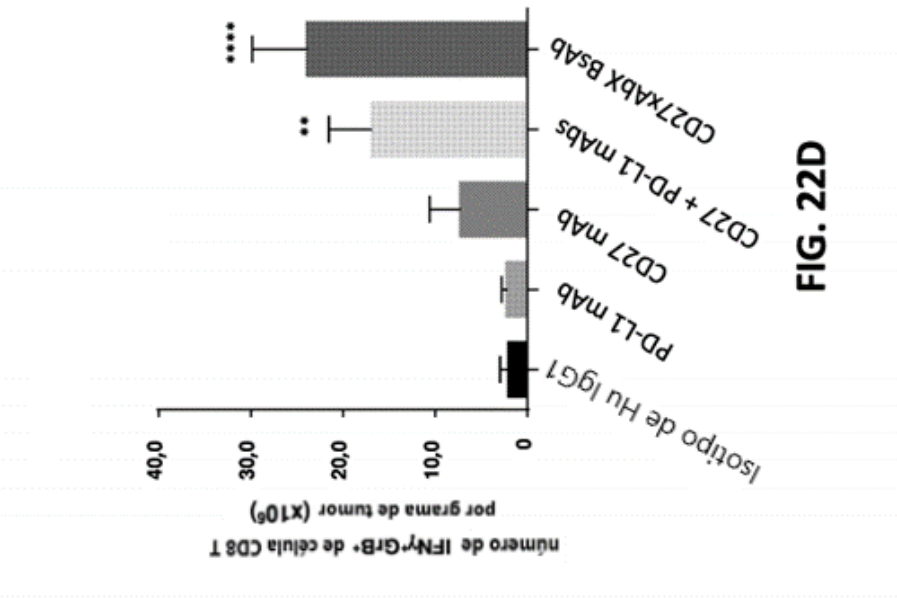


FIG. 21





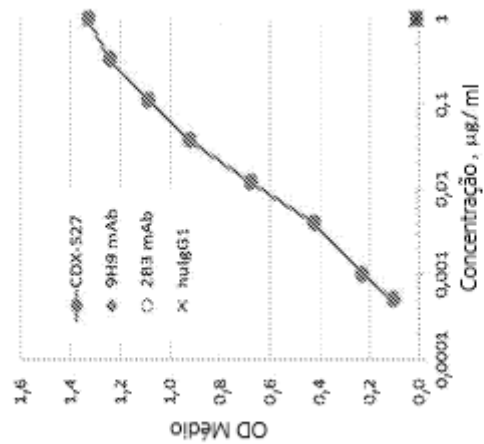


FIG. 24

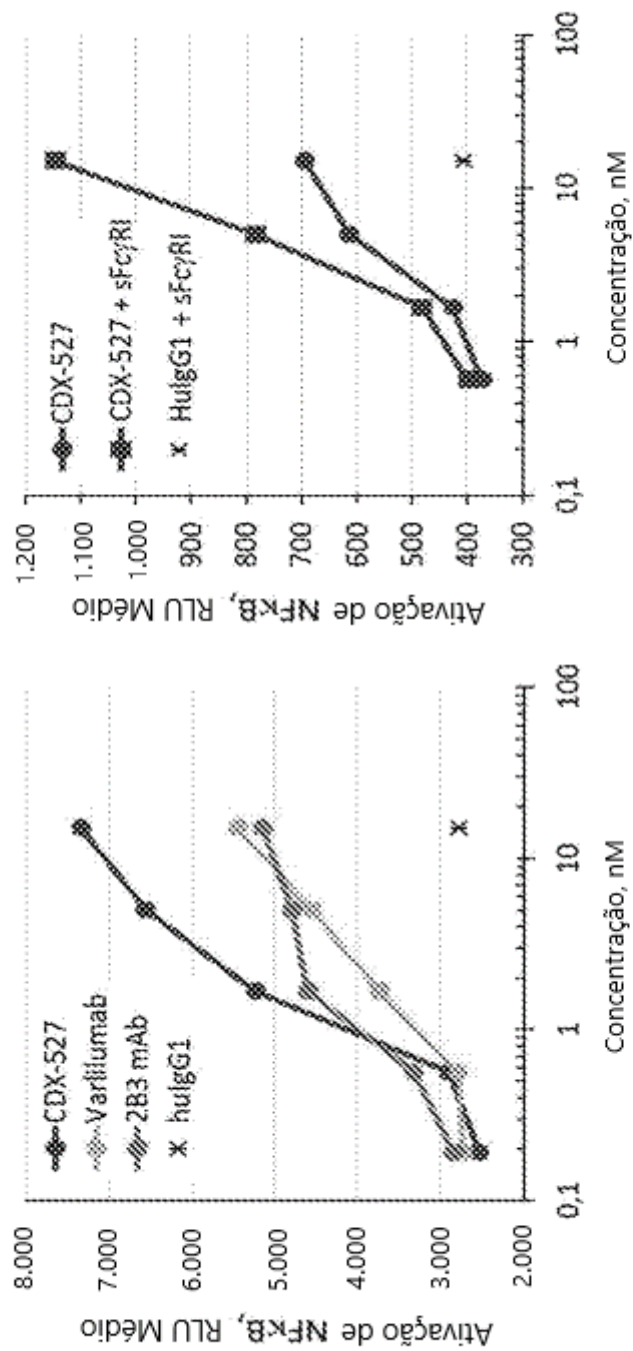


FIG. 25

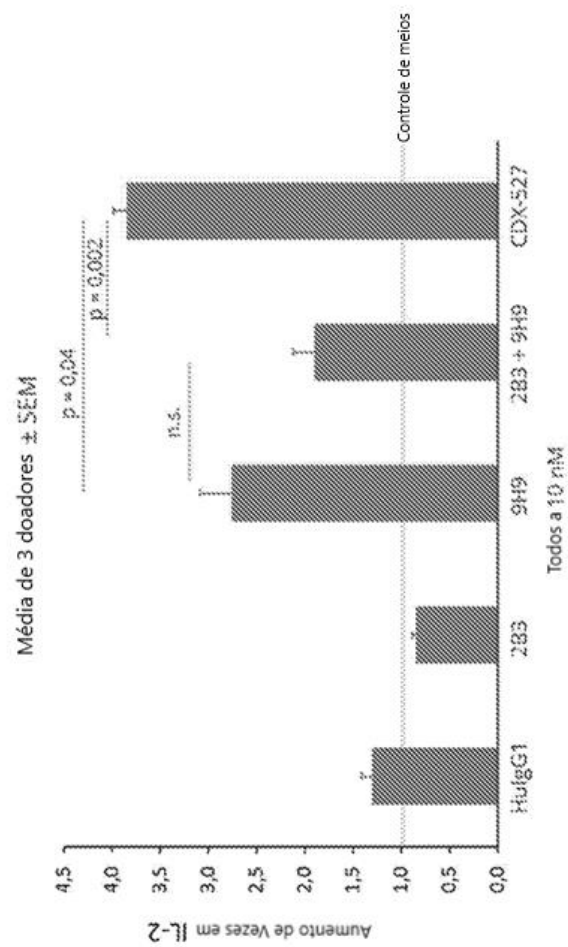


FIG. 26

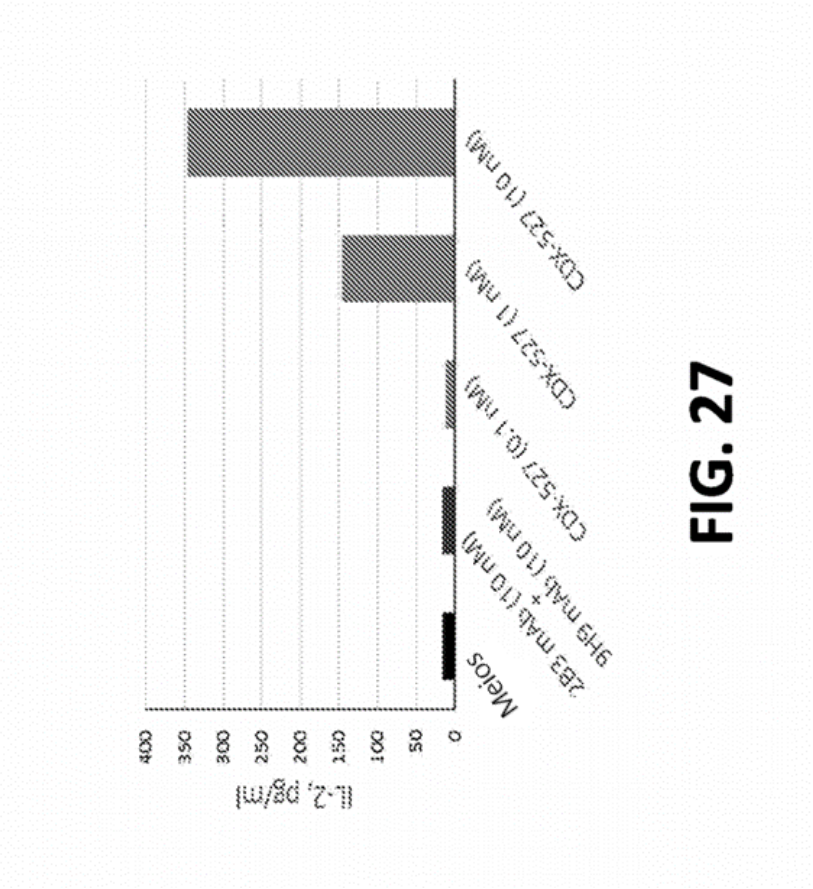


FIG. 27

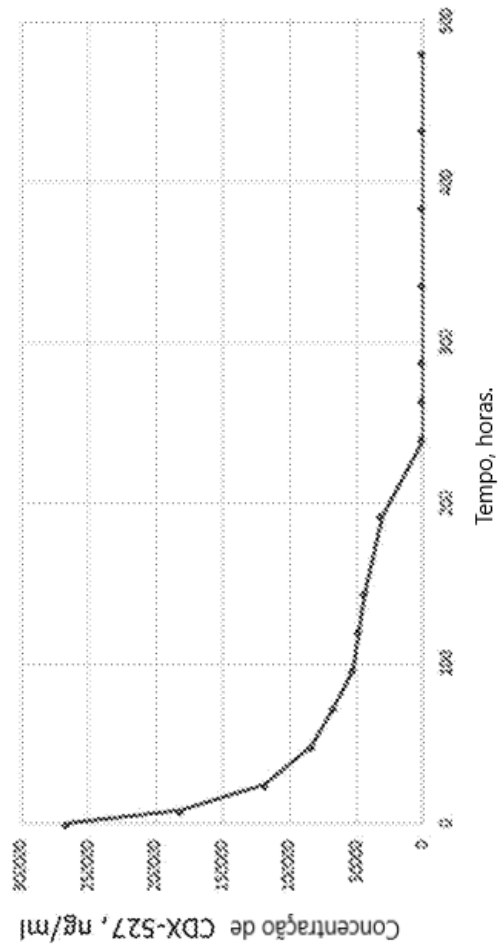


FIG. 28

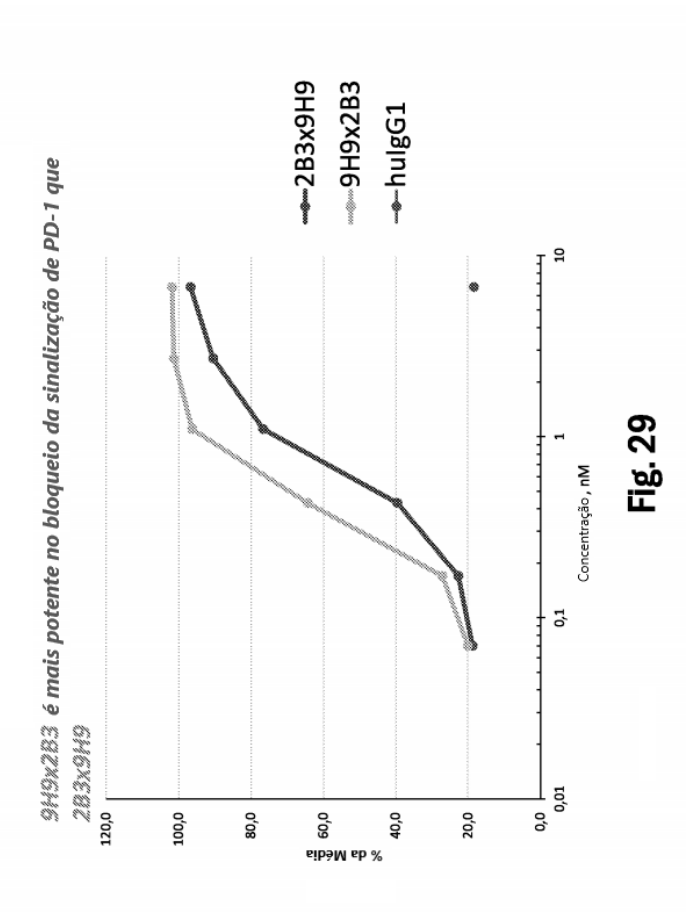
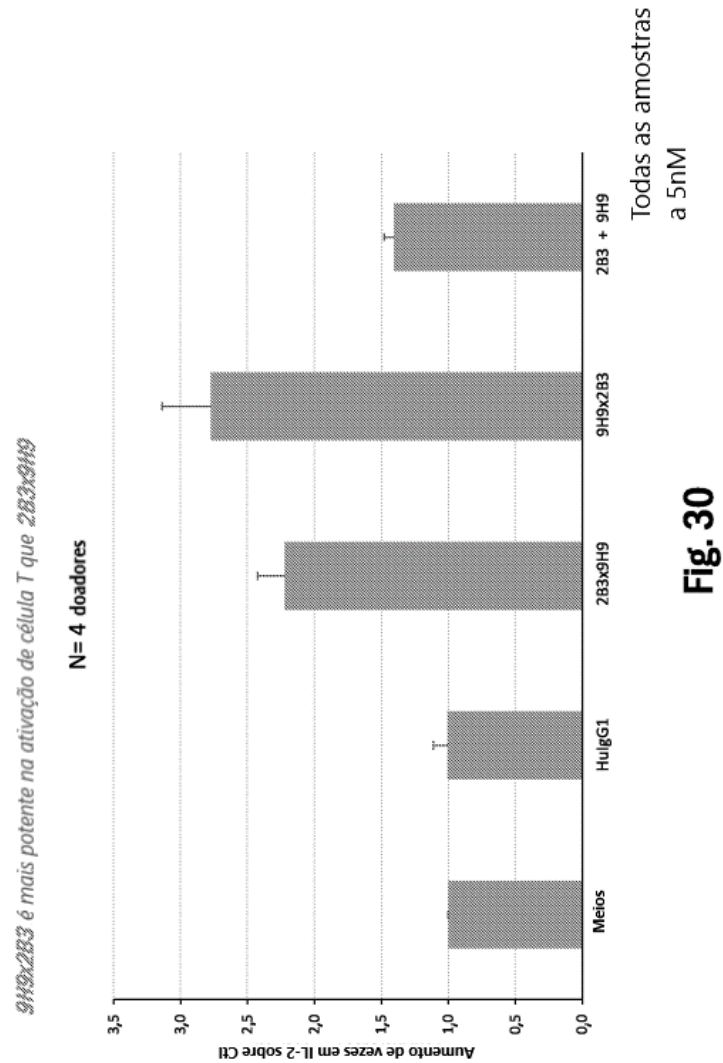


Fig. 29



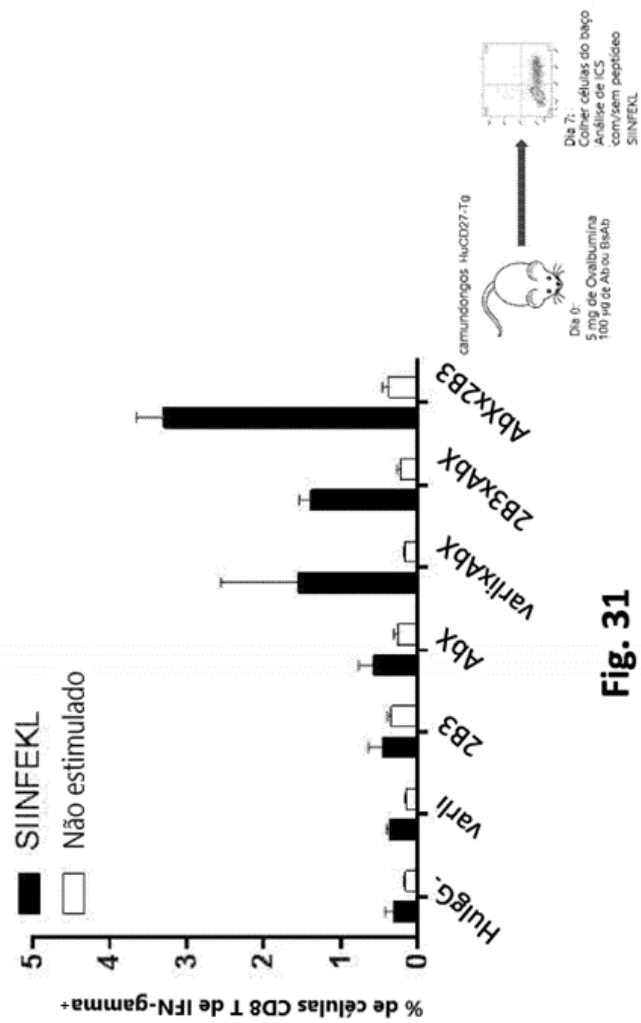
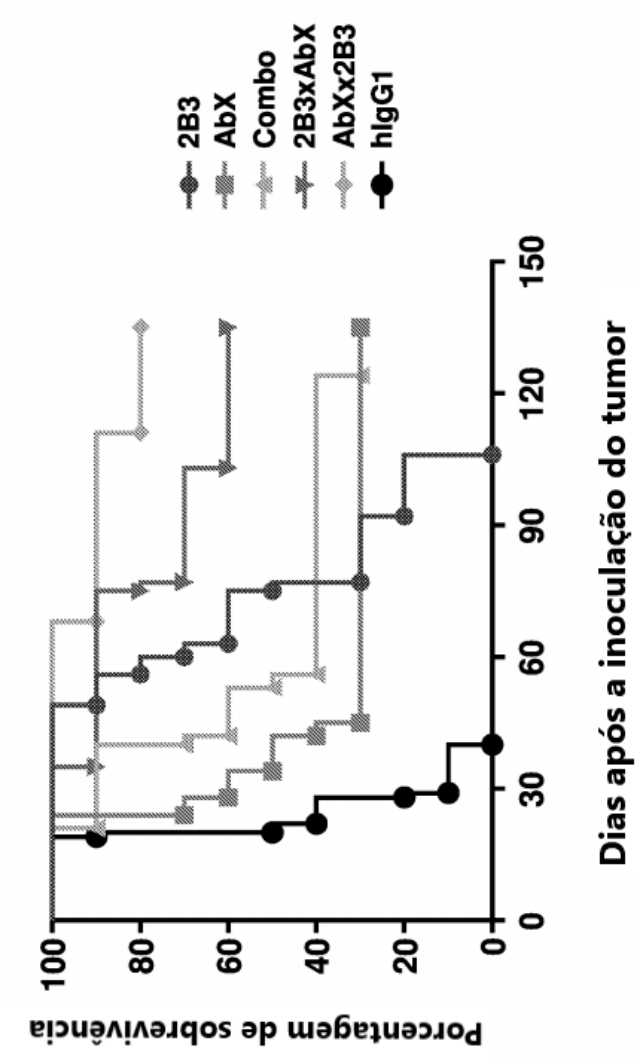
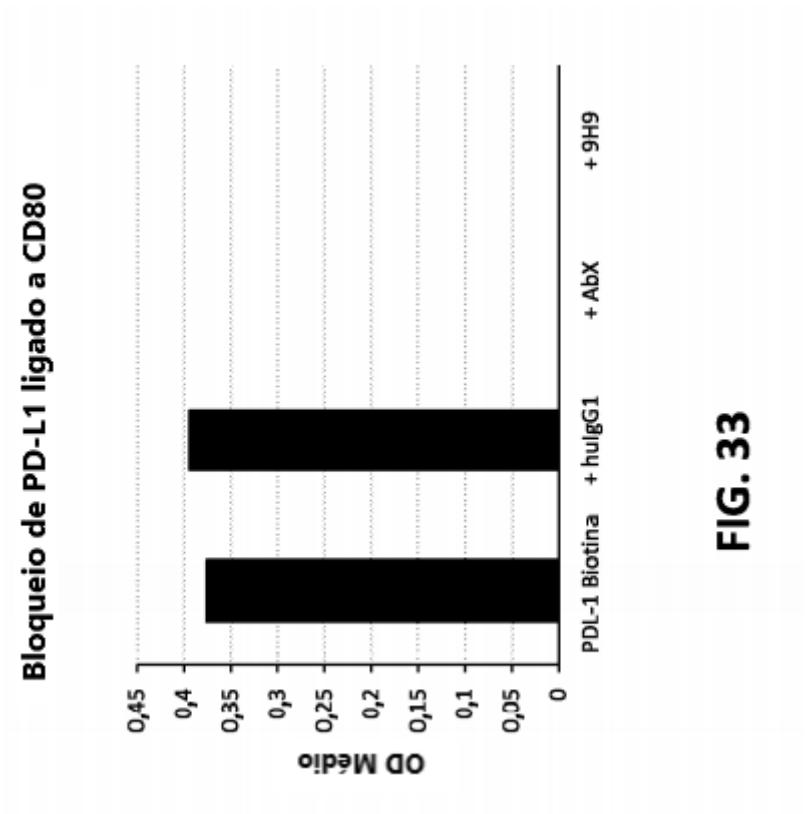


Fig. 31



CDX-1127 2018-09: célula BCL11x10⁶ i.v. no dia 0; N=10.
Cada Ab foi dado a 0,2 mg i.p. no dia 5.

Fig. 32



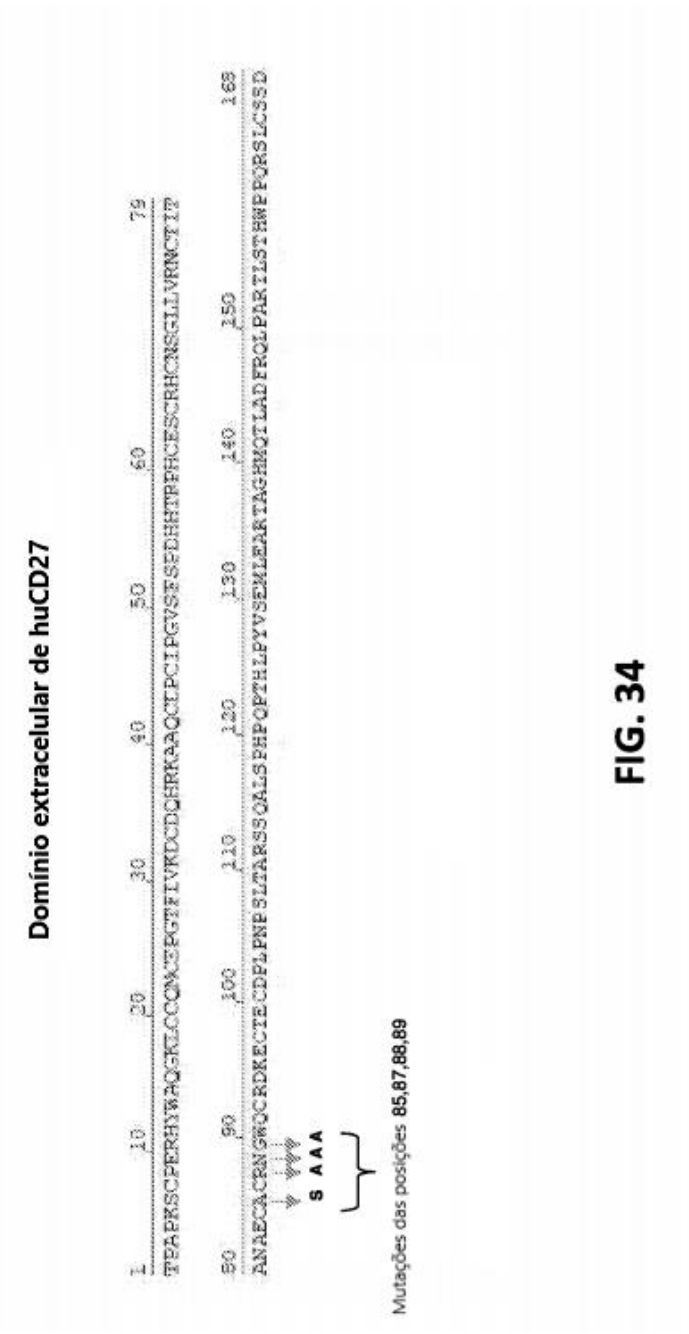
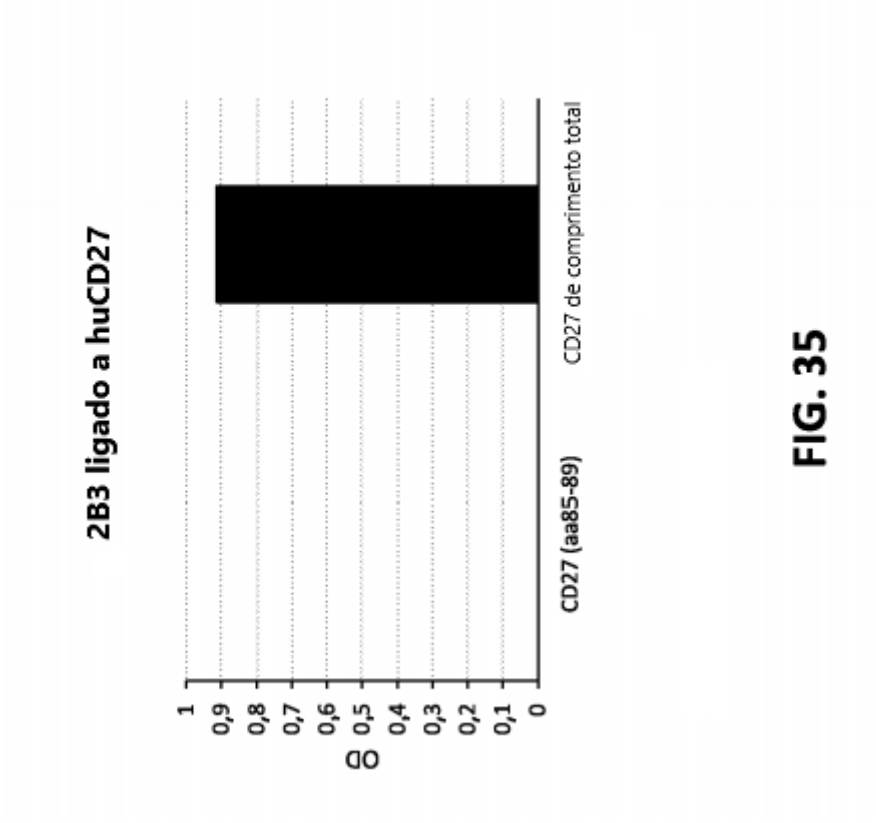


FIG. 34



Anticorpos biespecíficos de 9H9-2B3:
Transfecção Transitória mostra produção melhorada de modificação D-D

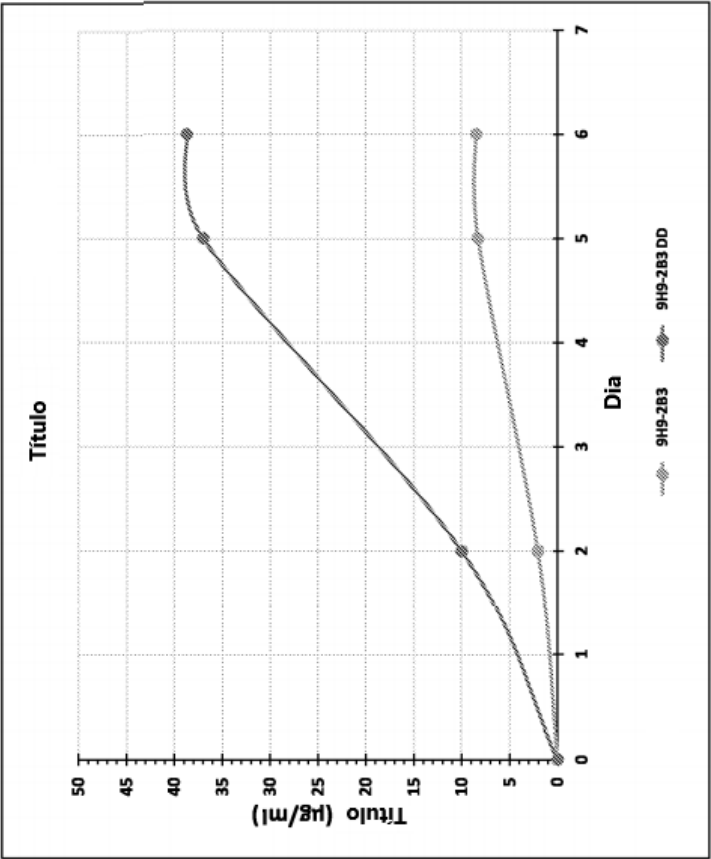


FIG. 36

RESUMO

“CONSTRUTOS BISPECÍFICOS E ANTICORPOS ANTI-CD27 E ANTI-PD-L1”

Trata-se de anticorpos anti-CD27 e anti-PD-L1 inovadores e domínios de ligação dos mesmos, bem como construtos biespecíficos e domínio de ligação anti-CD27 ligado a um domínio de ligação anti-PD-L1. Também são fornecidos no presente documento métodos para estimular a atividade de células T, métodos para induzir ou aumentar uma resposta imunológica e métodos para tratar uma doença ou condição (por exemplo, câncer) pela administração dos construtos biespecíficos, anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, ou composições descritos no presente documento a um paciente em necessidade dos mesmos.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PN008781_Listagem de sequências.txt
- Data de Geração do Código: 14/12/2020
- Hora de Geração do Código: 12:50:56
- Código de Controle:
 - Campo 1: CDF530C57D9F4932
 - Campo 2: 07652B86342A5A6F