



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

(21) BR 112020023505-9 A2



(22) Data do Depósito: 31/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 30/03/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES E USOS DAS MESMAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇA OU CONDIÇÃO

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2018 CN PCT/CN2018/089672; 09/08/2018 CN PCT/CN2018/099556.

(71) Depositante(es): TAYU HUAXIA BIOTECH MEDICAL GROUP CO., LTD..

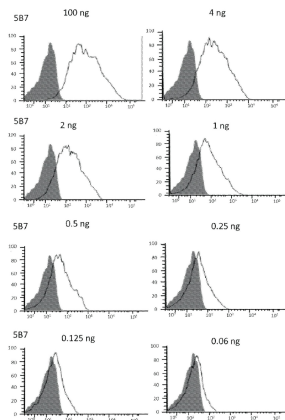
(72) Inventor(es): LIEPING CHEN; LIQUN LUO.

(86) Pedido PCT: PCT CN2019089606 de 31/05/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/228514 de 05/12/2019

(85) Data da Fase Nacional: 18/11/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos, agentes de imagem e estojos para determinação da distribuição e níveis de expressão de um ligante de ponto de checagem imune (tal como PD-L1 ou ligante do tipo PD-L1) em um indivíduo tendo uma doença ou condição. Agentes de anticorpos anti-PD-L1 e métodos para tratamento de doenças ou distúrbios através da administração de agentes de anticorpos anti-PD-L1 são também providos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**COMPOSIÇÕES E USOS DAS MESMAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇA OU CONDIÇÃO**”.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] O presente pedido reivindica o benefício dos, e prioridade para os, Pedidos PCT Nos. PCT/CN2018/089672, depositado em 1 de junho de 2018, e PCT/CN2018/099556, depositado em 9 de agosto de 2018. Os conteúdos dos pedidos são no presente documento incorporados a título de referência em sua totalidade.

APRESENTAÇÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIA EM ARQUIVO DE TEXTO ASCII

[0002] O conteúdo da apresentação que segue no arquivo de texto ASCII é no presente documento incorporado a título de referência em sua totalidade: uma forma legível por computador (CRF) da Listagem de Sequência (nome do arquivo: 792572000341SEQLIST.TXT, data da gravação: 28 de maio de 2019, tamanho: 64 KB).

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se a anticorpos, agentes de imagem, métodos de imagem de um ligante de ponto de checagem imune e métodos de tratamento de uma doença ou condição.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0004] A rede de Morte Programada (PD) envolve pelo menos cinco moléculas de interação: PD-1 (Morte de Célula Programada 1), dois ligantes de PD-1 (PD-L1 e PD-L2) e dois receptores inibidores (PD-1 e CD80) de PD-L1. A função crucial da via de PD na modulação da atividade de células T nos tecidos periféricos em uma resposta inflamatória à infecção e em limitação de autoimunidade parece ser atacada por células tumorais e por vírus durante infecções virais crônicas. PD-L1 é superexpresso em muitos tumores humanos recém-isolados de origens de

tecido múltiplas (Dong e outros. *Nature Medicine* 2002; 8:793-800; Romano e outros. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2015; 3:15; Hirano e outros. *Cancer Research* 2005; 65:1089-1096). A expressão de PD-L1 foi relacionada com a progressão e prognóstico pobre de certos tipos de cânceres humanos (Wang e outros. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2015; 41:450-456; Cierna e outros. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2016; 27:300-305; Gandini e outros. *Critical reviews in oncology/hematology* 2016; 100:88-98; Thierauf e outros. *Melanoma research* 2015; 25:503-509; Taube e outros. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; 20:5064-5074). Durante infecções virais crônicas, PD-L1 é persistentemente expresso em muitos tecidos, enquanto PD-1 é *suprarregulado* em CTLs específicos de vírus (Yao e outros. *Trends in molecular medicine* 2006; 12:244-246). PD-L1 induzido por tumor ou vírus pode utilizar mecanismos múltiplos para facilitar a evasão de vigilância imune do hospedeiro, incluindo anergia de célula T, apoptose, exaustão, produção de IL-10, supressão de DC, bem como indução e expansão de Treg (Zou e outros. *Nature reviews Immunology* 2008; 8:467-477).

[0005] O nível de expressão de PD-L1 determinado usando imunistoquímica (IHC) foi avaliado como um biomarcador preditivo em testes clínicos de terapia direcionada a PD-1/PD-L1 em múltiplos tipos de câncer, incluindo melanoma, carcinoma de célula renal (RCC), câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), câncer colorretal metastático (mCRC) e câncer de próstata resistente à castração metastático (mCRPC). Pacientes com níveis mais altos de PD-L1 determinado através de IHC pareciam ter respostas superiores à terapia direcionada a PD-1/PD-L1. No entanto, pacientes negativos para PD-L1 com melanoma podem ainda obter resposta durável à terapia anti-PD-1/PD-L1,

enquanto taxas de resposta em pacientes NSCLC negativos para PD-L1 são raras.

[0006] A precisão de detecção de PD-L1 por IHC em espécimes de tumor humanas é confundida por múltiplos fatores. Um grande número de anticorpos para PD-L1 para detecção por IHC foi utilizado, incluindo 28-8, 22C3, 5H1, MIH1 e 405.9A11. Ainda, vários de diagnósticos complementares da proprietária estão sendo desenvolvidos nessa área, tais como ensaios Ventana SP142 e Ventana SP263. Características de desempenho comparativas desses ensaios não são bem conhecidas. Em adição à questão existente de expressão de PD-L1 heterogênea dentro do microambiente do tumor, há também uma falta de definição clara de tingimento de PD-L1 “positivo” por IHC em amostras de tumor. Pontos de corte para um resultado positivo poderiam variar de >1% a >50%, com base em células de tumor percentuais tingidas. Ainda, PD-L1 tem sítios de ligação limitados para anticorpos de detecção por IHC, uma vez que ele contém apenas duas regiões hidrofílicas pequenas, o que torna as abordagens imunoistoquímicas classicamente usadas em espécimes fixadas em formalina, incrustadas em parafina (FFPE) menos eficazes. Devido à falta de sítios de ligação em PD-L1, anticorpos para IHC tipicamente se ligam a PD-L1 em sítios estruturalmente únicos comparado com anticorpos para PD-L1 terapêuticos.

[0007] Ainda, PD-L1 é biologicamente ativo apenas quando expresso na membrana celular, ou através de expressão de IFN γ dinâmica ou através de ativação de oncogene constitutiva. Expressão de PD-L1 orientada por oncogene representa uma entidade histopatologicamente e biologicamente distinta comparado com expressão de PD-L1 orientada por inflamação. Embora a última ocorra focalmente em sítios de ataque imunológico mediado por IFN γ , expressão de PD-L1 orientada por oncogene é constitutiva e difusa. Expressão de PD-L1 induzida por IFN γ representa um biomarcador dinâmico e está presente em sítios de

inflamação ativa, e amostras de biópsia representam um *snapshot* do microambiente imune do tumor em espaço e tempo. Outros fatores no microambiente metabólico do tumor, incluindo hipoxia, podem resultar em *suprarregulação* de PD-L1 e são dependentes de sinalização por meio de HIF1a. Biópsias de tumor menores podem perder a interface imune do tumor pertinente, ou a biópsia pode ser realizada após a superexpressão de PD-L1 biologicamente relevante já ter acontecido. O PD-L1 em si é expresso em duas sinapses imunológicas potencialmente clinicamente relevantes – as interfaces de tumor/célula T, bem como a interface de APC/célula T. Para a interface de tumor/célula T, captura de biópsia da interface de tumor/imune é um determinante-chave em detecção de PD-L1 por IHC em melanoma. Em um estudo avaliando expressão de PD-L1 em pacientes com melanoma metastático, 96% de melanomas superexpressando PD-L1 tinham infiltrado linfocítico (TIL), enquanto os 4% restantes dos que superexpressavam PD-L1 não tinham TILs, possivelmente representando expressão de PD-L1 direcionada por oncogene. Ainda, 22% de amostras negativas para PD-L1 foram associados com TIL, indicando mecanismos alternativos de interferência imune de tumor.

[0008] A maioria da expressão de PD-L1 ocorre na interface de tumor, com células imunes secretando IFN γ , levando à hipótese contraintuitiva que superexpressão de PD-L1 pode ser uma resposta inicialmente protetora para morte de tumor bem-sucedida por TILs, que com o tempo se torna cooptada em um ambiente de tumor imunossupressivo. Ainda, seleção do sítio apropriado para biópsia para detecção de PD-L1 permanece enigmática. Enquanto amostras de tumor primário de FFPE de pré-tratamento podem estar mais prontamente disponíveis, essas amostras podem não refletir o estado imunológico geral que atualmente existe em um dado paciente, particularmente se tratamento provisório tiver sido administrado. A ausência de expressão de PD-L1 em

uma lesão que sofreu biópsia pode não refletir o panorama imunológico, e pode não capturar o efeito benéfico da terapia em outros sítios da doença que são dependentes de sinalização de PD-L1. Em suma, há uma necessidade não satisfeita de agentes e métodos de detecção de PD-L1 precisos e alternativos.

[0009] A descrições de todas as publicações, patentes, pedidos de patente e pedidos de patente publicados referidas no presente documento são no presente documento incorporadas a título de referência em sua totalidade.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] O presente pedido provê anticorpos anti-PD-L1, agentes de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada que reconhece especificamente um ligante de ponto de checagem imune (tal como PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1), métodos de preparação de agentes de imagem e métodos de imagem e diagnóstico usando os agentes de imagem. O presente pedido também provê agentes de anticorpo anti-PD-L1, usos de agentes de anticorpo anti-PD-L1 e métodos para tratamento de doenças ou distúrbios através da administração dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 a indivíduos.

[0011] Um aspecto do presente pedido provê métodos de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) a V_H compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1 (HC-CDR1) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante

da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e b) a V_L compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve 1 (LC-CDR1) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs. Em algumas modalidades, a V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e a V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21 ou 23.

[0012] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a V_H compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e/ou a V_L compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende: (a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (b) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e uma

V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (c) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (d) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (e) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (f) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (g) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (h) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; ou (i) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0013] Um outro aspecto do presente pedido provê métodos de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (VH) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma a CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (VL) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0014] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos

métodos descritos acima, a porção de anticorpo é quimérica ou humanizada.

[0015] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂, um VHH, uma fusão de Fv-Fc, uma fusão de scFv-Fv, uma fusão de scFv-Fv, um diacorpo, um tricorpo e um tetracorpo.

[0016] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo é um anticorpo de cadeia única. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv.

[0017] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo compreende um fragmento Fc. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um anticorpo de comprimento integral. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem um isotipo selecionado do grupo consistindo em um IgG, um IgM, um IgA, um IgD e um IgE. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 ou IgG4. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0018] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o indivíduo é um humano.

[0019] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a doença ou condição é um câncer. Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, carcinoma urotelial, linfoma de Hodgkin, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores de cabeça e pescoço,

câncer de estômago, linfoma de célula B, carcinoma de célula de Merkel, câncer de fígado e câncer cervical.

[0020] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o agente de anticorpo é adequado para administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea ou oral.

[0021] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o agente de anticorpo é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente.

[0022] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o método compreende ainda administrar uma quantidade eficaz de um segundo agente. Em algumas modalidades, o segundo agente é um agente quimioterapêutico.

[0023] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 é cerca de 0,05 µg/kg a cerca de 5 g/kg de peso do corpo total do indivíduo.

[0024] Um outro aspecto do presente pedido provê uma composição farmacêutica compreendendo um agente de anticorpo anti-PD-L1 e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:

44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é liofilizada. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é uma solução. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica compreende cerca de 0,001 µg a cerca de 10 g da porção de anticorpo.

[0025] Um outro aspecto do presente pedido provê um estojo para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo qualquer uma das composições farmacêuticas descritas acima e uma instrução.

[0026] Um outro aspecto do presente pedido provê um método de determinação da distribuição de um ligante de ponto de checagem imune em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que o fragmento de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende determinar a distribuição de dois ou mais ligantes de ponto de checagem imune no indivíduo.

[0027] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o agente de imagem é eliminado do indivíduo dentro de cerca de 10 minutos a cerca de 48 horas (por exemplo, cerca de 2 horas a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 8 horas ou

cerca de 8 horas a cerca de 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a meia-vida da porção de anticorpo é entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (por exemplo, cerca de 1 hora a cerca de 2 horas, cerca de 2 horas a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 12 horas ou cerca de 12 horas a cerca de 24 horas).

[0028] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o peso molecular da porção de anticorpo não é mais do que cerca de 120 kDa (por exemplo, cerca de qualquer um de 30-50 kDa, 50-100 kDa ou 30-80 kDa).

[0029] Em algumas modalidades, de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (por exemplo, cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune.

[0030] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um macaco cynomolgus. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um camundongo.

[0031] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humana. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é quimérica.

[0032] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo é estável em pH ácido ou neutro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão de cerca de 55-70°C (por exemplo, cerca de 55-60°C, cerca de 60-65°C ou cerca de 65-70°C).

[0033] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂ e um V_HH. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 de V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 de V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 de V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 de V_L, em que o primeiro resíduo cisteína e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto, e em que as posições de aminoácidos são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 humano. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma região variável de cadeia pesada (V_H), um ligante peptídico opcional e uma região variável de cadeia leve (V_L). Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L, um ligante peptídico opcional e uma V_H. Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48.

[0034] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, a porção

de anticorpo compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e a V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46; ou a porção de anticorpo liga especificamente PD-L1 competitivamente com um anticorpo anti-PD-L1 compreendendo: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46.

[0035] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o tecido de interesse é negativo para o ligante de ponto de checagem imune com base em um ensaio de imunoistoquímica (IHC) ou um outro ensaio. Em algumas modalidades, o tecido de interesse tem um nível de expressão baixo do ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o tecido de interesse expressa apenas o ligante de ponto de checagem imune quando da infiltração de células imunes.

[0036] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo.

[0037] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos

métodos descritos acima, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-trisacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) ou derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA.

[0038] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o método compreende ainda preparação do agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo.

[0039] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia de emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica.

[0040] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente.

[0041] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (por exemplo, cerca de 10 minutos a 1 hora, cerca de 1 hora a cerca de 2 horas, cerca de 2 horas a 4 horas, cerca

de 4 horas a 8 horas ou cerca de 8 horas a 24 horas) após a administração do agente de imagem.

[0042] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radionuclídeo antes da administração do agente de imagem.

[0043] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima, o indivíduo tem um tumor sólido. Em algumas modalidades, o tumor sólido é selecionado do grupo consistindo em tumor de cólon, melanoma, tumor de rim, tumor ovariano, tumor de pulmão, tumor de mama e tumor pancreático. Em algumas modalidades, o indivíduo tem um mal hematológico. Em algumas modalidades, o mal hematológico é selecionado do grupo consistindo em leucemia, linfoma, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia não linfoblástica aguda (ANLL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mieloide crônica (CML), linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin. Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma doença infecciosa, doença autoimune ou doença metabólica.

[0044] Um outro aspecto do presente pedido provê um método de diagnóstico de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) determinar a distribuição de um ligante de ponto de checagem imune no indivíduo usando o método de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima; e (b) diagnóstico do indivíduo como positivo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem for detectado em um tecido de interesse ou diagnóstico do indivíduo como negativo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem não for detectado em um tecido de interesse.

[0045] Um outro aspecto do presente pedido provê um método de tratamento de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) diagnóstico do indivíduo usando o método de acordo com

qualquer um dos métodos de diagnóstico descritos acima; e (b) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente terapêutico se direcionando ao ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo, se o indivíduo for diagnosticado como positivo para o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é um inibidor do ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é uma molécula radiomarcada se ligante especificamente ao ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo. Em algumas modalidades, onde o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1, o indivíduo é administrado com um anticorpo especificamente se ligando a PD-1 ou PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1.

[0046] Um outro aspecto do presente pedido provê um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado compreendendo uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) compreendendo uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada (HC-CDR)1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido; e uma região variável de cadeia leve (V_L) compreendendo região de determinação de complementaridade de cadeia leve (LC-CDR)1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende: uma V_H

compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46.

[0047] Em algumas modalidades, é provido um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado compreendendo uma porção de anticorpo compreendendo uma V_H compreendendo uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3 de SEQ ID NO: 1; e a V_L compreendendo uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3 de SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende: uma V_H compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% (por exemplo, pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% (por exemplo, pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende: (a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (b) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (c) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (d) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de

SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (e) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (f) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (g) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (h) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; ou (i) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0048] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos acima, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humana. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é quimérica.

[0049] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 descritos acima, a porção de anticorpo compreende um scFv. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 de V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 de V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 de V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 de V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto, e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% (por exemplo, pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais) de identidade

de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG humano. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435H, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0050] Em algumas modalidades, é provido um agente de anticorpo anti-PD-L1 compreendendo uma porção de anticorpo que liga especificamente PL-L1 competitivamente com a porção de anticorpo no agente de anticorpo anti-PD-L1 de acordo com qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos acima.

[0051] Um outro aspecto do presente pedido provê um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo o agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado de acordo com qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento, em que a porção de anticorpo é marcada com um radionuclídeo.

[0052] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos agentes de imagem descritos no presente documento, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o

composto de quelação é NOTA, DOTA ou derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA.

[0053] É também provido um ácido nucleico isolado codificando o agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado de acordo com qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento, um vetor compreendendo o ácido nucleico isolado e uma célula hospedeira isolada compreendendo o agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado, o ácido nucleico isolado ou o vetor.

[0054] Um outro aspecto do presente pedido provê um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a um ligante de ponto de checagem imune, compreendendo: (a) conjugação de um composto de quelação a uma porção de anticorpo ligando especificamente o ligante de ponto de checagem imune para prover um conjugado de porção de anticorpo; (b) contato de um radionuclídeo com o conjugado de porção de anticorpo, dessa maneira provendo o agente de imagem. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1.

[0055] Em algumas modalidades, é provido um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a PD-L1, compreendendo: (a) conjugação de um composto de quelação à porção de anticorpo no agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado de acordo com qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos acima para prover um conjugado anti-PD-L1; e (b) contato de um radionuclídeo com o conjugado de anticorpo anti-PD-L1, dessa maneira provendo o agente de imagem.

[0056] Em algumas modalidades de acordo com qualquer um dos métodos de preparação descritos no presente documento, o composto de quelação é conjugado a uma lisina da porção de anticorpo.

[0057] É provido ainda um estojo compreendendo: (a) uma porção de anticorpo ligando especificamente um ligante de ponto de checagem

imune; e (b) um composto de quelação. Em algumas modalidades, o estojo compreende ainda um radionuclídeo.

[0058] Em algumas modalidades, é provido um estojo compreendendo: (a) um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune; e (b) uma porção de anticorpo não marcada com um radionuclídeo.

[0059] São também providas composições, estojos e artigos de fabricação compreendendo qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 e agentes de imagem descritos no presente documento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0060] As FIGs. 1A e 1B mostram a afinidade de ligação de anticorpo monoclonal anti-hPD-L1 5B7 com a proteína hPD-L1. A FIG. 1A mostra histogramas demonstrando a afinidade de ligação de anticorpo monoclonal anti-hPD-L1 5B7 com a proteína hPD-L1 em concentrações diferentes. A FIG. 1B mostra a intensidade de fluorescência média nas respectivas concentrações.

[0061] As FIGs. 2A e 2B mostram a afinidade de ligação do anticorpo monoclonal anti-hPD-L1 com células CHO expressando proteína hPD-L1 ou proteína mPD-L1.

[0062] As FIGs. 3A e 3B mostram as atividades de bloqueio de anticorpos anti-hPD-L1 de camundongo sobre a ligação de hPD-L1 a hPD-1 (A) e hB7-1 (B).

[0063] A FIG. 4 mostra as atividades de bloqueio de anticorpos anti-hPD-L1 humanizados sobre ligação de hPD-1/hPD-L1 comparado com o anticorpo quimérico parental.

[0064] A FIG. 5 mostra um diagrama esquemático do projeto de construto para scFv-HuFc(Wt) e scFv-HuFc(Mt).

[0065] A FIG. 6 mostra os resultados de SDS-PAGE para scFv-

HuFc(Wt) e scFv-HuFc(Mt) em ambas as condições reduzida e não reduzida.

[0066] A FIG. 7 mostra histogramas demonstrando as afinidades de ligação de scFv-HuFc(Wt) e scFv-HuFc(Mt) a PD-L1 comparado com aquelas do anticorpo parental.

[0067] As FIGs. 8A e 8B mostram títulos séricos de anticorpos anti-hPD-L1 e hIgG seguindo injeções intravenosas de proteínas de fusão scFv-HuFc anti-hPD-L1 scFv-hFc Wt e scFv-hFc Mt. A FIG. 8A mostra títulos séricos de anticorpos anti-hPD-L1. A FIG. 8B mostra títulos séricos de hIgG.

[0068] A FIG. 9 mostra diagramas esquemáticos dos projetos de construto para scFvs anti-hPD-L1, para o anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental e um scFv controle negativo.

[0069] A FIG. 10 mostra resultados de SDS-PAGE para scFv (PD-L1), para o anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e o scFv controle negativo sob ambas as condições reduzida e não reduzida.

[0070] A FIG. 11 mostra a afinidade de ligação do anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e scFv (PD-L1) com PD-L1 em várias concentrações.

[0071] A FIG. 12 mostra as temperaturas de exposição hidrofóbica de scFv (PD-L1), do anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e do scFv controle negativo, conforme medido através de Fluorimetria de Varredura Diferencial (DSF).

[0072] As FIGs. 13A-13D mostram as afinidades de ligação de anticorpo anti-PD-L1 de comprimento integral e scFv (PD-L1) a PD-L1 sob uma condição de temperatura alta (40° C) e pH alto (pH=7,4) (FIGs. 13A e 13B) comparado com uma condição de temperatura baixa (4° C) e pH ácido (pH=5,5) (FIGs. 13C e 13D).

[0073] A FIG. 14 mostra o rendimento de ^{68}Ga -NOTA-scFv conforme medido usando cromatografia de camada fina instantânea em Sílica Gel.

[0074] A FIG. 15 mostra a pureza de ^{68}Ga -NOTA-scFv conforme medido usando cromatografia de camada fina em Sílica Gel.

[0075] A FIG. 16 mostra a afinidade de ligação de ^{68}Ga -NOTA-scFv a células MC38-PD-L1 comparado com células MC38.

[0076] A FIG. 17 mostra o efeito de bloqueio de IgG1 anti-PD-L1 sobre a ligação de scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1 a células MC38-PD-L1 em várias concentrações.

[0077] A FIG. 18 mostra imagem *in vivo* de tumores induzidos por injeções de células MC38-PD-L1 e MC38 usando scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1.

[0078] A FIG. 19 mostra imagem *in vivo* de tumores induzidos por injeções de células MC38-PD-L1 e MC38 usando scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1.

[0079] A FIG. 20 mostra resultados de imagem *in vivo* demonstrando a competição entre IgG1 anti-PD-L1 não marcado e scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1 para ligação a PD-L1.

[0080] A FIG. 21 mostra resultados de imagem *in vivo* de tumores em camundongos 30 minutos após injeção de scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1, scFv anti-PD-L1 não marcado e scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1, scFv-Fc ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1 (wt) em ajuste de sensibilidade de câmera normal e scFv-Fc ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1 (wt) em $\frac{1}{4}$ de ajuste de sensibilidade de câmera normal.

[0081] A FIG. 22 mostra resultados de imagem *in vivo* de tumores em camundongos 1 hora (painel superior) e 2 horas (painel inferior) após injeção de scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1, scFv anti-PD-L1 não marcado e scFv ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1, scFv-Fc ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1 (wt) em ajuste de sensibilidade de câmera normal e scFv-Fc ^{68}Ga -

NOTA-anti-PD-L1 (wt) em ¼ de ajuste de sensibilidade de câmera normal.

[0082] A FIG. 23 mostra compostos NOTA exemplares que podem ser usados para quelar um radionuclídeo e conjugar a uma porção de anticorpo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0083] O presente pedido provê agentes de imagem e métodos para detecção de um ligante de ponto de checagem imune em um indivíduo. Os agentes de imagem descritos no presente documento compreendem uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente o ligante de ponto de checagem imune, tal como PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1. A porção de anticorpo (tal como Fab, scFv ou scFv fundido a um Fc) é caracterizada por um tamanho pequeno e eliminação rápida do sangue e órgãos normais. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é engenheirada para ter estabilidade térmica aumentada. Agentes de imagem compreendendo tais porções de anticorpo marcadas com radionuclídeos de vida curta permitem direcionamento e penetração eficazes de tecidos doentes expressando o ligante de ponto de checagem imune. Níveis de distribuição e expressão do ligante de ponto de checagem imune podem ser determinados através de imagem ao vivo *in vivo* de um indivíduo administrado com o agente de imagem. Antes da presente invenção, diagnóstico preciso baseado em PD-L1 e outros ligantes de ponto de checagem imune como biomarcadores permanece um desafio no campo de imunoterapia para câncer.

[0084] Portanto, um aspecto do presente pedido provê um método de determinação da distribuição de um ligante de ponto de checagem imune (tal como PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem

compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente o ligante de ponto de checagem imune; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva.

[0085] Um outro aspecto do presente pedido provê um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo se liga especificamente a um ligante de ponto de checagem imune (tal como PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1).

[0086] Um outro aspecto da presente invenção provê um agente de anticorpo anti-PD-L1 compreendendo: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3 de SEQ ID NO: 1; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3 de SEQ ID NO: 3.

[0087] São também providas composições, estojos e artigos de fabricação compreendendo os agentes de imagem e agentes de anticorpo anti-PD-L1 descritos no presente documento, métodos de fabricação dos mesmos e métodos de diagnóstico ou tratamento de um indivíduo tendo uma doença ou condição (tal como câncer, doença infecciosa, doença autoimune ou doença metabólica).

I. Definições

[0088] Como no presente documento usado, “pontos de checagem do sistema imune” ou “pontos de checagem imune” se refere a vias inibidoras no sistema imune que geralmente agem para manter autotolerância ou modular a duração e amplitude de respostas imunes fisiológicas para minimizar dano a tecido colateral. Moléculas de ponto de checagem estimuladoras são moléculas, tais como proteínas, que estimulam ou regulam positivamente o sistema imune. Moléculas de ponto de checagem inibidoras são moléculas, tais como proteínas, que inibem ou

regulam negativamente o sistema imune. Moléculas de ponto de checagem do sistema imune incluem, mas não estão limitadas a, antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), proteína de morte de célula programada 1 (PD-1), PD-L1, PD-L2, gene de ativação de linfócito 3 (LAG3), B7-1, B7-H3, B7-H4, proteína de membrana de célula T 3 (TIM3), atenuador de linfócito B e T (BTLA), supressor de ativação de célula T contendo imunoglobulina (Ig) com domínio V (VISTA), receptor do tipo imunoglobulina de célula assassina (KIR) e receptor de adenosina A2A (A2aR).

[0089] “Receptores de ponto de checagem imune” são moléculas de ponto de checagem imune que são expressas em células imunes, tais como células T.

[0090] Como no presente documento usado, o termo “ligante de ponto de checagem imune” se refere a um ligante de ocorrência natural ou ocorrência não natural que é especificamente reconhecido por um receptor de ponto de checagem imune. Ligantes de ponto de checagem imune de ocorrência natural são moléculas de ponto de checagem imune que podem ser expressas por tecido doente, tais como células de tumor, células infectadas ou tecido inflamado, que podem regular células imunes que expressam receptores de ponto de checagem imune que reconhecem especificamente os ligantes de ponto de checagem imune. Ligantes de ponto de checagem imune de ocorrência não natural incluem moléculas sintéticas e recombinantes, tais como inibidores terapêuticos, ligantes e anticorpos de receptores de ponto de checagem imune. Ligantes de ponto de checagem imune de ocorrência não natural podem ser introduzidos no indivíduo, por exemplo, através da administração ao indivíduo. Um ligante de ponto de checagem imune pode inibir um ponto de checagem imune através da estimulação da atividade de um receptor de ponto de checagem estimulador ou inibição da atividade de um receptor de ponto de checagem inibidor na via. Ligantes de ponto

de checagem imune de ocorrência natural exemplares incluem, mas não estão limitados a, PD-L1, PD-L2, B7-H3 (também conhecido como CD276), galectin-9a, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. “Ligante do tipo PD-L1” se refere a um ligante de PD-1 de ocorrência natural ou ocorrência não natural.

[0091] O termo “anticorpo” é usado em seu sentido mais amplo e compreende várias estruturas de anticorpo, incluindo, mas não limitado a, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos de comprimento integral e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, contanto que eles exibam a atividade de ligação a antígeno desejada. O termo “porção de anticorpo” se refere a um anticorpo de comprimento integral ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[0092] Um anticorpo de comprimento integral compreende duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. As regiões variáveis das cadeias leve e pesada são responsáveis por ligação a antígeno. Os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve podem ser referidos como “V_H” e “V_L”, respectivamente. As regiões variáveis em ambas das cadeias geralmente contêm três alças altamente variáveis chamadas regiões de determinação de complementaridade (CDRs) (CDRs de cadeia leve (LC) incluindo LC-CDR1, LC-CDR2 e LC-CDR3, CDRs de cadeia pesada (HC) incluindo HC-CDR1, HC-CDR2 e HC-CDR3). Limites de CDR para os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno descritos no presente documento podem ser definidos ou identificados pelas convenções de Kabat, Chothia ou Al-Lazikani (Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991). As três CDRs das cadeias pesadas ou leves são interpostas entre extensões de flanqueamento conhecidas como regiões de estrutura principal

(FRs), que são mais altamente conservadas do que as CDRs e formam uma base para dar apoio às alças hipervariáveis. As regiões constantes das cadeias pesada e leve não estão envolvidas em ligação de antígeno, mas exibem várias funções efetoras. Os anticorpos são atribuídos a classes com base na sequência de aminoácido da região constante de sua cadeia pesada. As cinco principais classes ou isotipos de anticorpos são IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que são caracterizados pela presença de cadeias pesadas α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. Várias das principais classes de anticorpo são divididas em subclasses tais como IgG1 (cadeia pesada γ 1), IgG2 (cadeia pesada γ 2), IgG3 (cadeia pesada γ 3), IgG4 (cadeia pesada γ 4), IgA1 (cadeia pesada α 1) ou IgA2 (cadeia pesada α 2).

[0093] O termo “fragmento de ligação a antígeno” como usado no presente documento se refere a um fragmento de anticorpo incluindo, por exemplo, um diacorpo, um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂, um dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), um diacorpo estabilizado com dissulfeto (diacorpo ds), um Fv de cadeia única (scFv), um dímero de scFv (diacorpo divalente), um anticorpo multiespecífico formado de uma porção de um anticorpo compreendendo uma ou mais CDRs, um anticorpo de domínio único camelizado, um nanocorpo, um anticorpo de domínio, um anticorpo de domínio bivalente ou qualquer outro fragmento de anticorpo que se ligue a um antígeno, mas não compreende uma estrutura de anticorpo completa. Um fragmento de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao mesmo antígeno ao qual o anticorpo parental ou fragmento de anticorpo parental (por exemplo, um csFv parental) se liga. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação a antígeno pode compreender uma ou mais CDRs de um anticorpo humano particular enxertadas em uma região de estrutura principal de um ou mais anticorpos humanos diferentes.

[0094] “Fv” é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento e ligação de antígeno completo. Esse fragmento consiste em um dímero de domínio de região variável de uma cadeia pesada e de uma cadeia leve em associação não covalente, estreita. Da dobra desses dois domínios emanam seis alças hipervariáveis (3 alças de cada uma da cadeia pesada e da cadeia leve) que contribuem com os resíduos de aminoácido para ligação de antígeno e conferem especificidade de ligação a antígeno para o anticorpo. No entanto, mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antígeno) tem a habilidade em reconhecer e ligar antígeno, embora em uma afinidade menor do que o sítio de ligação inteiro.

[0095] “Fv de cadeia única”, também abreviado como “sFv” ou “scFv”, são fragmentos de anticorpo que compreendem os domínios de anticorpo V_H e V_L conectados a uma cadeia de polipeptídeo única. Em algumas modalidades, o polipeptídeo scFv compreende ainda um ligante de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão de scFv, vide Plückthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0096] O termo “diacorpos” se refere a fragmentos de anticorpo pequenos preparados construindo fragmentos scFv (vide parágrafo anterior) tipicamente com ligantes curtos (tal como cerca de 5 a cerca de 10 resíduos) entre os domínios V_H e V_L de modo que emparelhamento intercadeia, mas não intracadeia, dos domínios V é obtido, resultando em um fragmento bivalente, isto é, fragmento tendo dois sítios de ligação a antígeno. Diacorpos biespecíficos são heterodímeros de dois fragmentos scFv “de cruzamento” em que os domínios V_H e V_L dos dois anti-

corpos estão presentes em cadeias de polipeptídeo diferentes. Diacorpos são descritos mais completamente na, por exemplo, EP 404,097; no WO 93/11161; e em Hollinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

[0097] Como no presente documento usado, o termo “CDR” ou “região de determinação de complementaridade” pretende significar os sítios de combinação de antígeno não contíguos encontrados dentro da região variável de polipeptídeos com ambas cadeias pesada e leve. Essas regiões particulares foram descritas por Kabat e outros, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat e outros, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991); Chothia e outros, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B. e outros, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948 (1997); MacCallum e outros, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996); Abhinandan e Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P. e outros, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003); e Honegger e Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001), onde as definições incluem sobreposições ou subconjuntos de resíduos de aminoácido quando comparados uns aos outros. No entanto, aplicação de qualquer definição para se referir a uma CDR de um anticorpo ou anticorpos enxertados ou variantes dos mesmos pretende estar dentro do escopo do termo como definido e usado no presente documento. Os resíduos de aminoácido que compreendem as CDRs como definido por cada uma das referências citadas acima são mostrados abaixo na Tabela 1 como uma comparação. Algoritmos e interfaces de predição de CDR são conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, Abhinandan e Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F. e outros, *Nucleic Acids Res.*, 38: D301-D307 (2010); e Adolf-Bryfogle J. e outros, *Nucleic Acids Res.*, 43: D432-D438 (2015). Os conteúdos das referências citadas nesse parágrafo são no presente documento incorporados a título de referência em suas totalidades para uso na presente invenção

e para inclusão possível em uma ou mais presentes reivindicações.

TABELA 1. DEFINIÇÕES DE CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

¹A numeração de resíduo segue a nomenclatura de Kabat e outros, *supra*

²A numeração de resíduo segue a nomenclatura de Chothia e outros, *supra*

³A numeração de resíduo segue a nomenclatura de McCallum e outros, *supra*

⁴A numeração de resíduo segue a nomenclatura de Lefrane e outros, *supra*

⁵A numeração de resíduo segue a nomenclatura de Honegger e Plückthun e outros, *supra*

[0098] A expressão “numeração de resíduo de domínio variável tal como em Kabat” ou “numeração de posição de aminoácido como em Kabat”, e suas variações, se refere ao sistema de numeração usado para domínios variáveis de cadeia pesada ou domínios variáveis de cadeia leve da compilação de anticorpos em Kabat e outros, *supra*. Usando esse sistema de numeração, a sequência de aminoácido linear real pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais correspondendo a um encurtamento de, ou inserção em, uma FR ou HVR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável de cadeia pesada pode incluir uma inserção de aminoácido única (resíduo 52a de acordo com Kabat) após o resíduo 52 de H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b e 82c, etc., de acordo com Kabat) após o resíduo 82 de FR da cadeia pesada. A numeração Kabat de resíduos pode ser determinada para um dado anticorpo através de alinhamento em regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada

Kabat “padrão”.

[0099] A menos que de outro modo indicado no presente documento, a numeração dos resíduos em uma cadeia pesada da imunoglobulina é aquela do índice EU como em Kabat e outros, *supra*. O “índice EU como em Kabat” se refere à numeração de resíduo do anticorpo EU IgG1 humano.

[0100] Resíduos de “estrutura principal” ou “FR” são aqueles resíduos de domínio variável diferentes dos resíduos de CDR como no presente documento definido.

[0101] O termo “anticorpos quiméricos” se refere a anticorpos em que uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico a ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a uma outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam uma atividade biológica da presente invenção (vide Patente U.S. No. 4.816.567; e Morrison e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

[0102] O termo “semissintético” em referência a um anticorpo ou porção de anticorpo significa que o anticorpo ou porção de anticorpo tem uma ou mais sequências de ocorrência natural e uma ou mais sequências de ocorrência não natural (isto é, sintéticas).

[0103] Formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, de roedor) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada do anticorpo não humano. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) em que resíduos de uma região hipervariável (HVR) do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou

primata não humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade de anticorpo desejada. Em alguns casos, resíduos de região de estrutura principal (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Ainda, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas das alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas das FRs são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais vide Jones e outros, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann e outros, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

[0104] Um “anticorpo humano” é um anticorpo que possui uma sequência de aminoácido correspondendo àquela de um anticorpo produzido por um humano e/ou foi feita usando qualquer uma das técnicas para fabricação de anticorpos humanos como no presente documento descrito. Essa definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo humanizado compreendendo resíduos de ligação a antígeno não humanos. Anticorpos humanos podem ser produzidos usando várias técnicas conhecidas no campo, incluindo bibliotecas de exibição de fago. Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos estão métodos descritos em Cole e outros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner e outros, *J. Immunol.*, 147(1):86-95

(1991). Vide também van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Anticorpos humanos podem ser preparados através da administração do antígeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta à provocação antigênica, mas cujos *loci* endógenos foram desabilitados, por exemplo, xenocamundongos imunizados (vide, por exemplo, Pat. U.S. Nos. 6.075.181 e 6.150.584 com relação à tecnologia XENOMOUSE™). Vide também, por exemplo, Li e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) com relação a anticorpos humanos gerados por meio de uma tecnologia de hibridoma de célula B humana.

[0105] “Porcentagem (%) de identidade de sequência de aminoácido” ou “homologia” com relação às sequências de polipeptídeo e anticorpo identificadas no presente documento é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácido em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido no polipeptídeo sendo comparado, após alinhamento das sequências considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. Alinhamento para propósitos de determinação da identidade de sequência de aminoácido percentual pode ser obtido de várias maneiras que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, usando software de computador publicamente disponível tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) ou MUSCLE. Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medição de alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para obter alinhamento máximo no comprimento inteiro das sequências sendo comparadas. Para os presentes propósitos, no entanto, valores de identidade de sequência de aminoácido % são gerados usando o programa de computador de comparação de sequência MUSCLE (Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* 5(1):113, 2004).

[0106] “Homólogo” se refere à similaridade de sequência ou identidade de sequência entre dois polipeptídeos ou entre duas moléculas de ácido nucleico. Quando uma posição em ambas sequências comparadas é ocupada pela mesma base ou subunidade de monômero de aminoácido, por exemplo, se uma posição em cada uma de duas moléculas de DNA é ocupada por adenina, então as moléculas são homólogas nessa posição. A porcentagem de homologia entre duas sequências é uma função do número de posições correspondentes ou homólogas compartilhadas pelas duas sequências dividido pelo número de posições comparadas vezes 100. Por exemplo, se 6 de 10 das posições em duas sequências forem correspondentes ou homólogas, então as duas sequências são 60% homólogas. A título de exemplo, as sequências de DNA ATTGCC e TATGGC compartilham 50% de homologia. Em geral, é feita uma comparação quando duas sequências são alinhadas para dar homologia máxima.

[0107] O termo “domínio constante” se refere à porção de uma molécula de imunoglobulina tendo uma sequência de aminoácido mais conservada em relação à outra porção da imunoglobulina, o domínio variável, que contém o sítio de ligação a antígeno. O domínio constante contém os domínios CH₁, CH₂ e CH₃ (coletivamente, C_H) da cadeia pesada e o domínio CHL (ou C_L) da cadeia leve.

[0108] As “cadeias leves” de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de mamífero podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, chamados kappa (“κ”) e lambda (“λ”), com base nas sequências de aminoácido de seus domínios constantes.

[0109] O “domínio CH1” de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio “C1” de “H1”) geralmente se estende mais ou menos do aminoácido 118 para mais ou menos o aminoácido 215 (sistema de numeração EU).

[0110] “Região de dobra” é geralmente definida como extensão de

Glu216 até Pro230 de IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985)). Regiões de dobra de outros isotipos de IgG podem ser alinhadas com a sequência de IgG1 pondo os primeiro e último resíduos de cisteína formando ligações S-S intercadeia pesada nas mesmas posições.

[0111] O “domínio CH2” de uma região Fc de IgG humana (também referido como domínio “C2” de “H2”) geralmente se estende mais ou menos do aminoácido 231 até mais ou menos o aminoácido 340. O domínio CH2 é único pelo fato que ele não é intimamente emparelhado com um outro domínio. Ao contrário, duas cadeias de carboidrato ramificadas N-ligadas são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula de IgG nativa intacta. Foi especulado que o carboidrato pode prover um substituto para o emparelhamento domínio-domínio e ajuda a estabilizar o domínio CH2. Burton, *Molec Immunol.* 22:161-206 (1985).

[0112] O domínio “CH3” (também referido como domínio “C2” ou “H3”) compreende a extensão de resíduos C-terminais até um domínio CH2 em uma região Fc (isto é, mais ou menos do resíduo de aminoácido 341 para a extremidade C-terminal de uma sequência de anticorpo, tipicamente no resíduo de aminoácido 446 ou 447 de uma IgG).

[0113] O termo “região Fc” ou “região cristalizável de fragmento” no presente documento é usado para definir uma região C-terminal de uma cadeia pesada da imunoglobulina, incluindo regiões Fc de sequência nativa e regiões Fc variantes. Embora os limites da região Fc de uma cadeia pesada da imunoglobulina possam variar, a região Fc de cadeia pesada da IgG humana é geralmente definida se estender de um resíduo de aminoácido na posição Cys226, ou da Pro230, até o seu terminal carboxila. A lisina C-terminal (resíduo 447 de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante produção ou purificação do anticorpo, ou através da engenharia recombinante do ácido nucleico codificando uma cadeia pesada do anticorpo.

Sendo assim, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpo com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpo sem quaisquer resíduos K447 removidos e populações de anticorpo tendo uma mistura de anticorpos com e sem o resíduo K447. Regiões Fc de sequência nativa adequadas para uso nos anticorpos descritos no presente documento incluem IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 ou IgG4.

[0114] “Receptor de Fc” ou “FcR” descreve um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e formas alternativamente unidas desses receptores, receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um “receptor de ativação”) e FcγRIIB (um “receptor de inibição”), que têm sequências de aminoácido similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplásmicos. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de inibição à base de tirosina imunorreceptor (ITIM) em seu domínio citoplásmico (Vide M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). FcRs são revistos em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel e outros, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas e outros, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são compreendidos pelo termo “FcR” no presente documento.

[0115] O termo “epítopo” como no presente documento usado se refere ao grupo específico de átomos ou aminoácidos ou um antígeno ao qual um anticorpo ou porção de anticorpo se liga. Dois anticorpos ou porções de anticorpo podem se ligar ao mesmo epítopo dentro de um antígeno se eles exibirem ligação competitiva com o antígeno.

[0116] Como no presente documento usado, uma primeira porção

de anticorpo “compete” por ligação a um antígeno-alvo com uma segunda porção de anticorpo quando a primeira porção de anticorpo inibe a ligação de antígeno-alvo da segunda porção de anticorpo em pelo menos 50% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%) na presença de uma concentração equimolar da primeira porção de anticorpo ou vice-versa. Um processo de alto rendimento para anticorpos “binning” baseado em sua competição cruzada é descrito na Publicação PCT No. WO 03/48731.

[0117] Como no presente documento usado, os termos “se liga especificamente”, “reconhecendo especificamente” e “é específico para” se referem a interações mensuráveis e reproduzíveis, tal como ligação entre um alvo e um anticorpo ou porção de anticorpo, que é determinante da presença do alvo na presença de uma população heterogênea de moléculas, incluindo moléculas biológicas. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo que reconhece especificamente um alvo (que pode ser um epítipo) é um anticorpo ou porção de anticorpo que se liga a esse alvo com maior afinidade, avidéz, mais prontamente e/ou com maior duração do que sua ligação a outros alvos. Em algumas modalidades, o grau de ligação de um anticorpo a um alvo não relacionado é menos do que cerca de 10% da ligação do anticorpo ao alvo conforme medido, por exemplo, por um radioimunoensaio (RIA). Em algumas modalidades, um anticorpo que se liga especificamente a um alvo tem uma constante de dissociação (KD) $\leq 10^{-5}$ M, $\leq 10^{-6}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, $\leq 10^{-11}$ M ou $\leq 10^{-12}$ M. Em algumas modalidades, um anticorpo liga especificamente um epítipo em uma proteína que é conservada entre as proteínas de espécies diferentes. Em algumas modalidades, ligação específica pode incluir, mas não requer, ligação exclusiva. Especificidade de ligação do anticorpo ou domínio de ligação a antígeno

pode ser determinada experimentalmente através de métodos conhecidos na técnica. Tais métodos compreendem, mas não estão limitados a, *Western blots*, testes ELISA, RIA, ECL, IRMA, EIA, BIACORE™ e varreduras de peptídeo.

[0118] Um anticorpo (ou construto) “isolado” é um que foi identificado, separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente de produção (por exemplo, natural ou recombinante). Preferivelmente, o polipeptídeo isolado é livre de associação com todos os outros componentes de seu ambiente de produção.

[0119] Uma molécula de ácido nucleico “isolada” codificando um construto, anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo descrito no presente documento é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual ela está comumente associada no ambiente no qual ela foi produzida. Preferivelmente, o ácido nucleico isolado é livre de associação com todos os componentes associados com o ambiente de produção. As moléculas de ácido nucleico isoladas codificando os polipeptídeos e anticorpos descritos no presente documento estão em uma forma diferente da forma ou ambiente em que ela é encontrada na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas, portanto, são distinguidas de ácido nucleico codificando os polipeptídeos e anticorpos descritos no presente documento existentes naturalmente em células. Um ácido nucleico isolado inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que contêm comumente a molécula de ácido nucleico, mas a molécula de ácido nucleico está presente extracromossomalmente ou em um local cromossomal que é diferente de seu local cromossomal natural.

[0120] O termo “sequências de controle” se refere a sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência de codificação

operavelmente ligada em um organismo hospedeiro particular. As sequências de controle que são adequadas para procariontes, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador, e um sítio de ligação de ribossomo. Células eucarióticas são conhecidas utilizar promotores, sinais de poliadenilação e potencializadores.

[0121] Ácido nucleico é “operavelmente ligado” quando ele é posto em uma relação funcional com uma outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, DNA para uma pré-sequência ou líder secretor é operavelmente ligado a DNA para um polipeptídeo se ele for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou potencializador é operavelmente ligado a uma sequência de codificação se ele afetar a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação de ribossomo é operavelmente ligado a uma sequência de codificação se ele for posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, “operavelmente ligado” significa que as sequências de DNA sendo ligadas são contíguas e, no caso de um líder secretor, contíguas e em fase de leitura. No entanto, potencializadores não têm que ser contíguos. Ligação é realizada através de ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, os adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeo sintéticos são usados de acordo com prática convencional.

[0122] O termo “vetor”, como no presente documento usado, se refere a uma molécula de ácido nucleico capaz de propagar um outro ácido nucleico ao qual ela é ligada. O termo inclui o vetor como uma estrutura de ácido nucleico autorreplicante bem como o vetor incorporado ao genoma de uma célula hospedeira na qual ele foi introduzido. Certos vetores são capazes de direcionar a expressão de ácidos nucleicos aos quais eles estão operavelmente ligados. Tais vetores são referidos no presente documento como “vetores de expressão”.

[0123] O termo “transfectado” ou “transformado” ou “transduzido” como no presente documento usado se refere a um processo através

do qual ácido nucleico exógeno é transferido ou introduzido na célula hospedeira. Uma célula “transfectada” ou “transformada” ou “transduzida” é uma que foi transfectada, transformada ou transduzida com ácido nucleico exógeno. A célula inclui célula-objeto primária e sua progênie.

[0124] Os termos “célula hospedeira”, “linhagem de célula hospedeira” e “cultura de célula hospedeira” são usados intercomutavelmente e se referem a células em que ácido nucleico exógeno foi introduzido, incluindo a progênie de tais células. Células hospedeiras incluem “transformantes” e “células transformadas”, que incluem a célula transformada primária e progênie derivada da mesma sem considerar o número de passagens. A progênie pode não ser completamente idêntica em teor de ácido nucleico a uma célula parental, mas pode conter mutações. Progênie mutante que tem a mesma função ou atividade biológica conforme avaliado ou selecionado na célula originalmente transformada é incluída no presente documento.

[0125] Como no presente documento usado, “tratamento” ou “tratando” é uma abordagem para obtenção de resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para propósitos da presente invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, mas não estão limitados a, um ou mais do que segue: alívio de um ou mais sintomas resultantes da doença, diminuição do grau da doença, estabilização da doença (por exemplo, prevenção ou retardo da piora da doença), prevenção ou retardo do espalhamento (por exemplo, metástase) da doença, prevenção ou retardo da recorrência da doença, retardo ou diminuição da progressão da doença, melhora do estado da doença, provisão de uma remissão (parcial ou total) da doença, diminuição da dose de uma ou mais outras medicações necessárias para tratar a doença, retardo da progressão da doença, aumento ou melhora da qualidade de vida, aumento de ganho de peso e/ou prolongamento da sobrevivência.

Também compreendido por “tratamento” é uma redução de consequência patológica de câncer (tal como, por exemplo, volume do tumor). Os métodos da invenção compreendem qualquer um ou mais desses aspectos de tratamento.

[0126] No contexto de câncer, o termo “tratar” inclui qualquer um ou todos de: inibição de crescimento de células de câncer, inibição da replicação de células de câncer, diminuição da carga de tumor geral e melhora de um ou mais sintomas associados com a doença.

[0127] No contexto de uma doença autoimune, o termo “tratar” inclui qualquer um ou todos de: evitar replicação de células associadas com um estado de doença autoimune incluindo, mas não limitado a, células capazes de produzir um anticorpo autoimune, diminuição da carga de anticorpo autoimune e melhora de um ou mais sintomas de uma doença autoimune. No contexto de uma doença infecciosa, o termo “tratar” inclui qualquer um ou todos de prevenção do crescimento, multiplicação ou replicação do patógeno que causa a doença infecciosa e melhora de um ou mais sintomas da doença infecciosa. No contexto de uma doença isquêmica, o termo “tratar” inclui qualquer um ou todos de prevenção do crescimento, multiplicação ou replicação do patógeno que causa a doença isquêmica e melhora de um ou mais sintomas de uma doença isquêmica.

[0128] O termo “inibição” ou “inibir” se refere a uma diminuição ou cessação de qualquer característica fenotípica ou à diminuição ou cessação na incidência, grau ou probabilidade dessa característica. “Reduzir” ou “inibir” é diminuir, reduzir ou parar uma atividade, função e/ou quantidade comparado com uma referência. Em certas modalidades, por “reduzir” ou “inibir” quer dizer a habilidade em causar uma diminuição geral de 20% ou mais. Em uma outra modalidade, por “reduzir” ou “inibir” quer dizer a habilidade em causar uma diminuição geral de 50% ou mais. Em ainda uma outra modalidade, por “reduzir” ou “inibir” quer

dizer a habilidade em causar uma diminuição geral de 75%, 85%, 90%, 95% ou mais.

[0129] Uma “referência”, como no presente documento usado, se refere a qualquer amostra, padrão ou nível que é usado para propósitos de comparação. Uma referência pode ser obtida de uma amostra saudável e/ou não doente. Em alguns exemplos, uma referência pode ser obtida de uma amostra não tratada. Em alguns exemplos, uma referência é obtida de uma amostra não doente ou não tratada de um indivíduo único. Em alguns exemplos, uma referência é obtida de um ou mais indivíduos saudáveis que não são o indivíduo ou paciente.

[0130] Como no presente documento usado, “retardar o desenvolvimento de uma doença” significa adiar, parar, deixar lento, retardar, estabilizar, suprimir e/ou postergar o desenvolvimento da doença (tal como câncer). Esse retardo pode ser de comprimentos de tempo variáveis, dependendo da história da doença e/ou indivíduo sendo tratado. Como é evidente a um versado na técnica, um retardo suficiente ou significativo pode, na realidade, compreender prevenção, pelo fato que o indivíduo não desenvolve a doença. Por exemplo, um câncer em estágio terminal, tal como desenvolvimento de metástase, pode ser retardado.

[0131] “Prevenção”, como no presente documento usado, inclui provisão de profilaxia com relação à ocorrência ou recorrência de uma doença em um indivíduo que pode ser predisposto à doença, mas não foi ainda diagnosticado com a doença.

[0132] Como no presente documento usado, “suprimir” uma função ou atividade é reduzir a função ou atividade quando comparado com as mesmas condições exceto por uma condição ou parâmetro de interesse, ou alternativamente, comparado com uma outra condição. Por exemplo, um anticorpo que suprime crescimento de tumor reduz a taxa de crescimento do tumor comparado com a taxa de crescimento do tumor na ausência do anticorpo.

[0133] Os termos “sujeito”, “indivíduo” e “paciente” são usados no presente documento intercomutavelmente para se referir a um mamífero, incluindo, mas não limitado a, humano, bovino, cavalo, felino, canino, roedor ou primata. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

[0134] Uma “quantidade eficaz” de um agente se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter o resultado terapêutico ou profilático desejado. O termo se aplica também a uma dose que proverá uma imagem para detecção através de qualquer um dos métodos de imagem descritos no presente documento. A dose específica pode variar dependendo de um ou mais de: o agente particular escolhido, o regime de dosagem a ser seguido, se ela é administrada em combinação com outros compostos, momento de administração, o tecido a ter imagem feita e o sistema de administração físico em que ela é manejada.

[0135] Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” de uma substância/molécula da invenção, agonista ou antagonista pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a habilidade da substância/molécula, agonista ou antagonista em eliciar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da substância/molécula, agonista ou antagonista são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações.

[0136] Uma “quantidade profilaticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, a dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, mas não necessariamente, uma vez que uma dose profilática é usada em indivíduos

antes da ou em um estágio inicial da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menos do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

[0137] Os termos “formulação farmacêutica” e “composição farmacêutica” se referem a uma preparação que está em tal forma de modo a permitir que a atividade biológica do(s) ingrediente(s) ativo(s) seja eficaz, e que não contenha quaisquer componentes adicionais que sejam inaceitavelmente tóxicos a um indivíduo ao qual a formulação seria administrada. Tais formulações podem ser estéreis.

[0138] Um “veículo farmaceuticamente aceitável” se refere a uma carga, diluente, material encapsulante, auxiliar de formulação ou veículo sólido, semissólido ou líquido não tóxico convencional na técnica para uso com um agente terapêutico que juntos compreendem uma “composição farmacêutica” para administração a um indivíduo. Um veículo farmaceuticamente aceitável é não tóxico para recipientes nas dosagens e concentrações usadas e é compatível com outros ingredientes da formulação. O veículo farmaceuticamente aceitável é apropriado para a formulação usada.

[0139] Uma formulação “estéril” é asséptica ou essencialmente livre de micro-organismos vivos e seus esporos.

[0140] Administração “em combinação com” um ou mais agentes terapêuticos adicionais inclui administração simultânea (concomitante) e consecutiva ou sequencial em qualquer ordem.

[0141] O termo “concomitantemente” é usado no presente documento para se referir à administração de dois ou mais agentes terapêuticos, onde pelo menos parte da administração se sobrepõe em tempo ou onde a administração de um agente terapêutico se encontra dentro de um período de tempo curto em relação à administração do outro agente terapêutico. Por exemplo, os dois ou mais agentes terapêuticos são administrados com uma separação de tempo de não mais do que cerca de 60 minutos, tal como não mais do que cerca de 30, 15, 10, 5

ou 1 minuto.

[0142] O termo “sequencialmente” é usado no presente documento para se referir à administração de dois ou mais agentes terapêuticos onde a administração de um ou mais agente(s) terapêutico(s) continua após a descontinuação da administração de um ou mais outro(s) agente(s). Por exemplo, administração dos dois ou mais dos agentes terapêuticos é feita com uma separação de tempo de mais do que cerca de 15 minutos, tal como cerca de qualquer um de 20, 30, 40, 50 ou 60 minutos, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 1 semana, 2 semanas ou 1 mês ou mais.

[0143] Como no presente documento usado, “em conjunto com” se refere à administração de uma modalidade de tratamento em adição a uma outra modalidade de tratamento. Desta maneira, “em conjunto com” se refere à administração de uma modalidade de tratamento antes, durante ou após administração da outra modalidade de tratamento ao indivíduo.

[0144] O termo “bula” é usado para se referir a instruções comumente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informação sobre as indicações, uso, dosagem, administração, terapia de combinação, contraindicações e/ou avisos com relação ao uso de tais produtos terapêuticos.

[0145] Um “artigo de fabricação” é qualquer manufatura (por exemplo, uma embalagem ou recipiente) ou estojo compreendendo pelo menos um reagente, por exemplo, um medicamento para tratamento de uma doença ou distúrbio (por exemplo, câncer) ou uma sonda para detectar especificamente um biomarcador descrito no presente documento. Em certas modalidades, a manufatura ou estojo é promovido, distribuído ou vendido como uma unidade para realização do método descrito no presente documento.

[0146] É compreendido que modalidades da invenção descritas no

presente documento incluem modalidades “consistindo” e/ou “consistindo essencialmente em”.

[0147] Referência a “cerca de” um valor ou parâmetro no presente documento inclui (e descreve) variações que são direcionadas àquele valor ou parâmetro per se. Por exemplo, descrição se referindo a “cerca de X” inclui descrição de “X”.

[0148] Como no presente documento usado, referência a “não” um valor ou parâmetro geralmente significa e descreve “outro que não seja” um valor ou parâmetro. Por exemplo, o método não é usado para tratar câncer de tipo X significa que o método é usado para tratar câncer de tipos que não o tipo X.

[0149] O termo “cerca de X-Y” usado no presente documento tem o mesmo significado que “cerca de X a cerca de Y”.

[0150] Como no presente documento usado e nas reivindicações apenas, as formas singulares “um, uma”, “ou” e “o, a” incluem referentes no plural a menos que o contexto dite claramente o contrário.

II. Métodos de imagem

[0151] Um aspecto do primeiro pedido provê um método de determinação da distribuição e/ou nível de expressão de um ligante de ponto de checagem imune em um indivíduo usando um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o método compreende determinação da distribuição e/ou nível de expressão de dois ou mais ligantes de ponto de checagem imune no indivíduo.

[0152] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de um ligante de ponto de checagem imune em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que o fragmento de anticorpo se liga especificamente

ao ligante de ponto de checagem imune; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo

é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radio-nuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-trisacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é de mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂ e uma V_HH.

[0153] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de um ligante de ponto de checagem imune em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente

de imagem compreendendo um scFv marcado com um radionuclídeo, em que o scFv liga especificamente o ligante de ponto de checagem imune; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar o agente de imagem através da marcação do scFv com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo o scFv não marcado com o radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o

radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, o scFv é conjugado a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, o scFv tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o scFv reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, o scFv é humanizado. Em algumas modalidades, o scFv é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, o scFv tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H , um ligante peptídico opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L , um ligante peptídico opcional e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0154] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de um ligante de ponto de checagem imune em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc, em que o fragmento de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-

H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H , um ligante peptídico opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L , um ligante peptídico opcional e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo

cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0155] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de PD-L1 em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo (por exemplo, um scFv) marcado com um radionuclídeo, em que o fragmento de anticorpo liga especificamente PD-L1; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão de PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente,

intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 não é mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é estável em pH

ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_{HH} . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv fundido a um Fc.

[0156] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de um ligante do tipo PD-L1 em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo (por exemplo, um scFv) marcado com um radionuclídeo, em que o fragmento de anticorpo liga especificamente o ligante do tipo PD-L1; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva. Em algumas modalidades, o ligante do tipo PD-L1 é um ligante de PD-1 de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o ligante do tipo PD-L1 é um ligante de PD-1 de ocorrência não natural e em que o ligante do tipo PD-L1 foi administrado ao indivíduo. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante tipo PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas

modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é de mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante

de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti- é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_{HH} . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv fundido a um Fc.

[0157] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de PD-L1 em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de ami-

noácido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão de PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0158] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de PD-L1 em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo um scFv anti-PD-L1 marcado com um radionuclídeo; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva, em que o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão de PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da

marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 é humanizado. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo

cisteína engenheirado na posição 100 da V_L , ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0159] Em algumas modalidades, é provido um método de determinação da distribuição de PD-L1 em um indivíduo, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo; e (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma anti-PD-L1 scFv fundido a um Fragmento Fc e em que o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:

43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão de PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo

menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L, ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti. Em

algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0160] Os métodos descritos no presente documento podem ser usados para determinar a distribuição de um ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou ligantes do tipo PD-L1) em um indivíduo ou um tecido de interesse em um indivíduo. O método pode também prover informação qualitativa ou quantitativa sobre o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um ou mais tecidos ou órgão de um indivíduo. Ainda, os métodos descritos no presente documento podem permitir imagem de um indivíduo durante um período de tempo, por exemplo, através da provisão de uma pluralidade de conjuntos de resultados de imagem em pontos de tempo diferentes após a administração do agente de imagem ao indivíduo. Em algumas modalidades, a imagem é realizada por pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais vezes durante um período entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 1 hora, 1 hora a 2 horas, 2 horas a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas, 12 horas a 24 horas, 1 hora a 4 horas ou 1 hora a 8 horas). Em algumas modalidades, a imagem é feita entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem, por exemplo, entre cerca de qualquer um de 10 minutos a 1 hora, 1 hora a 2 horas, 2 horas a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas, 12 horas a 24 horas, 1 hora a 4 horas ou 1 hora a 8 horas.

[0161] Métodos de imagem usando polipeptídeos marcados são bem conhecidos na técnica, e qualquer um de tais métodos conhecidos pode ser usado com os agentes de imagem descritos no presente documento. Vide, por exemplo, Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal

Antibodies for Imaging and Therapy (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, Gennaro e outros. (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990) e Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," em Biotechnology and Pharmacy 227-49, Pezzuto e outros. (eds.) (Chapman & Hall 1993). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva usa radionuclídeos de emissão de pósitrons (isótopos PET), tal como com uma energia de cerca de 511 keV, tais como ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu e ^{124}I . Tais radionuclídeos podem ter imagem capturada através de técnicas de varredura por PET bem conhecidas. Vide, também, Patentes U.S. Nos. 6.953.567; 9.884.131 e publicação de pedido de patente internacional No. WO2016149188A1 e Kim, H.Y. e outros, (2018) PLoS ONE 13(3): e0192821, que são no presente documento incorporados a título de referência.

[0162] Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem de tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem de tomografia de emissão de pósitron (PET). Em algumas modalidades, imagem SPECT ou PET é combinada com um ou mais outro método de imagem não invasivo, que pode ou não ser baseado nos sinais do agente de imagem. Por exemplo, PET pode ser combinado com imagem de tomografia computadorizada (CT), imagem de ressonância magnética (MRI), imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica.

[0163] Os métodos de imagem descritos no presente documento são adequados para detecção de ligantes de ponto de checagem imune em níveis de expressão baixo, moderado ou alto. Em algumas modalidades, o método de imagem provê informação dinâmica sobre o nível de expressão e distribuição do ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o método de imagem é capaz de detectar o

ligante de ponto de checagem imune em situações que seriam desafiadoras para outros métodos de detecção, tal como imunoistoquímica (IHC). Por exemplo, em algumas modalidades, o tecido de interesse é negativo para o ligante de ponto de checagem imune com base em um ensaio de imunoistoquímica (IHC) ou um outro ensaio. Ensaios moleculares que podem ser usados para detecção da presença ou ausência de um ligante de ponto de checagem imune incluem, mas não estão limitados a, ensaios baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR), ensaios de sequenciamento de próxima geração (NGS), ensaios de hibridização e ELISA. Em algumas modalidades, o tecido de interesse tem um nível de expressão baixo do ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o tecido de interesse expressa apenas o ligante de ponto de checagem imune quando da infiltração de células imunes.

[0164] O agente de imagem pode ser administrado ao indivíduo usando qualquer dosagem ou vias de administração adequadas. A via de administração está de acordo com métodos conhecidos e aceitos, tal como através de bolus ou infusão único ou múltiplo durante um período de tempo de uma maneira adequada, por exemplo, injeção ou infusão através de via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-arterial, intralesional, intra-articular, intratumoral ou oral. A determinação da dosagem ou via de administração apropriada está dentro da habilidade de um versado na técnica. Experimentos em animais proveem orientação confiável para a determinação de doses eficazes para aplicações de diagnóstico humanas. Aumento interespecie de doses eficazes pode ser realizado seguindo os princípios estabelecidos por Morienti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi e outros, Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46.

Diagnóstico e tratamento

[0165] Os métodos descritos no presente documento são úteis para diagnóstico e como um método de diagnóstico complementar para tratamento de uma variedade de doenças e condições que estão associadas com resposta imune anormal. Em algumas modalidades, a doença ou condição está associada com imunodeficiência. Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, doença infecciosa, doença autoimune ou uma doença metabólica.

[0166] Em algumas modalidades, é provido um método de diagnóstico de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) determinar a distribuição de um ligante de ponto de checagem imune no indivíduo usando qualquer um dos métodos para determinação da distribuição de um ligante de ponto de checagem imune descrito no presente documento; e (b) diagnóstico do indivíduo como positivo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem for detectado em um tecido de interesse, ou diagnóstico do indivíduo como negativo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem não for detectado em um tecido de interesse. Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, infecção, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1.

[0167] Em algumas modalidades, é provido um método de diagnóstico de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que o fragmento de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune; (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva; e (c) diagnóstico do indivíduo como positivo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem for detectado em um tecido de interesse ou diagnóstico do

indivíduo como negativo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem não for detectado em um tecido de interesse. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{664}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em

algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é de mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_HH . Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, infecção, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um Fragmento Fc (tal como um Fc de IgG1 humana).

[0168] Em algumas modalidades, é provido um método de diagnóstico de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo; (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva; e (c) diagnóstico do indivíduo como positivo para PD-L1 se sinal do agente de imagem for detectado em um tecido de interesse ou diagnóstico do indivíduo como negativo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem não for detectado em um tecido de interesse; em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão de PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de

imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quela-

ção do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, infecção, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um Fragmento Fc (tal como um Fc de IgG1 humana). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39.

[0169] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) diagnóstico do indivíduo usando qualquer método de diagnóstico descrito no presente documento; e (b) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente terapêutico se direcionando ao ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo, se o indivíduo for diagnosticado como positivo para o ligante de ponto de checa-

gem imune. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é um inibidor do ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é uma molécula radiomarcada se ligando especificamente ao ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo. Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, infecção, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1.

[0170] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que o fragmento de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune; (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica de imagem não invasiva; (c) diagnóstico do indivíduo como positivo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem for detectado em um tecido de interesse ou diagnóstico do indivíduo como negativo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem não for detectado em um tecido de interesse; e (d) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente terapêutico se direcionando ao ligante de ponto de checagem imune ou seu receptor (por exemplo, um inibidor do ligante de ponto de checagem imune ou receptor do mesmo ou uma molécula radiomarcada ligando especificamente o ligante de ponto de checagem imune ou seu receptor), se o indivíduo for diagnosticado como positivo para o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão do ligante de ponto de checagem imune em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas

modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção

de anticorpo não é de mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_HH . Em algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, infecção, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um Fragmento Fc (tal como um Fc de IgG1 humana).

[0171] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de um indivíduo tendo uma doença ou condição, compreendendo: (a) administrar ao indivíduo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo; (b) imagem do agente de imagem no indivíduo com uma técnica

de imagem não invasiva; (c) diagnóstico do indivíduo como positivo para PD-L1 se sinal do agente de imagem for detectado em um tecido de interesse ou diagnóstico do indivíduo como negativo para o ligante de ponto de checagem imune se sinal do agente de imagem não for detectado em um tecido de interesse; e (d) administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente terapêutico se direcionando a PD-L1 ou PD-1 (por exemplo, um inibidor de PD-L1 ou PD-1, tal como um anticorpo anti-PD-L1 ou um anticorpo anti-PD-1; ou uma molécula radio-marcada ligando especificamente PD-L1 ou PD-1), se o indivíduo for diagnosticado como positivo para PD-L1, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda determinar o nível de expressão de PD-L1 em um tecido de interesse no indivíduo com base em sinais emitidos pelo agente de imagem a partir do tecido. Em algumas modalidades, o método compreende ainda preparar um agente de imagem através da marcação da porção de anticorpo com o radionuclídeo. Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende imagem por tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou imagem de tomografia por emissão de pósitrons (PET). Em algumas modalidades, a técnica de imagem não invasiva compreende ainda imagem

de tomografia computadorizada, imagem de ressonância magnética, imagem de luminescência química ou imagem de luminescência eletroquímica. Em algumas modalidades, o agente de imagem é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente. Em algumas modalidades, a imagem é realizada entre cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas após a administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administrar ao indivíduo uma porção de anticorpo não marcada com um radioisótopo antes da administração do agente de imagem. Em algumas modalidades, o método compreende imagem do indivíduo durante um período de tempo. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em

algumas modalidades, a doença ou condição é câncer, infecção, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um Fragmento Fc (tal como um Fc de IgG1 humana). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39.

[0172] Em algumas modalidades, o indivíduo tem câncer. O câncer pode compreender tumores não sólidos (tais como tumores hematológicos, por exemplo, leucemias e linfomas) ou pode compreender tumores sólidos. Cânceres exemplares que podem ser diagnosticados usando os métodos descritos no presente documento incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, blastoma e sarcoma, e certas leucemias e males linfoides, tumores benignos e malignos e malignidades, por exemplo, sarcomas, carcinomas e melanomas. Tumores/cânceres adultos e tumores/cânceres pediátricos estão também incluídos. Cânceres sólidos ou hematológicos discutidos no presente documento incluem,

mas não estão limitados a, linfoma de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, sarcomas e carcinomas tais como fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tecido mole, sacronomassinovioma uterino, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma de cólon, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, carcinoma da glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma da célula renal, hepatoma, carcinoma do duto da bile, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma de pulmão de pequenas células, carcinoma da bexiga, carcinoma epitelial e melanoma.

[0173] Os métodos descritos no presente documento são aplicáveis a cânceres sólidos ou hematológicos de todos os estágios, incluindo estágios I, II, III e IV, de acordo com os grupos de estadiamento do American Joint Committee on Cancer (AJCC). Em algumas modalidades, o câncer sólido ou hematológico é um: câncer em estágio inicial, câncer não metastático, câncer primário, câncer avançado, câncer localmente avançado, câncer metastático ou câncer em remissão.

[0174] Em algumas modalidades, o indivíduo tem um câncer hematológico. Cânceres hematológicos exemplares que podem ser diagnosticados usando os métodos descritos no presente documento incluem, mas não estão limitados, leucemia, linfoma, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia não linfoblástica aguda (ANLL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia mieloide crônica (CML), linfoma não Hodgkin e linfoma de Hodgkin.

[0175] Em algumas modalidades, o indivíduo tem um tumor sólido. Tumores sólidos exemplares que podem ser diagnosticados usando os métodos descritos no presente documento incluem, mas não estão limitados a, tumor de cólon, melanoma, tumor de rim, tumor ovariano, tumor de pulmão, tumor de mama e tumor pancreático.

[0176] Tratamentos para câncer podem ser avaliados, por exemplo, através de regressão de tumor, diminuição do peso ou tamanho do tumor, tempo para progressão, duração de sobrevivência, progressão de sobrevivência livre, taxa de resposta geral, duração de resposta, qualidade de vida, expressão e/ou atividade de proteína. Abordagens para determinar a eficácia da terapia podem ser usadas, incluindo, por exemplo, medição de resposta através de imagem radiológica.

[0177] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma doença infecciosa. A infecção pode ser causada por um vírus, bactéria, protozoário ou parasita. Patógenos exemplares incluem, mas não estão limitados a, *Acinetobacter baumannii*, gênero *Anaplasma*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, gênero *Aspergillus*, *Astroviridae*, gênero *Babesia*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, vírus BK, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, gênero *Borrelia*, *Borrelia* spp, gênero *Brucella*, *Brugia malayi*, família *Bunyaviridae*, *Burkholderia cepacia* e outras espécies *Burkholderia* s, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, família *Caliciviridae*, gênero *Campylobacter*, *Candida albicans*, *Candida* spp, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, príon CJD, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* spp, *Clostridium tetani*, *Coccidioides* spp, coronavírus, *Corynebacterium diphtheriae*, *Coxiella burnetii*, ví-

rus da febre hemorrágica de Crimean-Congo, *Cryptococcus neoformans*, gênero *Cryptosporidium*, Cytomegalovirus (CMV), Vírus da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), *Dientamoeba fragilis*, Vírus ebola (EBOV), gênero *Echinococcus*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, gênero *Ehrlichia*, *Entamoeba histolytica*, gênero *Enterococcus*, gênero *Enterovirus*, Enteroviruses, principalmente vírus Coxsackie A e Enterovírus 71 (EV71), *Epidermophyton* spp, Vírus Epstein-Barr (EBV), *Escherichia coli* O157:H7, O111 e O104:H4, *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica*, príon FFI, superfamília Filarioidea, Flavivírus, *Francisella tularensis*, gênero *Fusobacterium*, *Geotrichum candidum*, *Giardia intestinalis*, *Gnathostoma* spp, príon GSS, Guanarito vírus, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, Henipavirus (vírus Hendra, vírus Nipah), Vírus da Hepatite A, Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Hepatite D, Vírus da Hepatite E, vírus Herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), *Histoplasma capsulatum*, HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), *Hortaea werneckii*, Bocavírus humano (HBoV), Herpesvírus humano 6 (HHV-6) e Herpesvírus humano 7 (HHV-7), Metapneumovírus humano (hMPV), Papilomavírus humano (HPV), Vírus da parainfluenza humano (HPIV), Vírus da leucemia de célula T humano (HTLV-1), vírus da encefalite Japonesa, vírus JC, vírus Junin, herpesvírus associado do Sarcoma de Kaposi (KSHV), *Kingella kingae*, *Klebsiella granulomatis*, príon Kuru, vírus Lassa, *Legionella pneumophila*, gênero *Leishmania*, gênero *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, vírus da Coriomeningite linfocítica (LCMV), vírus Machupo, *Malassezia* spp, vírus Marburg, vírus do sarampo, *Metagonimus yokagawai*, *Microsporidia* phylum, vírus *Molluscum contagiosum* (MCV), vírus da caxumba, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Naegleria fowleri*, *Necator americanus*, *Neisseria gonor-*

rhoeae, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia* spp, *Onchocerca volvulus*, *Orientia tsutsugamushi*, família *Orthomyxoviridae* (Influenza), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paragonimus* spp, *Paragonimus westermani*, Parvovirus B19, gênero *Pasteurella*, gênero *Plasmodium*, *Pneumocystis jirovecii*, Poliovírus, vírus da raiva, vírus respiratório sincicial (RSV), Rinovírus, rinovírus, *Rickettsia akari*, gênero *Rickettsia*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, vírus da febre do vale de Rift, Rotavírus, vírus da rubéola, vírus Sabia, gênero *Salmonella*, *Sarcoptes scabiei*, coronavírus SARS, gênero *Schistosoma*, gênero *Shigella*, vírus Sin Nombre, Hantavírus, *Sporothrix schenckii*, gênero *Staphylococcus*, gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Strongyloides stercoralis*, gênero *Taenia*, *Taenia solium*, Vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (TBEV), *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichophyton* spp, *Trichuris trichiura*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Ureaplasma urealyticum*, vírus *Varicella zoster* (VZV), vírus *Varicella zoster* (VZV), Varíola maior ou Varíola menor, príon vCJD, vírus da encefalite equina Venezuelana, *Vibrio cholerae*, vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite equina Ocidental, *Wuchereria bancrofti*, vírus da febre amarela, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*.

[0178] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma doença autoimune. Doenças autoimunes exemplares incluem, mas não estão limitadas a, doença de Behcet, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla (escleroderma sistêmico e escleroderma sistêmico progressivo), escleroderma, polimiosite, dermatomiosite, periarterite nodosa (poliarterite nodosa e poliangiite microscópica), síndrome de aortite (arterite de Takayasu), artrite reumatoide maligna, artrite reumatoide, granuloma-

tose de Wegner, doença do tecido conectivo mista, síndrome de Sjogren, doença de Still de início no adulto, angiite granulomatosa alérgica, angiite de hipersensibilidade, síndrome de Cogan, RS3PE, arterite temporal, polimialgia reumática, síndrome da fibromialgia, síndrome do anticorpo antifosfolípideo, fasciite eosinofílica, doenças relacionadas a IgG4 (por exemplo, colangite esclerosante primária e pancreatite autoimune), síndrome de Guillain-Barre, miastenia grave, gastrite atrófica crônica, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, síndrome de aortite, síndrome de Goodpasture, glomerulonefrite rapidamente progressiva, anemia megaloblástica, anemia hemolítica autoimune, neutropenia autoimune, púrpura trombocitopênica idiopática, doença de Grave (hipertireoidismo), tireoidite de Hashimoto, insuficiência autoimune adrenal, hipotireoidismo primário, doença idiopática de Addison (insuficiência adrenal crônica), diabetes mellitus tipo I, lúpus eritematoso discoide crônico, escleroderma localizado, psoríase, artrite psoriática, pênfigo, pênfigoide, herpes gestacional, doença de pele bolhosa IgA linear, epidermólise bolhosa adquirida, alopecia areata, vitiligo, doença de Harada, neuropatia óptica autoimune, neuropatia óptica autoimune, azoospermia idiopática, perda fetal recorrente e doenças inflamatórias do intestino (colite ulcerativa e doença de Crohn).

[0179] Em algumas modalidades, o indivíduo tem uma doença metabólica associada com resposta imune anormal. Doenças metabólicas exemplares incluem, mas não estão limitadas a, doença inflamatória do intestino, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico.

III. Agentes de imagem

[0180] Um aspecto do presente pedido provê um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de

ponto de checagem imune. Qualquer um dos agentes de imagem descritos nessa seção pode ser usado nos métodos de determinação da distribuição e/ou nível de expressão de um ligante de ponto de checagem imune ou métodos de diagnóstico ou tratamento descritos no presente documento.

[0181] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-trisacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é de mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de

5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_HH .

[0182] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo conjugada a um composto de quelação que realiza quelação de um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é de mais

do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_{HH} .

[0183] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo descrita no presente documento tem uma meia-vida no soro adequada para taxa de eliminação rápida do corpo, a qual é condescendente com imagem *in vivo*. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida no soro de não mais do que cerca de qualquer um de 24 horas, 20 horas, 16 horas, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos ou menos. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida no soro de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas, incluindo, por exemplo, qualquer um de cerca de 10 minutos a cerca de 30 minutos, cerca de 30 minutos a cerca de 1 hora, cerca de 1 hora a cerca de 2 horas, cerca de 2 horas a cerca de 3 horas, cerca de 3 horas a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 6 horas, cerca de 6 horas

a cerca de 8 horas, cerca de 8 horas a cerca de 12 horas, cerca de 12 horas a cerca de 16 horas, cerca de 16 horas a cerca de 20 horas, cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, cerca de 10 minutos a cerca de 2 horas, cerca de 1 hora a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 8 horas, cerca de 8 horas a cerca de 12 horas ou cerca de 12 horas a cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é eliminada do corpo não mais do que cerca de qualquer um de 48 horas, 36 horas, 30 horas, 24 horas, 20 horas, 16 horas, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos ou menos. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é eliminada do corpo entre cerca de 10 minutos a cerca de 48 horas, incluindo, por exemplo, qualquer um de cerca de 10 minutos a cerca de 30 minutos, cerca de 30 minutos a cerca de 1 hora, cerca de 1 hora a cerca de 2 horas, cerca de 2 horas a cerca de 3 horas, cerca de 3 horas a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 6 horas, cerca de 6 horas a cerca de 8 horas, cerca de 8 horas a cerca de 12 horas, cerca de 12 horas a cerca de 16 horas, cerca de 16 horas a cerca de 20 horas, cerca de 20 horas a cerca de 24 horas, cerca de 24 horas a cerca de 36 horas, cerca de 36 horas a cerca de 48 horas, cerca de 10 minutos a cerca de 2 horas, cerca de 1 hora a cerca de 4 horas, cerca de 4 horas a cerca de 8 horas, cerca de 8 horas a cerca de 12 horas ou cerca de 12 horas a cerca de 48 horas.

[0184] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem um peso molecular baixo que permite sua eliminação rápida do corpo. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem um peso molecular de não mais do que cerca de qualquer um de 120 kDa, 110 kDa, 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa ou 30 kDa. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem um peso molecular de cerca de 15 kDa a cerca de 30 kDa, cerca de 30 kDa a cerca de 50 kDa, cerca de 50 kDa a cerca de 100 kDa, cerca de 80 kDa a cerca de 120 kDa ou cerca de 15 kDa a cerca de 120 kDa. Por exemplo, um scFv tem

um peso molecular de cerca de 27 kDa, um Fc tem um peso molecular de cerca de 26 kDa e um scFv-Fc tem um peso molecular de cerca de 80 kDa.

[0185] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma afinidade adequada com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D para o ligante de ponto de checagem imune que é mais forte do que cerca de qualquer um de 10^{-8} M, 9×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 1×10^{-9} M ou 9×10^{-10} M. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D para o ligante de ponto de checagem imune que é mais fraca do que cerca de qualquer um de 9×10^{-10} M, 1×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 9×10^{-9} M ou 10^{-8} M. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D para o ligante de ponto de checagem imune que é cerca de qualquer um de 9×10^{-10} M a 1×10^{-8} M, 9×10^{-10} M a 1×10^{-9} M, 1×10^{-9} M a 2×10^{-9} M, 2×10^{-9} M a 3×10^{-9} M, 3×10^{-9} M a 4×10^{-9} M, 4×10^{-9} M a 5×10^{-9} M, 5×10^{-9} M a 6×10^{-9} M, 6×10^{-9} M a 7×10^{-9} M, 7×10^{-9} M a 8×10^{-9} M, 8×10^{-9} M a 9×10^{-9} M, 9×10^{-9} M a 1×10^{-8} M, 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou 5×10^{-10} a 1×10^{-8} .

[0186] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido ou pH neutro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em um pH menor do que cerca de 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 ou menos. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em um pH ácido ou pH neutro por pelo menos cerca de qualquer um de 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias ou mais. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH básico, por exemplo, em um pH maior do que cerca de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ou mais. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em um pH básico por pelo menos

cerca de qualquer um de 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 3 dias, 5 dias, 7 dias ou mais. A estabilidade pode ser medida incubando o agente de imagem ou porção de anticorpo em um tampão tendo o pH correspondente durante um período de tempo (tal como 12 horas, 24 horas ou mais) e avaliando a integridade do agente de imagem ou porção de anticorpo usando métodos conhecidos na técnica, incluindo SDS-PAGE, espalhamento de luz dinâmica, cromatografia, RMN, etc.

[0187] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em uma temperatura elevada, por exemplo, em temperatura ambiente ou temperatura fisiológica. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão de pelo menos cerca de qualquer um de 50°C, 55°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C ou mais. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão de cerca de 55° a cerca de 70°C, incluindo, por exemplo, cerca de qualquer um de 55°C -60°C, 60°C -65°C, 50°C -65°C, 64°C -68 °C ou 65 °C -70°C. A temperatura de fusão de uma porção de anticorpo pode ser medida usando quaisquer métodos conhecidos na técnica incluindo, por exemplo, Fluorimetria de Varredura Diferencial (DSF).

[0188] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é engenheirada com uma ou mais ligações dissulfeto para aumentar a temperatura ou estabilidade de fusão da porção de anticorpo. Em algumas modalidades, em que a porção de anticorpo compreende um scFv, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína

engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Outras ligações dissulfeto engenheiradas podem ser introduzidas no scFv através de engenharia de uma cisteína na VH e uma cisteína na VL em posições adequadas com base na estrutura e sequências do scFv.

[0189] Porções de anticorpo compreendidas incluem, mas não estão limitadas a, anticorpos humanizados, anticorpos parcialmente humanizados, anticorpos totalmente humanizados, anticorpos semissintéticos, anticorpos quiméricos, anticorpos de camundongo, anticorpos humanos e anticorpos compreendendo as CDRs de cadeia pesada e/ou cadeia leve discutidas no presente documento, por exemplo, na seção “agentes de anticorpo anti-PD-L1”.

[0190] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reconhece especificamente o ligante de ponto de checagem imune de humano. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de duas ou mais espécies. Reatividade cruzada da porção de anticorpo com animais de modelo e humano facilita estudos clínicos do agente de imagem. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um animal não humano, tal como mamífero. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um roedor, tal como camundongo ou rato. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um primata não humano, tal como um macaco cynomolgus.

[0191] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um fragmento de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é um anticorpo de comprimento integral. Porções de anticorpo adequadas incluem, mas não estão limitadas a, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmentos Fv estabilizados com dissulfeto (dsFv), um

(dsFv)₂, V_HH e fusões com Fc dos mesmos. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Fragmentos de anticorpo e variantes que são adequados para agentes de imagem descritos no presente documento são descritos ainda na seção “Porções de anticorpo”. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um Fab. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc.

[0192] Portanto, em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo um scFv marcado com um radionuclídeo, em que o scFv liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ⁶⁸Ga. Em algumas modalidades, o scFv é conjugado a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, o scFv tem uma K_D entre cerca de 9×10⁻¹⁰ M a cerca de 1×10⁻⁸ M (tal como cerca de 9×10⁻¹⁰ a 1×10⁻⁹, cerca de 1×10⁻⁹ a 2×10⁻⁹, cerca de 2×10⁻¹⁰ a 5×10⁻⁹ ou cerca de 5×10⁻¹⁰ a 1×10⁻⁸) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o scFv reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, o scFv é humanizado. Em algumas modalidades, o scFv é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, o scFv tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como

cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H, um ligante peptídico opcional e uma V_L. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L, um ligante peptídico opcional e uma V_H. Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0193] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune e em que a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ⁶⁸Ga. Em algumas modalidades, a porção

de anticorpo é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H , um ligante peptídico opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L , um ligante peptídico opcional e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam

uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0194] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada conjugada a um composto de quelação (por exemplo, NOTA, DOTA, ou seus derivados) que quela um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune e em que a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo conjugada a NOTA que quela um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo não é de mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checa-

gem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂ e uma V_HH. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti.

[0195] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo a scFv conjugado a um composto de quelação (por exemplo, NOTA, DOTA ou derivado do mesmo) que quela um radionuclídeo (por exemplo, ⁶⁸Ga), em que o scFv liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo a scFv conjugado a NOTA que quela um radionuclídeo (por exemplo, ⁶⁸Ga), em que o scFv liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o scFv tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a

5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o scFv reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, o scFv é humanizado. Em algumas modalidades, o scFv é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, o scFv tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H , um ligante peptídico opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L , um ligante peptídico opcional e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti .

[0196] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo conjugada a NOTA que quela

um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune e em que a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é selecionado do grupo consistindo em PD-L1, PD-L2, B7-H3, galectina-9, CD80, CD86 e ICOSL. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma K_D entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H , um ligante peptídico opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L , um ligante peptídico opcional e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cis-

teína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti.

[0197] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 liga especificamente PD-L1. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ⁶⁸Ga. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 tem uma meia-vida de cerca de 10 minutos a cerca de 24 horas (tal como cerca de qualquer um de 10 minutos a 2 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 8 horas, 8 horas a 12 horas ou 12 horas a 24 horas) no soro. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 não é mais do que cerca de 120 kDa (tal como não mais do que cerca de 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa ou 100 kDa ou cerca de qualquer um de 30-50kDa, 50-100kDa ou 30-80kDa). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 tem uma K_D

entre cerca de 9×10^{-10} M a cerca de 1×10^{-8} M (tal como cerca de 9×10^{-10} a 1×10^{-9} , cerca de 1×10^{-9} a 2×10^{-9} , cerca de 2×10^{-10} a 5×10^{-9} ou cerca de 5×10^{-10} a 1×10^{-8}) com o ligante de ponto de checagem imune. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 reage cruzado com o ligante de ponto de checagem imune de um mamífero não humano (por exemplo, camundongo, rato ou macaco). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é estável em pH ácido (por exemplo, em um pH menor do que cerca de 6,5, 6,0, 5,5, ou 5,0). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 tem uma temperatura de fusão (T_m) de cerca de 55-70°C (tal como cerca de qualquer um de 55-60, 60-65 ou 65-70°C). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um diacorpo, um Fab, um Fab', um $F(ab')_2$, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um $(dsFv)_2$ e uma V_{HH} . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv fundido a um Fc. Porções de anticorpo anti-PD-L1 exemplares são discutidas em detalhes na seção “Agentes de anticorpo anti-PD-L1”.

Radionuclídeo

[0198] Os agentes de imagem descritos no presente documento compreendem um marcador. Para propósitos de diagnóstico, o marcador pode ser um radionuclídeo, um agente de contraste radiológico, um íon paramagnético, um metal, um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente, um agente de contraste de ultrassom e um agente fotoativo. Tais marcadores de diagnóstico são bem conhecidos e qualquer um de tais marcadores conhecidos pode ser usado.

[0199] Em algumas modalidades, o agente de imagem compreende um radionuclídeo. “Radionuclídeos” são frequentemente referidos como

“isótopos radioativos” ou “radioisótopos”. Radionuclídeos ou isótopos estáveis exemplares que podem ser ligados às porções de anticorpo descritas no presente documento incluem, mas não estão limitados a, ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, ^{83}Sr ou outros emissores de gama-, beta- ou pósitron. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga .

[0200] Íons paramagnéticos de utilizada podem incluir cromo (III), manganês (II), ferro (III), ferro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodímio (III), samário (III), itérbio (III), gadolínio (III), vanádio (II), térbio (III), disprósio (III), hólmio (III) ou érbio (III). Agentes de contraste de metal podem incluir lantânio (III), ouro (III), chumbo (II) ou bismuto (III). Agentes de diagnóstico radiopacos podem ser selecionados de compostos, compostos de bário, compostos de gálio e compostos de tálio. Uma ampla variedade de marcadores fluorescentes é conhecida na técnica incluindo, mas não limitado a, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeliterina, ficocianina, aloficocianina, oftaldeído e fluorescamina. Marcadores quimioluminescentes úteis podem incluir luminol, isoluminol um éster de acridínio aromático, um imidazol, um sal de acridínio ou um éster de oxalato.

[0201] Radioimunodeteção (RAID) surgiu como um campo clinicamente útil nos últimos 35 anos. Quase 1000 testes clínicos usando RAID foram conduzidos durante esse tempo, com algumas constatações claras e importantes. A maior facilidade dessa técnica para detectar lesões consideradas “ocultas” através de imagem convencional foi reconhecida mesmo nos estudos iniciais e tem sido repetidamente confirmada por estudos, sem importar o tipo de anticorpo, tumor ou radionuclídeo.

[0202] Muitos radionuclídeos, tais como ^{68}Ga , ^{99}Tc , ^{64}Cu e ^{18}F , são bons agentes de imagem de escolha. Eles geralmente têm uma energia gama ou beta que é ideal para imagem segura, são baratos e são prontamente disponíveis, sendo produzidos por gerador e livres de veículo. Sua meia-vida curta (menos de 6 horas) de pronto os leva a acoplamento com fragmentos de anticorpo para estudos de imagem iniciais.

[0203] Em algumas modalidades, o agente de imagem compreende um composto de quelação que quela o radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação quela um metal radioativo. Em algumas modalidades, o composto de quelação quela um metal ^{18}F . Em algumas modalidades, o composto de quelação é um composto de quelação hidrofílico, que pode ligar íons de metal e ajudar a assegurar eliminação *in vivo* rápida. Compostos de quelação adequados podem ser selecionados pelas suas propriedades de ligação a metal particulares, e substituição por técnicas de ligação cruzada químicas ou através do uso de quelantes com grupos reativos de cadeia lateral (tais como compostos de quelação bifuncionais) pode ser realizada apenas com experimentação de rotina.

[0204] Combinações de composto quelante de metal particularmente úteis incluem 2-benzil-DTPA (ácido dietilenotriamino pentaacético) e seus análogos de monometila e cicloexila, usados com isótopos de diagnóstico na faixa de energia geral de 60 a 4,000 keV, tais como ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{18}F , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{99}Tc , ^{94}Tc , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{76}Br , para radioimagem. Os mesmos compostos quelantes, quando complexados com metais não radioativos, tais como manganês, ferro de gadolínio, são úteis para MRI. Compostos quelantes macrocíclicos tais como NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N,N',N'',N'''*-tetraacético), TETA (ácido bromoacetamido-benzil-tetraetilaminotetraacético) e NETA ({4-[2-(bis-carboximetil-amino)-etil]-7-carboximetil-[1,4,7]triazonan-1-il}-

acético) são úteis com uma variedade de radiometais de diagnóstico, tais como gálio, ítrio e cobre. Tais complexos quelantes de metal podem ser tornados muito estáveis através da adaptação do tamanho do anel para o metal de interesse. O versado na técnica compreenderá que, ao variar os grupos ligados a uma estrutura de anel macrocíclico tal como NOTA, as características de ligação e afinidade com metais e/ou radionuclídeos diferentes podem mudar e tais derivados ou análogos de, por exemplo, NOTA, podem então ser projetados para se ligar a qualquer um dos metais ou radionuclídeos discutidos no presente documento.

[0205] Quelantes do tipo DTPA ou DOTA, onde o ligante inclui funções quelantes de base dura tais como grupos carboxilato ou amina, são mais eficazes para quelação de cátions ácidos duros, especialmente cátions de metal do Grupo IIa e Grupo IIIA. Tais complexos de quelato de metal podem ser tornados muito estáveis através da adaptação do tamanho do anel ao metal de interesse. Outros quelantes do tipo anel tais como poliésteres macrocíclicos são de interesse para ligar estávelmente nuclídeos. Quelantes de porfirina podem ser usados com vários complexos de metal. Mais de um tipo de quelante pode ser conjugado a um peptídeo para ligar íons de metal múltiplos. Quelantes tais como aqueles descritos na Pat. U.S. 5.753.206, especialmente quelantes tiossemicarbazoniilglioxilcisteína (Tscg-Cys) e tiossemicarbazinil-acetilcisteína (Tsca-Cys), são vantajosamente usados para ligar cátions ácidos macios de Tc, Re, Bi e outros metais de transição, lantanídeos e actinídeos que são ligados firmemente aos ligantes de base macia. Outros quelantes ácidos duros tais como DOTA, TETA e similar podem ser substituídos pelos grupos DTPA e/ou TscgCys.

[0206] Em algumas modalidades, o composto de quelação compreende um grupo funcional que pode ser conjugado à porção de anticorpo. Em algumas modalidades, o composto de quelação compreende um grupo funcional que é reativo com um grupo amina primário (-NH₂) na

porção de anticorpo. Aminas primárias existem no terminal N de cada cadeia de polipeptídeo e na cadeia lateral de resíduos de aminoácido lisina (Lys). Grupos funcionais exemplares que podem ser conjugados a uma amina primária, por exemplo, uma cadeia lateral de lisina, da porção de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, isotiocianato, isocianato, acil azidas, ésteres de N-hidroxissuccinimida (NHS), cloretos de sulfonila, aldeídos, glioxais, epóxidos, oxiranos, carbonatos, haletos de arila, imidoésteres, carbodiimida, anidridos e ésteres de fluorfenila. A maioria desses grupos funcionais se conjuga a aminas ou através de acilação ou alquilação.

[0207] Em algumas modalidades, o composto de quelação compreende um grupo funcional que é reativo com uma cadeia lateral da cisteína (isto é, grupo sulfidril) na porção de anticorpo. Grupos reativos sulfidril exemplares incluem, mas não estão limitados a, haloacetilas, maleimidias, aziridinas, acrilóilas, agentes de arilação, vinilsulfonas, dissulfetos de piridila, TNB-tióis e agentes de redução dissulfeto. A maioria desses grupos se conjuga a sulfidrilas ou através de alquilação (geralmente a formação de uma ligação tioéter) ou troca de dissulfeto (formação de uma ligação dissulfeto).

[0208] Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, incluindo derivados de NOTA. Compostos NOTA exemplares com grupos funcionais adequados para conjugação a porções de anticorpo, por exemplo, por meio de cadeias laterais de aminoácido tais como lisinas e cisteínas, são mostrados na FIG. 23. Em algumas modalidades, o agente de imagem compreende NOTA conjugado à porção de anticorpo. Em algumas modalidades, o composto NOTA compreende um grupo isotiocianato (-SCN). Em algumas modalidades, o composto NOTA é p-SCN-Bn-NOTA. Em algumas modalidades, o composto de quelação compreende um NOTA conjugado a um resíduo lisina na por-

ção de anticorpo, e NOTA quela ^{68}Ga . Em algumas modalidades, o composto NOTA é primeiro marcado com um metal radioativo, tal como ^{68}Ga , ou ^{18}F -metal, e então conjugado à porção de anticorpo.

IV. Agentes de anticorpo anti-PD-L1

[0209] Um aspecto do presente pedido provê um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado e um agente de imagem anti-PD-L1. O agente de anticorpo anti-PD-L1 pode ser não marcado ou marcado com um radionuclídeo. Os agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento não compreendem agentes terapêuticos anti-PD-L1.

[0210] Em algumas modalidades, é provido um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado compreendendo qualquer uma das porções de anticorpo anti-PD-L1 descritas no presente documento. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv. Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv fundido a um Fragmento Fc (tal como fragmento Fc de IgG1). Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0211] Em algumas modalidades, é provido um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-

L1 compreendendo: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada.

[0212] Em algumas modalidades, é provido um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado compreendendo um scFv anti-PD-L1 compreendendo: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma

variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de

qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39.

[0213] Em algumas modalidades, é provido um agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado compreendendo um scFv anti-PD-L1 fundido a um fragmento Fc, em que o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas

modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39.

Porções de anticorpo anti-PD-L1

[0214] Os agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento compreendem uma porção de anticorpo que se liga especificamente a PD-L1. As porções de anticorpo anti-PD-L1 compreendidas incluem, por exemplo, scFv anti-PD-L1, Fab anti-PD-L1, proteína de fusão Fc anti-PD-L1 (por exemplo, scFv anti-PD-L1 fundido a um Fc). As porções de anticorpo anti-PD-L1 descritas no presente documento incluem, mas não estão limitadas a, anticorpos humanizados, anticorpos parcialmente humanizados, anticorpos totalmente humanizados, anticorpos semissintéticos, anticorpos quiméricos, anticorpos de camundongo, anticorpos humanos e anticorpos compreendendo as CDRs de cadeia pesada e/ou cadeia leve discutidas no presente documento.

[0215] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 reconhece especificamente PD-L1. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 reconhece especificamente PD-L1 humano. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 reconhece especificamente o domínio extracelular de PD-L1. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 reconhece especificamente um epítopo dentro da sequência de aminoácido de aminoácidos 19-238 de SEQ ID NO: 49.

SEQ ID NO: 49 Sequência de PD-L1 humana

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECK-
 FPVEKQLDLAALIVYWEMED-
 KNIIQFVHGEE DLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA
 GYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD-
 PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSS-
 DHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEE
 NHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRL-
 RKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

[0216] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: um domínio variável de cadeia pesada (V_H) compreendendo uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido; e ii) um domínio variável de cadeia leve (V_L) compreendendo um LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido.

[0217] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo uma HC-CDR3 compreen-

dendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e ii) uma V_L compreendendo uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46,

[0218] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de a SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido; e ii) uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido.

[0219] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de a SEQ ID NO: 43; ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal

como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido nas sequências de HC-CDR; e ii) uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46; ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido nas sequências de LC-CDR.

[0220] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de a SEQ ID NO: 43; e ii) uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46.

[0221] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo as sequências de aminoácido de SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 43; e ii) uma V_L compreendendo as sequências de aminoácido de SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46.

[0222] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo uma, duas ou três CDRs da V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1; e ii) uma V_L compreendendo uma, duas ou três das CDRs da V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 3.

[0223] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de

80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

[0224] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é um anticorpo quimérico. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende regiões variáveis de camundongo e regiões constantes humanas. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 5; e b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 7. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5; e b) uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7.

[0225] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é um anticorpo humanizado. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de

aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a qualquer uma de SEQ ID NOs: 9, 11 e 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a qualquer uma de SEQ ID NOs: 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 9, 11 e 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 15, 17 e 19.

[0226] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15.

[0227] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de

80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 11; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15.

[0228] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15.

[0229] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de

80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17.

[0230] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 11; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17.

[0231] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de

SEQ ID NO: 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17.

[0232] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0233] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 11; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0234] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de

SEQ ID NO: 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13; e b) uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0235] Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada podem ser combinados em várias combinações em pares para gerar várias porções de anticorpo anti-PD-L1. Sequências exemplares de anticorpos anti-PD-L1 são providas nas Tabelas 3 e 4. As sequências de CDR, V_H e V_L como mostrado na Tabela 2 são delimitadas de acordo com o INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM® (IMGT). Vide, por exemplo, Lefranc, MP e outros, *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015), cuja descrição é no presente documento incorporada a título de referência em sua totalidade. Aqueles versados na técnica reconhecerão que muitos algoritmos são conhecidos para predição de posições de CDR nas regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo, e agentes de anticorpo compreendendo CDRs de anticorpos descritos no presente documento, mas com base em algoritmos de predição diferente de IMGT, estão dentro do escopo da presente invenção. A Tabela 4 lista sequências de CDR exemplares sob vários outros esquemas de numeração/definições.

Tabela 3. Sequências de anticorpo anti-PD-L1 exemplares

SEQ ID NO.		Descrição	Sequência de anticorpo (sequências de CDR estão sublinhadas e em negrito)
AA	DNA		
1	2	V _H	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS <u>GFNIKDTY</u> MYWVKQRPEQGLECIGRID <u>PANDNT</u> KYDPKFQGKATITADTSSNTAYVQLASLTSEDYAVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGTTLVSS

3	4	VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVTLSCRAS QEISGYL SWLQKPKDGTIKRLIY ATS TLD SGV PKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYC LOYAIYPLT FGAGTKL ELKR
41		HC-CDR1	GFNIKDTY
42		HC-CDR2	IDPANDNT
43		HC-CDR3	ARAKNLLNYFDY
44		LC-CDR1	QEISGY
45		LC-CDR2	ATS
46		LC-CDR3	LQYAIYPLT
5	6	Cadeia pe- sada quimé- rica	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS GFNIKDTY MYWVKRPEQGLECIGRID PANDNT KYDPKFQGKATITADTSSNTAYVQLASLTSEDATVYYC ARAKNLLN YFDY WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
7	8	Cadeia leve quimérica	DIQMTQSPSSLSASLGERVTLSCRAS QEISGYL SWLQKPKDGTIKRLIY ATS TLD SGV PKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYC LOYAIYPLT FGAGTKL ELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
9	10	VH 1 humani- zada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GFNIKDTY MYWVRQAPGQGLEWMGRID PANDNT KYAQKFQGRVTITADTSTAYMELSSLRSEDATVYYC ARAKNLLN YFDY WGQGTTLTVSS
11	12	VH 2 humanizada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GFNIKDTY MYWVRQAPGQGLEWIGRID PANDNT KYAPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDATVYYC ARAKNLLN YFDY WGQGTTLTVSS
13	14	VH3 humanizada	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GFNIKDTY MYWVRQAPGQGLEWMGRID PANDNT KYAQKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDATVYYC ARAKNLLN YFDY WGQGTTLTVSS
15	16	VL 1 humanizada	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS QEISGYL SWYQKPKGKAPKRLIY ATS TLD SGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC LOYAIYPLT FGQGTKL EIKR
17	18	VL 2 humanizada	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS QEISGYL SWLQKPKGKAPKRLIY ATS TLQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTISLQPEDFATYYC LOYAIYPLT FGQGTKL EIKR
19	20	VL 3 humanizada	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS QEISGYL SWYQKPKGKAPKRLIY ATS TLD SGV PSRFSGSRSGDYTLTISLQPEDFATYYC LOYAIYPLT FGQGTKL EIKR

Tabela 4. CDRs anti-PD-L1 exemplares sob várias definições de CDR

SEQ ID NO	Descrição	Sequências
41	CDR-H1	GFNIKDTY
52	CDR-H1 (Kabat)	DTYMY
53	CDR-H1 (Chothia)	GFNIKDT
54	CDR-H1 (AbM)	GFNIKDTYMY
55	CDR-H1 (Contact)	KDTYMY
42	CDR-H2	IDPANDNT
56	CDR-H2 (Kabat)	RIDPANDNTKYAQKFQG
57	CDR-H2 (Chothia)	DPANDN
58	CDR-H2 (AbM)	RIDPANDNTK
59	CDR-H2 (Contact)	WMGRIDPANDNTK
43	CDR-H3	ARAKNLLNYFDY
60	CDR-H3 (Kabat/Abm/Chothia)	AKNLLNYFDY
61	CDR-H3 (Contact)	ARAKNLLNYFD
44	CDR-L1	QEISGY
62	CDR-L1 (Kabat/Abm/Chothia)	RASQEISGYLS

63	CDR-L1 (Contact)	SGYLSWL
45	CDR-L2	ATS
64	CDR-L2 (Kabat/Abm/Chothia)	ATSTLQS
65	CDR-L2 (Contact)	RLIYATSTLQ
46	CDR-L3 (Kabat/Abm/Chothia)	LQYAIYPLT
66	CDR-L3 (Contact)	LQYAIYPL

[0236] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compete por ligação a um PD-L1-alvo com uma segunda porção de anticorpo anti-PD-L1 de acordo com qualquer uma das porções de anticorpo anti-PD-L1 descritas no presente documento. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 se liga ao mesmo, ou substancialmente o mesmo, epítopo que a segunda porção de anticorpo anti-PD-L1. Em algumas modalidades, ligação da porção de anticorpo anti-PD-L1 ao PD-L1-alvo inibe ligação da segunda porção de anticorpo anti-PD-L1 a PD-L1 em pelo menos cerca de 70% (tal como em pelo menos cerca de qualquer um de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%) ou vice-versa. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 e a segunda porção de anticorpo anti-PD-L1 competem cruzado para ligação ao PD-L1-alvo, isto é, cada uma das porções de anticorpo anti-PD-L1 compete com a outra para ligação ao PD-L1-alvo.

ScFv anti-PD-L1

[0237] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 tem a configuração de (do terminal N para o terminal C): V_L-L-V_H ou V_H-L-V_L, em que L é um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 é quimérico, humano, parcialmente humanizado, totalmente humanizado ou semissintético.

[0238] Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 é engenheirado para ter estabilidade térmica aumentada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 é engenheirado para ter uma temperatura de fusão de cerca de 55-70°C, tal como cerca de qualquer um de 55-60,

60-65 ou 65-70°C. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas (tais como 1, 2, 3 ou mais). Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Outras ligações dissulfeto engenheiradas podem ser introduzidas no scFv anti-PD-L1 através da engenharia de uma cisteína na V_L e uma cisteína na V_H em posições adequadas com base na estrutura e sequências do scFv.

[0239] Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende: i) uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido nas sequências de HC-CDR; e ii) uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46; ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 (tal como cerca de qualquer uma de 1, 2, 3, 4 ou 5) substituições de aminoácido nas sequências de LC-CDR. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 é humanizado. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H, um ligante peptídico

opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L , um ligante peptídico opcional e uma V_H . Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende uma ou mais (tal como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0240] Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 é humanizado. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende do terminal N para o terminal C: uma V_H , um ligante peptídico opcional e uma V_L . Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende do terminal N para o terminal C: uma V_L ,

um ligante peptídico opcional e uma V_H. Em algumas modalidades, o scFv compreende um ligante peptídico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47 ou 48. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende uma ou mais (tais como 1, 2, 3 ou mais) ligações dissulfeto engenheiradas. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0241] Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um marcador His. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um marcador His fundido ao terminal C da porção scFv anti-PD-L1. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende GGGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 51). scFvs anti-PD-L1 exemplares são ilustrados na FIG. 9. Sequências de scFv anti-PD-L1 exemplares são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Sequências scFv anti-PD-L1 exemplares

SEQ ID NO.		Descrição	Sequência de Aminoácido (sequências de CDR estão sublinhadas e em negrito)
AA	DNA		
25	26	scFv anti-pD-L1 humano variante 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFNIKDTY</u> MYWVRQAPGQGLEWMGR <u>ID</u> <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKPGKAPKRLIY <u>ATST</u> LQSGVPSRFSGSRSGT DYTLTISLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGQGTKLEIKR

27	28	scFv anti-pD-L1 humano variante 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFNIK</u> DTYMYWVRQAPGQGQLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGLTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIQMTQSPSSLSASVGD TITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKAPKRLIY <u>AT</u> STLQSGVPSRFSGSRSGTDY TLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGQGTKLEIKR
29	30	scFv anti-pD-L1 humano variante 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFNIK</u> DTYMYWVRQAPGQGQLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGLTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVITITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKAPKRLIY <u>AT</u> STLQSGVPSRFSGSRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGCGTKLEIKR
31	32	scFv anti-pD-L1 humano variante 4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFNIK</u> DTYMYWVRQAPGQGQLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGCGLTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVITITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKCPKRLIY <u>AT</u> STLQSGVPSRFSGSRSGT DYTLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGCGTKLEIKR
33	34	scFv anti-pD-L1 humano variante 5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKAPKRLIY <u>AT</u> TLQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGQGTKL EIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFN</u> <u>IKDTY</u> MYWVRQAPGQGQLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGLTLTVSS
35	36	scFv anti-pD-L1 humano variante 6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKAPKRLIY <u>AT</u> TLQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGQGTKL EIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFNIK</u> <u>DTY</u> MYWVRQAPGQGQLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYME LSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGLTLTVSS
37	38	scFv anti-pD-L1 humano variante 7	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKCPKRLIY <u>AT</u> TLQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGQGTKL EIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFN</u> <u>IKDTY</u> MYWVRQAPGQGQLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGCGTLTVSS
39	40	scFv anti-pD-L1 humano variante 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITITCRAS <u>QEISGY</u> LSWLQKQPGKAPKRLIY <u>AT</u> TLQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC <u>LOYAIYPLT</u> FGCGTKL EIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GFN</u> <u>IKDTY</u> MYWVRQAPGQCLEWMGRID <u>PANDNT</u> KYAQKFQGRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDATVYYC <u>ARAKNLLN</u> <u>YFDY</u> WGQGLTLTVSS

scFv-Fc anti-PD-L1

[0242] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv anti-PD-L1 de acordo com qualquer um dos scFvs anti-PD-L1 descritos no presente documento fundidos a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é fundida a um fragmento Fc por meio de um ligante peptídico. A porção de anticorpo anti-PD-L1 pode compreender qualquer um dos fragmentos Fc descritos na seção “Porções de anticorpo” acima. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc IgG1 humano. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende uma ou mais mutações para aumentar a eliminação ou diminuição da meia-vida. Por exemplo, o fragmento Fc pode ter mutações H310A e/ou H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0243] Em algumas modalidades, cada cadeia do fragmento Fc é

fundida à mesma entidade. Em algumas modalidades, o scFv-Fv anti-PD-L1 compreende dois scFvs anti-PD-L1 idênticos descritos no presente documento, cada um fundido com uma cadeia do fragmento Fc. Em algumas modalidades, o scFv-Fc anti-PD-L1 é um homodímero. Em algumas modalidades, o scFv-Fc anti-PD-L1 é um heterodímero.

[0244] Em algumas modalidades, o scFv-Fv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21 ou 23 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21 ou 23. Sequências de scFv-Fc anti-PD-L1 exemplares são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6. Sequências de scFv-Fc anti-PD-L1 exemplares

SEQ ID NO.		Descrição	Sequência de aminoácido (as sequências de CDR estão sublinhadas ou em negrito)
AA	DNA		
21	22	hPD-L1 scFv-hFc wt	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GFNIKDTY MYWVRQAPGQGLEWMGR IDP ANDNT KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYYC ARAKNLLNYF DY WGQGTTLTVSSGSGSGKPGSGEGSTKGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRAS OEISGY LSWLQKPKGKAPKRLIY ATST LQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC LOYAIYPLT FGQGTKLEIKRDKHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	24	hPD-L1 scFv-hFc Mt	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GFNIKDTY MYWVRQAPGQGLEWMGR IDP ANDNT KYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDAVYYC ARAKNLLNYF DY WGQGTTLTVSSGSGSGKPGSGEGSTKGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRAS OEISGY LSWLQKPKGKAPKRLIY ATST LQSGVPSRFSGSRSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC LOYAIYPLT FGQGTKLEIKRDKHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNQYTKKSLSLSPG

Agente de imagem anti-PD-L1

[0245] Qualquer uma das porções de anticorpo anti-PD-L1 descritas no presente documento pode ser incorporada em um agente de imagem para detecção de PD-L1. As características descritas no presente documento nessa seção com relação a agentes de anticorpo anti-PD-L1 podem ser combinadas com as características descritas na seção “Agentes de imagem” acima em qualquer combinação adequada.

[0246] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem

compreendendo qualquer uma das porções de anticorpo anti-PD-L1 descritas no presente documento, em que a porção de anticorpo é marcada com um radionuclídeo. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{86}Y , ^{90}Y e ^{89}Zr . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0247] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo qualquer um dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 é marcada com um radionuclídeo. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0248] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma

variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ⁶⁸Ga. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0249] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo um scFv anti-PD-L1 marcado com um radionuclídeo, em que o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:

44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos

cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0250] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 marcada com um radionuclídeo, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv anti-PD-L1 fundido a um fragmento Fc, em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido

de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁹F, ⁶⁶Ga, ⁷²Ga, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y e ⁴⁵Ti. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ⁶⁸Ga. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é conjugada a um composto de

quelação que realiza quelação do radionuclídeo. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados.

[0251] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 conjugada a NOTA que realiza a quelação de um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19, ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em

^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti .

[0252] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo um scFv anti-PD-L1 conjugado a NOTA que realiza quelação de um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que o scFv anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um

segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L , em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti .

[0253] Em algumas modalidades, é provido um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo anti-PD-L1 conjugado a NOTA que realiza a quelação de um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 é um scFv anti-PD-L1 fundido a um Fragmento Fc, e em que a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido; e uma V_L compreendendo uma LC-CDR1 compreendendo a

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até cerca de 5 substituições de aminoácido. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 compreende: uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo anti-PD-L1 é humanizada. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43 da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc tem mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, o scFv anti-PD-L1 compreende a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e

39 ou uma variante da mesma tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de qualquer um de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 e 39. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti .

PD-1

A via de PD-1/PD-L1 e imunoterapia anti-PD

[0254] O gene codificando morte de célula programada 1 (PD-1) foi primeiro isolado de um hibridoma de célula T de murino e uma linhagem de célula progenitora hematopoiética sofrendo apoptose clássica em 1992 (Ishida Y, e outros. *The EMBO journal* 1992; 11:3887-3895). Estruturalmente, como um homólogo de CD28 e CTLA4, PD-1 é uma proteína de transmembrana tipo I e pertence à superfamília de Ig (Sharpe, A.H. e Freeman, G.J. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2:116-126). O papel crítico de PD-1 em modular negativamente respostas de célula T e manter tolerância periférica foi mostrado por estudos de ablação de gene de PD-1 usando modelos de camundongo diferentes. Camundongos deficientes em PD-1 em base C57BL/6 desenvolvem doenças autoimunes tal como lúpus devido à proliferação aumentada de células T deficientes em PD-1 contra antígeno alogeneico (Nishimura, H. e outros. *Immunity* 1999; 11:141-151). Em BALB/c, mas não em base BALB/c RAG2-/- imunodeficientes, camundongos com PD-1 inativado desenvolveram cardiomiopatia dilatada e sofreram morte súbita de falência cardíaca congestiva (Nishimura, H. e outros. *Science* 2001; 291:319-322). Uma das principais causas contribuintes foi mais tarde identificada ser a geração de autoanticorpos de título alto contra a proteína cardíaca troponina I específica do coração (Okazaki, T., e outros. *Nature medicine* 2003; 9:1477-1483). Na base NOD (não diabético), deficiência de

PD-1 leva a início precoce de diabetes tipo I devido à expansão acelerada de célula T específica das ilhotas e infiltração nas ilhotas pancreáticas (Yantha, J. e outros. *Diabetes* 2010; 59:2588-2596). Diferente de CTLA-4, o motivo de troca baseado em tirosina imunorreceptora (ITSM) em PD-1, mas não o domínio ITIM próximo localizado na cauda citoplásmica de PD-1, recruta fosfatase SHP-2 e reverte fosforilação induzida por ativação após sinalização por TCR (Ishida Y, e outros. *The EMBO journal* 1992; 11:3887-3895).

[0255] Vários estudos contribuíram para a determinação das moléculas que interagem com PD-1. Em 1999, o homólogo 1 de B7 (B7H1, também referido como ligante-1 de morte programada [PD-L1] na última literatura) foi identificado como uma glicoproteína de transmembrana do tipo I de 290 aminoácidos pertencente à família B7-CD28 da superfamília da imunoglobulina que serviu como um regulador negativo de resposta de célula T humana *in vitro* (Dong, H. e outros. *Nature medicine* 1999; 5:1365-1369). Um ano depois, foi mostrado que PD-L1 é uma contraparte de ligação e funcional de PD-1 (Freeman, G.J. e outros. *The Journal of experimental medicine* 2000; 192:1027-1034). Foi mais tarde demonstrado que camundongos deficientes em PD-L1 eram propensos a condições autoimunes (Dong, H. e outros. *Immunity* 2004; 20:327-336). Notadamente, embora os mRNAs para PD-1 e PD-L1 sejam expressos com espectro amplo em muitos tipos de célula, ambos são moléculas induzíveis uma vez que seus padrões de expressão são estritamente controlados através de regulação pós-transcricional. Proteína PD-1 não é detectável em células T em repouso, mas é encontrada na superfície celular dentro de 24 horas de ativação de célula T (Keir, M.E. e outros. *Annual review of immunology* 2008; 26:677-704). Sob condições fisiológicas normais, proteína PD-L1 é apenas expressa nos tecidos periféricos, tais como a amígdala, placenta e uma fração pequena de células do tipo macrófago no pulmão e no fígado (Dong, H. e outros.

Nature medicine 2002; 8:793-800; Petroff, M.G. e outros. *Placenta* 2002; 23 Suppl A:S95-101). Indução extrínseca de PD-L1 é largamente mediada por citocinas pró-inflamatórias, tal como interferon γ (IFN- γ), que indica que interação PD-1/PD-L1 desempenha um papel importante no controle de resposta inflamatória nos tecidos periféricos (Zou, W., Chen, L. *Nature reviews Immunology* 2008; 8:467-477).

[0256] Em adição a PD-L1, um outro ligante de PD-1 chamado B7-DC (também conhecido como PD-L2) foi também identificado independentemente por dois laboratórios (Tseng, S.Y. e outros. *The Journal of experimental medicine* 2001; 193:839-846; Latchman Y., e outros. *Nature immunology* 2001; 2:261-268). PD-L2 foi verificado ser seletivamente expresso em células dendríticas (DCs) e também regula negativamente resposta de célula T através de ligação a PD-1. Recentemente, PD-L2 foi também constatado interagir com membro b da família de molécula de orientação repulsiva (RGMb), uma molécula que é altamente enriquecida em macrófagos de pulmão e pode ser necessária para indução de tolerância respiratória (Xiao, Y. e outros. *The Journal of experimental medicine* 2014; 211:943-959). Interessantemente, PD-L1 também foi constatado ter um outro receptor CD80 em células T ativadas para prover sinal inibidor, que pode também contribuir para a formação de tolerância à célula T *in vivo* (Butte, M.J. e outros. *Immunity* 2007; 27:111-122; Park, J.J. e outros. *Blood* 2010; 116:1291-1298). Atualmente, pelo menos cinco moléculas de interação são conhecidas estar envolvidas na rede PD. Portanto, a via de PD-1/PD-L1 é renomeada para a mais adequada “via de PD”. A presença de dois ligantes (PD-L1 e PD-L2) para PD-1 e dois receptores inibidores (PD-1 e CD80) para PD-L1 sugere que nem bloqueio de PD-L1 nem bloqueio de PD-L1 romperia completamente a via de PD. Anulação completa da via inibidora de PD pode necessitar uma estratégia de combinação se direcionando a ambas as moléculas.

[0257] A função crucial da via de PD na modulação da atividade de células T nos tecidos periféricos em uma resposta inflamatória à infecção e na limitação de autoimunidade parece ser atacada por células de tumor e por vírus durante infecções virais crônicas. PD-L1 é superexpresso em muitos tumores humanos recém-isolados de múltiplas origens de tecido (Dong e outros. *Nature Medicine* 2002; 8:793-800; Romano e outros. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2015; 3:15; Hirano e outros. *Cancer Research* 2005; 65:1089-1096). A expressão de PD-L1 foi relacionada com a progressão e prognóstico pobre de certos tipos de cânceres humanos (Wang e outros. *European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 2015; 41:450-456; Cierna e outros. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2016; 27:300-305; Gandini e outros. *Critical reviews in oncology/hematology* 2016; 100:88-98; Thierauf e outros. *Melanoma research* 2015; 25:503-509; Taube e outros. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; 20:5064-5074). Durante infecções virais crônicas, PD-L1 é persistentemente expresso em muitos tecidos, enquanto PD-1 é suprarregulado em CTLs específicos de vírus (Yao e outros. *Trends in molecular medicine* 2006; 12:244-246). PD-L1 induzido por tumor ou vírus pode utilizar mecanismos simples para facilitar a evasão de vigilância imune, incluindo anergia de célula T, apoptose, exaustão, produção de IL-10, supressão de DC, bem como indução e expansão de Treg (Zou e outros. *Nature reviews Immunology* 2008; 8:467-477).

[0258] O escape de imunidade de tumor mediada pela via de PD poderia ser vista como um modelo de “resistência adaptativa” (Chen e outros. *The Journal of clinical investigation* 2015; 125:3384-3391; Yao e outros. *European journal of immunology* 2013; 43:576-579). Especificamente, células T específicas de tumor ativadas alcançam os sítios de

tumor e se tornam linfócitos de infiltração em tumor (TILs). Quando do reconhecimento do antígeno cognato, TILs produzem IFN- γ , que induz expressão de PD-L1 em muitos tipos de célula no microambiente do tumor, incluindo DCs, macrófagos, neutrófilos e linfócitos B. Quando da ligação a PD-1, PD-L1 envia um sinal supressivo para células T e um sinal antiapoptótico para células de tumor, levando à disfunção de célula T e sobrevivência de tumor (Taube e outros. *Science translational medicine* 2012; **4**:127ra137; Spranger e outros. *Science translational medicine* 2013; **5**:200ra116). Esse modelo tem suporte não apenas das observações baseadas em IHC que expressão de PD-L1 na superfície celular é detectada apenas em células que são adjacentes a células T, mas também tem suporte dos estudos mostrando uma correlação forte entre expressão de PD-L1 em sítios de tumor e a presença de TILs (Gandini e outros. *Critical reviews in oncology/hematology* 2016; 100:88-98; Taube e outros. *Science translational medicine* 2012; **4**:127ra137), bem como a demonstração de IFN- γ como um indutor de PD-L1 principal *in vivo* em modelos de tumor de camundongo (Dong e outros. *Nature medicine* 2002; 8:793-800). A hipótese da resistência adaptativa mediada pela via de PD dá suporte à observação que a maioria dos tumores PD-L1+ pode escapar da destruição imune mesmo sob imunidade antitumor forte.

[0259] Com base no modelo de “resistência adaptativa”, imunoterapias se direcionando à via de PD são planejadas para bloquear a interação de PD-1 e PD-L1, dessa maneira evitando a resistência à imunidade antitumor. Embora a constatação de PD-1 não tenha levado à sua aplicação em terapias antitumor até a expressão abundante de PD-L1 ter sido constatada em tumores, ligando a via de PD com tratamento para câncer (Dong e outros. *Nature Medicine* 1999; 5:1365-1369), por ora, o FDA já aprovou dois anticorpos monoclonais para PD-1 para tra-

tamento de cânceres humanos. Esses são OPDIVO® (também conhecido como nivolumabe, MDX-1106, BMS-936558 e ONO-4538) desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb (68) e KEYTRUDA® (também conhecido como pembrolizumabe, lambrolizumabe e MK-3475) desenvolvido pela Merck (69). Anticorpos monoclonais múltiplos se direcionando ou a PD-1 ou PD-L1 estão sob avaliações intensas em centenas de testes clínicos envolvendo milhares de pacientes. Terapia anti-PD gerou benefícios clínicos significantes incluindo regressão notável de tumores e extensão substancial de taxa de sobrevivência. Uma vez que terapia anti-PD se direciona a defeitos imunes induzidos por tumor através de imunomodulação nos sítios de tumor, ela oferece eficácia durável, toxicidade tolerável e um espectro amplo de indicações para câncer.⁵⁹ O sucesso clínico da imunoterapia anti-PD valida mais a eficácia de bloqueio da via de PD como uma categoria única de terapia para câncer que é distinta de terapias personalizadas ou específicas de tipo de tumor. Ao se direcionar a tumores que têm explorado via de ponto de checagem imune definida para escapar de vigilância imune, imunoterapia anti-PD tomou o centro do palco em imunoterapias para cânceres humanos e especialmente tumores sólidos.

Expressão de PD-L1 em sítio de tumor como um biomarcador para prever a eficácia de imunoterapia anti-PD

[0260] Tipos de tumor sólidos múltiplos mostram correlação positiva entre taxa de resposta à imunoterapia anti-PD e nível de expressão de PD-L1 dentro do tumor, incluindo melanoma, RCC, NSCLC, câncer colorretal, bem como vários males hematológicos, tal como linfoma de Hodgkin clássico. Nos testes clínicos de melanoma, superexpressão de PD-L1 detectada por IHC era em aproximadamente 45%-75% das amostras. No estudo de nivolumabe, 45% dos pacientes eram positivos para expressão de PD-L1 com base em um corte de 5% usando o anticorpo 28-8. A taxa de resposta para pacientes positivos para PD-L1 era

44%, comparado com 17% para pacientes negativos para PD-L1. Pacientes com melanoma positivos para PD-L1 tratados com nivolumabe tinham um OS de 21,1 meses e um PFS de 9,1 meses, comparado com 12,5 meses e 2 meses em pacientes negativos para PD-L1, respectivamente. Pembrolizumabe (anti-PD-1) foi também estudado em melanoma avançado utilizando um corte de IHC de 1%. Pacientes positivos para PD-L1 (77%) tinham um ORR de 51%, enquanto pacientes negativos para PD-L1 tinham um ORR de 6%. Pacientes positivos para PD-L1 tratados com pembrolizumabe tinham um PFS de 12 meses e uma taxa de OS de 1 ano de 84%, enquanto pacientes negativos para PD-L1 tinham um PFS de 3 meses e um OS de 1 ano de 69%.

[0261] Uma tendência similar foi vista em NSCLC, onde pacientes positivos para PD-L1 pareciam se beneficiar preferivelmente de terapia direcionada a PD-1/PD-L1. Nivolumabe foi estudado em pacientes com NSCLC refratário, e IHC de PD-L1 foi realizada usando um ensaio de IHC DAKO com um corte de 5%. Com base nesses critérios, 60% de pacientes foram classificados como positivos para PD-L1, e a taxa de resposta em pacientes positivos para PD-L1 foi 67% comparado com 0% em pacientes negativos para PD-L1. Pembrolizumabe foi também investigado em NSCLC, utilizando um corte de IHC de 50% único para expressão de PD-L1 usando um ensaio não reportado. Com base nesse corte, 25% de tumores eram positivos para PD-L1 e, em 6 meses, pacientes positivos para PD-L1 tinham uma ORR imunorrelacionada de 67% (irORR), uma taxa de PFS de 67% e uma taxa de OS de 88% comparado com pacientes negativos para PD-L1 que tinham um irORR de 0%, uma taxa de PFS de 11% e uma taxa de OS de 33%. MPDL3280A, um anticorpo anti-PD-L1, foi também estudado em NSCLC utilizando uma plataforma de IHC da proprietária com graduação 0-3+ (3+ para >10% de células, 2+ para >5% de células, 0-1 para <5% de células). Pacientes com NSCLC com um score de expressão de PD-L1 de 3+ tinham uma

taxa de resposta de 83%, comparado com 46% em pacientes com um score de 0 ou 1 ou 2. Pacientes com expressão de PD-L1 1+/2+/3+ tinham um ORR de 31%.

[0262] IHC PD-L1 como um marcador preditivo foi também avaliada em testes clínicos envolvendo histologias múltiplas. O estudo de fase I de nivolumabe incluía pacientes com melanoma, RCC, NSCLC, câncer colorretal metastático (mCRC) e câncer de próstata resistente à castração metastático (mCRPC). PD-L1 foi detectado pelo anticorpo 5H1 utilizando um limiar de 5%, e 60% de tumores eram positivos através desse critério. Pacientes com tumores positivos para PD-L1 tinham uma taxa de resposta de 36%, enquanto pacientes com tumores negativos para PD-L1 tinham um ORR de 0%. MPDL3280A tem sido estudado em pacientes com melanoma, RCC, NSCLC, mCRC e câncer gástrico utilizando uma plataforma de IHC de PD-L1 da proprietária. Pacientes positivos para PD-L1 tinham uma taxa de resposta de 39%, enquanto pacientes negativos para PD-L1 tinham uma taxa de resposta de 13%.

[0263] Dados desses testes clínicos parecem sugerir que pacientes com níveis mais altos de PD-L1 de acordo com IHC pareciam ter respostas superiores à terapia direcionada a PD-1/PD-L1. No entanto, relativamente menos é conhecido sobre a natureza de resposta ou resultados de sobrevivência em pacientes negativos para PD-L1 tratados com imunoterapia anti-PD. Avaliações iniciais sugerem que selecionar pacientes negativos para PD-L1 com melanoma pode ainda obter respostas duráveis à terapia anti-PD-1/PD-L1, enquanto respostas em pacientes NSCLC negativos para PD-L1 são raras. Se essa tendência for reproduzida em testes maiores, ela pode representar uma diferença fundamental na imunobiologia entre os dois tipos diferentes de tumor ou pode representar uma questão técnica com IHC em tipos de tecido diferentes. Em um teste clínico de fase I para MPDL3280A em câncer de bexiga urotelial metastático, pacientes positivos para PD-L1 tinha um

ORR de 52% em 12 semanas, comparado com 11% em pacientes negativos para PD-L1. Portanto, a profundidade e duração de respostas em pacientes negativos para PD-L1 permanecem a ser vistas.

V. Anticorpos

[0264] São também providos no presente documento anticorpos que reconhecem especificamente um ligante de ponto de checagem imune, tais como PD-L1 e ligantes tipo PD-L1. Tais anticorpos e porções de anticorpo derivadas dos mesmos podem ser incorporados aos métodos e agentes de imagem descritos nas seções acima. Porções de anticorpo adequadas incluem, mas não estão limitadas a, scFv, Fab e scFv fundidos a um fragmento Fc (também referido no presente documento como “scFv-Fc”). As porções de anticorpo (incluindo os agentes de anticorpo anti-PD-L1) descritas no presente documento podem ter qualquer uma ou mais das características descritas nas seções a)-h) abaixo.

[0265] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende um scFv. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv. Em algumas modalidades, o scFv tem a configuração de (do terminal N para o terminal C): V_L -L- V_H ou V_H -L- V_L , em que L é um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o scFv é quimérico, humano, parcialmente humanizado, totalmente humanizado ou semissintético.

[0266] Em algumas modalidades, o scFv é engenheirado para ter estabilidade térmica aumentada. Em algumas modalidades, o scFv é engenheirado para ter uma temperatura de fusão de cerca de 55-70° C, tal como cerca de qualquer uma de 55-60, 60-65 ou 65-70° C. Em algumas modalidades, o scFv compreende uma ou mais ligações dissulfeto engenheiradas (tais como 1, 2, 3 ou mais). Em algumas modalidades, o scFv compreende um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 44 de V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 100 da V_L e/ou um primeiro resíduo cisteína engenheirado na posição 105 da V_H e um segundo resíduo cisteína engenheirado na posição 43

da V_L, em que o primeiro resíduo cisteína engenheirado e o segundo resíduo cisteína engenheirado formam uma ligação dissulfeto e em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Outras ligações dissulfeto engenheiradas podem ser introduzidas no scFv através da engenharia de uma cisteína na VH e uma cisteína na VL em posições adequadas com base na estrutura e sequência do scFv.

[0267] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende um fragmento Fc. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um scFv fundido a um fragmento Fc. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende um scFv fundido a um fragmento Fc por meio de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc IgG1 humano. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende uma ou mais mutações para aumentar eliminação ou diminuir a meia-vida. Por exemplo, o fragmento Fc pode ter mutações H310A e/ou H435Q, em que as posições do aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0268] Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG imunoglobulina compreendendo uma região de dobra (começando em Cys226), um domínio CH2 e um domínio CH3 de IgG. O termo “região de dobra” ou “sequência de dobra” como no presente documento usado se refere à sequência de aminoácido localizada entre o ligante e o domínio CH2. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um fragmento Fc compreendendo uma região de dobra. Em algumas modalidades, o fragmento Fc da proteína de fusão começa na região de dobra e se estende para o terminal C da cadeia pesada de IgG. Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um fragmento Fc que não compreende a região de dobra.

[0269] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende um fragmento Fc selecionado do grupo consistindo em fragmentos Fc de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM e combinações e híbridos dos mesmos. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é derivado de uma IgG humana. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende a região Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou uma combinação ou híbrido de IgG. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende os domínios CH2 e CH3 de IgG1. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG4. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende os domínios CH2 e CH3 de IgG4. Fc IgG4 é conhecido exibir menos atividade efetora do que Fc de IgG1, e então pode ser desejável para algumas aplicações. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é derivado de uma imunoglobulina de camundongo.

[0270] Em algumas modalidades, o domínio CH2 de IgG começa em Ala231. Em algumas modalidades, o domínio CH3 começa em Gly341. É compreendido que o resíduo Lys C-terminal de IgG humana pode estar opcionalmente ausente. É também compreendido que substituições de aminoácido conservativas da região Fc sem afetar a estrutura e/ou estabilidade desejada de Fc é compreendida dentro do escopo da invenção.

[0271] Em algumas modalidades, cada cadeia do fragmento Fc é fundida à mesma porção de anticorpo. Em algumas modalidades, o scFv-Fc compreende dois scFvs idênticos descritos no presente documento, cada um fundido com uma cadeia do fragmento Fc. Em algumas modalidades, o scFv-Fc é um homodímero.

[0272] Em algumas modalidades, o scFv-Fc compreende dois scFvs diferentes, cada um fundido com uma cadeia do fragmento Fc. Em algumas modalidades, o scFv-Fc é um heterodímero. Heterodimerização de polipeptídeos não idênticos no scFv-Fc pode ser facilitada por

métodos conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação, heterodimerização através da tecnologia *knob-into-hole*. A estrutura e método de montagem da tecnologia *knob-into-hole* podem ser encontrados nos, por exemplo, US5.821.333, US7.642.228, US 201 1/0287009 e PCT/US2012/059810, no presente documento incorporados a título de referência em suas modalidades. Essa tecnologia foi desenvolvida através da introdução de um “knob” (ou uma protuberância) através da substituição de um resíduo de aminoácido pequeno com um grande do domínio CH3 de um Fc e introdução de um “hole” (ou uma cavidade) no domínio CH3 do outro Fc através da substituição de um ou mais resíduos de aminoácido grandes com uns menores. Em algumas modalidades, uma cadeia do fragmento Fc na proteína de fusão compreende um *knob*, e a segunda cadeia do fragmento Fc compreende um *hole*.

[0273] Os resíduos preferidos para a formação de um *knob* são geralmente resíduos de aminoácido de ocorrência natural e são preferivelmente selecionados de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W). Mais preferidos ao triptofano e tirosina. Em uma modalidade, o resíduo original para a formação do *knob* tem um volume de cadeia lateral pequeno, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina ou valina. Substituições de aminoácido exemplares no domínio CH3 para formação do knob incluem, sem limitação a substituição T366W, T366Y ou F405W.

[0274] Os resíduos preferidos para a formação de um *hole* são geralmente resíduos de aminoácido de ocorrência natural e são preferivelmente selecionados de alanina (A), serina (S), treonina (T) e valina (V). Em uma modalidade, o resíduo original para a formação do *hole* tem um volume de cadeia lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina ou triptofano. Substituições de aminoácido exemplares no domínio CH3 para geração do *hole* incluem, sem limitação, as substituições T366S, L368A, F405A, Y407A, Y407T e Y407V. Em certas modalidades, o knob

compreende substituição T366W, e o *hole* compreende as substituições T366S/L368A/Y 407V. É compreendido que outras modificações para a região Fc conhecidas na técnica que facilitam heterodimerização são também contempladas e compreendidas pelo presente pedido.

[0275] Outras variantes de scFv-Fc (incluindo variantes de scFv-Fc anti-PD-L1, por exemplo, uma variante de anticorpo anti-PD-L1 de comprimento integral) compreendendo qualquer uma das variantes descritas no presente documento (por exemplo, variantes Fc, variantes de função efetora, variantes de glicosilação, variantes engenheiradas de cisteína), ou suas combinações, são compreendidas.

a) Afinidade de anticorpo

[0276] Especificidade de ligação das porções de anticorpo pode ser determinada experimentalmente através de métodos conhecidos na técnica. Tais métodos compreendem, mas não estão limitados a, *Western blots*, testes ELISA, RIA, ECL, IRMA, EIA, BIACORE™ e varreduras de peptídeo.

[0277] Em algumas modalidades, a K_D da ligação entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) é cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-12} M, cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-8} M, cerca de 10^{-8} M a cerca de 10^{-9} M, cerca de 10^{-9} M a cerca de 10^{-10} M, cerca de 10^{-10} M a cerca de 10^{-11} M, cerca de 10^{-11} M a cerca de 10^{-12} M, cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-12} M, cerca de 10^{-8} M a cerca de 10^{-12} M, cerca de 10^{-9} M a cerca de 10^{-12} M, cerca de 10^{-10} M a cerca de 10^{-12} M, cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-11} M, cerca de 10^{-8} M a cerca de 10^{-11} M, cerca de 10^{-9} M a cerca de 10^{-11} M, cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-10} M, cerca de 10^{-8} M a cerca de 10^{-10} M ou cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-9} M. Em algumas modalidades, a K_D da ligações entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) é mais forte do que cerca de qualquer um de 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M

ou 10^{-12} M. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é ligante de ponto de checagem imune humano (por exemplo, PD-L1 humano ou um ligante do tipo PD-L1). Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é ligante de ponto de checagem imune de macaco cynomolgus (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1 de macaco cynomolgus). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo reconhece especificamente um epítipo no domínio extracelular do ligante de ponto de checagem imune, tais como aminoácidos 19-238 de SEQ ID NO: 4.

[0278] Em algumas modalidades, a K_{on} da ligação entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) é cerca de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou cerca de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em algumas modalidades, a K_{on} da ligação entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) é cerca de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou cerca de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a cerca de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em algumas modalidades, a K_{on} da ligação entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) não é mais do que cerca de qualquer um de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ou $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

[0279] Em algumas modalidades, a K_{off} da ligação entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) é cerca de 1 s^{-1} a cerca de 10^{-6} s^{-1} , cerca de 1 s^{-1} a cerca de 10^{-2} s^{-1} , cerca de 10^{-2} s^{-1} a cerca de 10^{-3} s^{-1} , cerca de 10^{-3} s^{-1} a cerca de 10^{-4} s^{-1} , cerca de 10^{-4} s^{-1} a cerca de 10^{-5} s^{-1} , cerca de

10^{-5} s^{-1} a cerca de 10^{-6} s^{-1} , cerca de 1 s^{-1} a cerca de 10^{-5} s^{-1} , cerca de 10^{-2} s^{-1} a cerca de 10^{-6} s^{-1} , cerca de 10^{-3} s^{-1} a cerca de 10^{-6} s^{-1} , cerca de 10^{-4} s^{-1} a cerca de 10^{-6} s^{-1} , cerca de 10^{-2} s^{-1} a cerca de 10^{-5} s^{-1} ou cerca de 10^{-3} s^{-1} a cerca de 10^{-5} s^{-1} . Em algumas modalidades, a K_{off} da ligação entre a porção de anticorpo e o ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) é pelo menos cerca de qualquer um de 1 s^{-1} , 10^{-2} s^{-1} , 10^{-3} s^{-1} , 10^{-4} s^{-1} , 10^{-5} s^{-1} ou 10^{-6} s^{-1} .

b) Anticorpos quiméricos ou humanizados

[0280] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um anticorpo quimérico. Certos anticorpos quiméricos são descritos, por exemplo, na Patente U.S. No. 4.816.567; e Morrison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Em algumas modalidades, um anticorpo quimérico compreende uma região variável não humana (por exemplo, uma região variável derivada de camundongo) e uma região constante humana. Em algumas modalidades, um anticorpo quimérico é um anticorpo “de classe trocada” em que a classe ou subclasse foi mudada daquela do anticorpo parental. Anticorpos quiméricos incluem fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos.

[0281] Em algumas modalidades, um anticorpo quimérico é um anticorpo humanizado. Tipicamente, um anticorpo não humano é humanizado para reduzir imunogenicidade para humanos, enquanto restando a especificidade e a afinidade do anticorpo não humano parental. Em geral, um anticorpo humanizado compreende um ou mais domínios variáveis em que HVRs, por exemplo, CDRs, (ou suas porções) são derivadas de um anticorpo não humano e FRs (ou suas porções) são derivadas de sequências de anticorpo humano. Um anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma porção de uma região constante humana. Em algumas modalidades, alguns resíduos FR em um anticorpo humanizado são substituídos com resíduos correspondentes de um anticorpo não humano (por exemplo, o anticorpo a

partir do qual os resíduos de HVR são derivados), por exemplo, para restaurar ou melhorar a especificidade ou afinidade do anticorpo.

[0282] Anticorpos humanizados e métodos para fabricação dos mesmos são revistos, por exemplo, Almagro e Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) e são descritos mais em, por exemplo, Riechmann e outros, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen e outros, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); US Patentes Nos. 5. 821.337, 7.527.791, 6.982.321 e 7.087.409; Kashmiri e outros, *Methods* 36:25-34 (2005) (descrevendo enxerto de SDR (α-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (descrevendo “resurfacing”); Dall’Acqua e outros, *Methods* 36:43-60 (2005) (descrevendo “embaralhamento de FR”); e Osbourn e outros, *Methods* 36:61-68 (2005) e Klimka e outros, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (descrevendo a abordagem de “seleção guiada” para embaralhamento de FR).

[0283] Regiões de estrutura principal humanas que podem ser usadas para humanização incluem, mas não estão limitados a: regiões de estrutura principal selecionadas usando o método de “melhor ajuste” (vide, por exemplo, Sims e outros. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiões de estrutura principal derivadas da sequência de consenso de anticorpos humanos de um subgrupo particular de regiões variáveis de cadeias leve e pesada (vide, por exemplo, Carter e outros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); e Presta e outros. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiões de estrutura principal maduras humanas (somaticamente mutadas) ou regiões de estrutura principal de linhagem germinativa humana (vide, por exemplo, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); e regiões de estrutura principal derivadas de avaliação de bibliotecas de FR (vide, por exemplo, Baca e outros, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) e Rosok e outros, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

c) Anticorpos humanos

[0284] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um anticorpo humano (conhecido como anticorpo de domínio humano ou DAb humano). Anticorpos humanos podem ser produzidos usando várias técnicas conhecidas no campo. Anticorpos humanos são descritos em geral em van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001), Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) e Chen, *Mol. Immunol.* 47(4):912-21 (2010). Camundongos ou ratos transgênicos capazes de produzir anticorpos de domínio único integralmente humanos (ou DAb) são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, US20090307787A1, Pat. U.S. No. 8,754,287, US20150289489A1, US20100122358A1 e WO2004049794.

[0285] Anticorpos humanos (por exemplo, DABs) podem ser preparados através da administração de um imunógeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir anticorpos humanos intactos ou anticorpos intactos com regiões humanas variáveis em resposta à provocação antigênica. Tais animais contêm tipicamente todo ou uma porção do *loci* da imunoglobulina humana, que substitui o *loci* da imunoglobulina endógeno, ou que está presente extracromossomalmente ou aleatoriamente integrado aos cromossomos do animal. Em tais camundongos transgênicos, o *loci* da imunoglobulina endógeno geralmente foi inativado. Para revisão de métodos para obtenção de anticorpos humanos a partir de animais transgênicos, vide Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Vide também, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.075.181 e 6.150.584 descrevendo tecnologia XENOMOUSE™; Patente U.S. No. 5.770.429 descrevendo tecnologia UMAB®; Patente U.S. No. 7.041.870 descrevendo tecnologia K-M MOUSE® e Publicação de Pedido de Patente U.S. No. US 2007/0061900 descrevendo tecnologia VELOCIMOUSE®). Regiões variáveis humanas de anticorpos intactos gerados por tais animais podem ser modificadas mais, por exemplo, combinando com uma região constante humana diferente.

[0286] Anticorpos humanos (por exemplo, DAbs humanos) também podem ser feitos através de métodos à base de hibridoma. Linhagens de célula de mieloma humanas e heteromieloma de camundongo-humanas para a produção de anticorpos monoclonais humanos foram descritas (vide, por exemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur e outros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); e Boerner e outros, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Anticorpos humanos gerados por meio de tecnologia de hibridoma de célula B humana são também descritos em Li e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Métodos adicionais incluem aqueles descritos, por exemplo, na Patente U.S. No. 7.189.826 (descrevendo produção de anticorpos IgM humanos monoclonais a partir de linhagens de célula de hibridoma) e Ni, *Xiandai Mi-anyixue*, 26(4):265-268 (2006) (descrevendo hibridomas humanos-humanos). Tecnologia de hibridoma humano (tecnologia Trioma) é também descrita em Vollmers e Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) e Vollmers e Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[0287] Anticorpos humanos (por exemplo, DAbs humanos) podem ser também gerados isolando sequências de domínio variável de clone de Fv selecionadas de bibliotecas de exibição de fago derivadas de humano. Tais sequências de domínio variável podem então ser combinadas com um domínio constante humano desejado. Técnicas para seleção de anticorpos humanos a partir de bibliotecas de anticorpo são descritas abaixo.

d) Anticorpos derivados de biblioteca

[0288] As porções de anticorpo podem ser isoladas através da avaliação de bibliotecas combinatoriais para anticorpos com a atividade ou atividades desejadas. Por exemplo, uma variedade de métodos é conhecida na técnica para geração de bibliotecas de exibição de fago e

avaliação de tais bibliotecas quanto a anticorpos possuindo as características de ligação desejadas. Tais métodos são revistos, por exemplo, em Hoogenboom e outros. em *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien e outros, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) e descritos ainda em, por exemplo the McCafferty e outros, *Nature* 348:552-554; Clackson e outros, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks e outros, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu e outros, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee e outros, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee e outros, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004). Métodos para construção de bibliotecas de anticorpo de domínio único foram descritos, por exemplo, na Pat. U.S. No. 7371849.

[0289] Em certos métodos de exibição de fago, repertórios de genes de V_H e V_L são separadamente clonados por reação em cadeia da polimerase (PCR) e recombinados aleatoriamente em bibliotecas de fago, que podem então ser avaliadas quanto a fago de ligação a antígeno como descrito em Winter e outros, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Fago tipicamente exhibe fragmentos de anticorpo, ou como fragmentos scFv ou fragmentos Fab. Bibliotecas de fontes imunizadas proveem anticorpos de alta afinidade para o imunógeno sem a necessidade de construção de hibridomas. Alternativamente, o repertório puro pode ser clonado (por exemplo, de humano) para prover uma fonte de anticorpos única para uma ampla gama de não auto e autoantígenos sem nenhuma imunização como descrito por Griffiths e outros, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, bibliotecas puras podem ser também feitas sinteticamente através de clonagem de segmentos de gene V não rearranjados de células-tronco, e usando *primers* de PCR contendo sequência aleatória para codificar as regiões de CDR3 altamente variáveis e realizar rearranjo *in vitro*, como descrito por Hoogenboom and Winter,

J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Publicações de patente descrevendo bibliotecas de fago de anticorpo humano incluem, por exemplo, Patente U.S. No. 5.750.373 e Publicação de Patente US Nos. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 e 2009/0002360.

[0290] Anticorpos ou fragmentos de anticorpo isolados de bibliotecas de anticorpo humano são considerados anticorpos humanos ou fragmentos de anticorpo humano no presente documento.

e) Substituição, inserção, deleção e variantes

[0291] Em algumas modalidades, variantes de anticorpo tendo uma ou mais substituições de aminoácido são providas. Sítios de interesse para mutagênese substitucional incluem as HVRs (ou CDRs) e FRs. Substituições conservativas são mostradas na Tabela 2 sob o cabeçalho de “Substituições preferidas”. Mudanças mais substanciais são providas na Tabela 2 sob o cabeçalho de “Substituições exemplares” e como descrito mais abaixo em referência a classes de cadeia lateral de aminoácido. Substituições de aminoácido podem ser introduzidas em um anticorpo de interesse e produtos avaliados quanto a uma atividade desejada, por exemplo, ligação de antígeno retida/melhorada, imunogenicidade diminuída ou ADCC ou CDC melhorada.

Tabela 2. Substituições de aminoácido

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[0292] Aminoácidos podem ser agrupados de acordo com propriedades de cadeia lateral comuns: (1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e (6) aromáticos: Trp, Pyr, Phe.

[0293] Substituições não conservativas implicarão troca de um membro de uma dessas classes por uma outra classe.

[0294] Um tipo de variante substitucional envolve substituição de um ou mais resíduos de região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Em geral, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para estudo adicional terá(ão) modificações (por exemplo, melhorias) em certas propriedades biológicas (por exemplo, afinidade aumentada, imunogenicidade reduzida) em relação ao anticorpo parental e/ou terão certas propriedades biológicas substancialmente retidas do anticorpo parental. Uma variante substitucional exemplar é um anticorpo com afinidade amadurecida, que pode ser gerado convenientemente, por exemplo, usando técnicas de maturação de afinidade com base em exibição de fago tais como aquelas descritas no presente documento. Em suma, um ou mais resíduos de HVR são mutados e os anticorpos variantes exibidos no fago e avaliados quanto a uma atividade biológica particular (por exemplo, afinidade de ligação).

[0295] Alterações (por exemplo, substituições) podem ser feitas em HVRs, por exemplo, para melhorar a afinidade do anticorpo. Tais alterações podem ser feitas em “hotspots” de HVR, isto é, resíduos codificados por códons que sofrem mutação em frequência alta durante o processo de maturação somático (vide, por exemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)) e/ou SDRs (α-CDRs), com a VH

ou VL variante sendo testada quanto à afinidade de ligação. Maturação da afinidade através da construção e nova seleção a partir de bibliotecas secundárias foi descrita, por exemplo, em Hoogenboom e outros em *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien e outros, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). Em algumas modalidades de maturação da afinidade, diversidade é introduzida nos genes variáveis escolhidos para maturação através de qualquer um de uma variedade de métodos (por exemplo, PCR propensa a erro, embaralhamento de cadeia ou mutagenese direcionada a oligonucleotídeo). Uma biblioteca secundária é então criada. A biblioteca é então avaliada para identificar quaisquer variantes de anticorpo com a afinidade desejada. Um outro método para introduzir diversidade envolve abordagens direcionadas a HVR, em que vários resíduos de HVR (por exemplo, 4-6 resíduos de uma vez) são aleatorizados. Resíduos de HVR envolvidos em ligação de antígeno podem ser especificamente identificados, por exemplo, usando mutagenese de varredura de alanina ou modelagem. CDR-H3 e CDR-L3 em particular são frequentemente direcionados.

[0296] Em algumas modalidades, substituições, inserções ou deleções podem ocorrer dentro de uma ou mais HVRs contendo que tais alterações não reduzam substancialmente a habilidade do anticorpo em se ligar a antígeno. Por exemplo, alterações conservativas (por exemplo, substituições conservativas como no presente documento provido) que não reduzem substancialmente afinidade de ligação podem ser feitas em HVRs. Tais alterações podem ser fora de “hotspots” de HVR ou CDRs. Em algumas modalidades das sequências de V_HH variantes providas acima, cada HVR é ou não alterada ou não contém mais do que uma, duas ou três substituições de aminoácido.

[0297] Um método útil para identificação de resíduos ou regiões de um anticorpo que podem ser direcionadas para mutagenese é chamado “mutagenese de varredura de alanina” como descrito por Cunningham

e Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Nesse método, um resíduo ou grupo de resíduos-alvo (por exemplo, resíduos carregados tais como Arg, Asp, His, Lys e Glu) são identificados e substituídos por um aminoácido neutro ou negativamente carregado (por exemplo, alanina ou polialanina) para determinar se a interação do anticorpo com antígeno é afetada. Substituições adicionais podem ser introduzidas nos locais de aminoácido demonstrando sensibilidade funcional às substituições iniciais. Alternativamente, ou adicionalmente, uma estrutura de cristal de um complexo antígeno-anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e antígeno. Tais resíduos de contato e resíduos vizinhos podem ser direcionados ou eliminados como candidatos à substituição. Variantes podem ser avaliadas para determinar se elas contêm as propriedades desejadas.

[0298] Inserções de sequência de aminoácido incluem fusões amino e carboxila-terminais variando em comprimento de um resíduo a polipeptídeos contendo cem ou mais resíduos, bem como inserções intrassequência de resíduos de aminoácido únicos ou múltiplos. Exemplos de inserções terminais incluem um anticorpo com um resíduo metionila N-terminal. Outras variantes insercionais da molécula de anticorpo incluem a fusão ao terminal N ou C do anticorpo a uma enzima (por exemplo, para ADEPT) ou um polipeptídeo que aumenta a meia-vida no soro do anticorpo.

f) Variantes de glicosilação

[0299] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é alterada para aumentar ou diminuir o grau até o qual o construto é glicosilado. Adição ou deleção de sítios de glicosilação a um anticorpo pode ser convenientemente obtida alterando a sequência de aminoácido de modo que um ou mais sítios de glicosilação são criados ou removidos.

[0300] Onde a porção de anticorpo compreende uma região Fc (por

exemplo, scFv-Fc), o carboidrato ligado a ela pode ser alterado. Anticorpos nativos produzidos por células de mamífero tipicamente compreendem um oligossacarídeo biantenário, ramificado, que é geralmente ligado por qualquer ligação N a Asn297 do domínio C_H2 da região Fc. Vide, por exemplo, Wright e outros. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). O oligossacarídeo pode incluir vários carboidratos, por exemplo, manose, N-acetil glicosamina (GlcNAc), galactose e ácido siálico, bem como fucose ligada a um GlcNAc no “tronco” da estrutura de oligossacarídeo biantenário. Em algumas modalidades, modificações do oligossacarídeo na porção de anticorpo podem ser feitas a fim de criar variantes de anticorpo com certas propriedades aperfeiçoadas.

[0301] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem uma estrutura de carboidrato que não tem fucose ligada (diretamente ou indiretamente) a uma região Fc. Por exemplo, a quantidade de fucose em tal anticorpo pode ser de a partir de 1% a 80%, de a partir de 1% a 65%, de a partir de 5% a 65% ou de a partir de 20% a 40%. A quantidade de fucose é determinada através do cálculo da quantidade média de fucose dentro da cadeia de açúcar em Asn297, em relação à soma de todas as glicoestruturas ligadas a Asn297 (por exemplo, estruturas híbridas e de alto teor de manose) conforme medido através de espectrometria de massa MALDI-TOF, como descrito no WO 2008/077546, por exemplo. Asn297 se refere ao resíduo asparagina localizado mais ou menos na posição 297 na região Fc (numeração EU de resíduos da região Fc); no entanto, Asn297 também pode estar localizado mais ou menos ± 3 aminoácidos a montante ou a jusante da posição 297, isto é, entre as posições 294 e 300, devido a pequenas variações de sequência em anticorpos. Tais variantes de fucosilação podem ter função de ADCC melhorada. Vide, por exemplo, Publicações de Patente US Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo

Co., Ltd). Exemplos de publicações relacionadas a variantes de anticorpo “desfucosiladas” ou “deficientes em fucose” incluem: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki e outros. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki e outros. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Exemplos de linhagens de célula capazes de produzir anticorpos desfucosilados incluem células CHO Lec13 deficientes em fucosilação de proteína (Ripka e outros. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Pedido de Patente U.S. No. US 2003/0157108 A1, Presta, L; e WO 2004/056312 A1, Adams e outros, especialmente no Exemplo 11) e linhagens de célula de inativação, tais como gene alfa-1,6-fucosiltransferase, *FUT8*, células CHO de inativação (vide, por exemplo, Yamane-Ohnuki e outros. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. e outros, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); e WO2003/085107).

[0302] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem oligossacarídeos bisseccionados, por exemplo, em que um oligossacarídeo bi-antênario ligado à região Fc do anticorpo é bisseccionado por GlcNAc. Tais variantes de anticorpo podem ter fucosilação reduzida e/ou função de ADCC melhorada. Exemplos de tais variantes de anticorpo são descritos, por exemplo, WO 2003/011878 (Jean-Mairet e outros.); Patente US No. 6.602.684 (Umana e outros.); e US 2005/0123546 (Umana e outros). Variantes de anticorpo com pelo menos um resíduo galactose no oligossacarídeo ligado à região Fc são também providas. Tais variantes de anticorpo podem ter função CDC melhorada. Tais variantes de anticorpo são descritas, por exemplo, no WO 1997/30087 (Patel e outros.); WO 1998/58964 (Raju, S.); e WO 1999/22764 (Raju, S.).

g) Variantes de região Fc

[0303] Em algumas modalidades, uma ou mais modificações de aminoácido podem ser introduzidas na região Fc da porção de anticorpo (por exemplo, scFv-Fc), dessa maneira gerando uma variante de região Fc. A variante da região F pode compreender uma sequência de região Fc humana (por exemplo, região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana) compreendendo uma modificação de aminoácido (por exemplo, uma substituição) em uma ou mais posições de aminoácido.

[0304] Em algumas modalidades, o fragmento Fc possui algumas, mas não todas, funções efectoras, o que faz dele um candidato desejável para aplicações em que a meia-vida da porção de anticorpo *in vivo* é importante ainda que certas funções efectoras (tal como complemento e ADCC) sejam desnecessárias ou prejudiciais. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* e/ou *in vivo* podem ser conduzidos para confirmar a redução/depleção de atividades de CDC e/ou ADCC. Por exemplo, ensaios de ligação de receptor Fc (FcR) podem ser conduzidos para assegurar que o anticorpo não tenha a ligação a FcγR (desta maneira provavelmente sem atividade de ADCC), mas retém a habilidade de ligação a FcRn. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam apenas FcγRIII, enquanto monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. Expressão de FcR em células hematopoiéticas é sumarizada na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Exemplos não limitantes de ensaios *in vitro* para avaliar atividade de ADCC de uma molécula de interesse são descritos na Patente U.S. No. 5.500.362 (vide, por exemplo, Hellstrom, I. e outros, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) e Hellstrom, I e outros, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (vide Bruggemann, M. e outros, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Alternativamente, métodos de ensaio não radioativos podem ser usados (vide, por exemplo, ensaio de citotoxicidade não radioativo ACTI™ para citometria de fluxo

(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; e ensaio citotóxico não radioativo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Células efetoras úteis para tais ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células Assassinas Naturais (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, atividade de ADCC das moléculas de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo de animal tais como aqueles descritos em Clynes e outros. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Ensaios de ligação a C1q podem ser também realizados para confirmar que o anticorpo é incapaz de se ligar a C1q e dessa maneira não tem atividade de CDC. Vide, por exemplo, ELISA de ligação de C1q e C3c no WO 2006/029879 e no WO 2005/100402. Para avaliar ativação completa, um ensaio de CDC pode ser realizado (vide, por exemplo, Gazzano-Santoro e outros, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. e outros, *Blood* 101:1045-1052 (2003); e Cragg, M.S. e M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Determinações de ligação a FcRn e eliminação/meia-vida *in vivo* podem ser também realizadas usando métodos conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Petkova, S.B. e outros, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

[0305] Anticorpos com função efetora reduzida incluem aqueles com substituição de um ou mais resíduos da região Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 e 329 (Patente U.S. No. 6.737.056). Tais mutantes de Fc incluem mutantes de Fc com substituições em duas ou mais de posições de aminoácido 265, 269, 270, 297 e 327, incluindo o chamado mutante de Fc "DANA" com substituição de resíduos 265 e 297 para alanina (Patente US No. 7.332.581).

[0306] Certas variantes de anticorpo com ligação melhorada ou diminuída a FcRs são descritas. (Vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.737.056; WO 2004/056312 e Shields e outros, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

[0307] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende uma região Fc com uma ou mais substituições de aminoácido que melhoram ADCC, por exemplo, substituições nas posições 298, 333 e/ou 334 da região Fc (numeração EU de resíduos).

[0308] Em algumas modalidades, alterações são feitas na região Fc que resultam em ligação a C1q alterada (isto é, ou melhorada ou diminuída) e/ou Citotoxicidade Dependente do Complemento (CDC), por exemplo, como descrito na Patente U.S. No. 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie e outros. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0309] Em algumas modalidades, a variante da porção de anticorpo (por exemplo, scFv-Fc) compreendendo uma região Fc variante compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido que altera a meia-vida e/ou muda ligação ao receptor de Fc neonatal (FcRn). Anticorpos com meias-vidas aumentadas e ligação aperfeiçoada ao receptor Fc neonatal (FcRN), que são responsáveis pela transferência de IgGs materna para o feto (Guyer e outros, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim e outros, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), são descritos na US2005/0014934A1 (Hinton e outros). Esses anticorpos compreendem uma região Fc com uma ou mais substituições na mesma que altera a ligação da região Fc a FcRn. Tais variantes de Fc incluem aquelas com substituições em um ou mais resíduos da região Fc, por exemplo, substituição de resíduo 434 na região Fc (Patente US 7.371.826).

[0310] Vide também Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patente U.S. No. 5.648.260; Patente U.S. No. 5.624.821; e WO 94/29351 com.

h) Variantes de anticorpo engenheirado com cisteína

[0311] Em algumas modalidades, pode ser desejável criar porções de anticorpo engenheirado com cisteína, por exemplo, “tioMAbs”, em que um ou mais resíduos de um anticorpo são substituídos com resíduos cisteína. Em modalidades particulares, os resíduos substituídos

ocorrem em sítios acessíveis do anticorpo. Ao substituir esses resíduos com cisteína, grupos tióis reativos são dessa maneira posicionados em sítios acessíveis do anticorpo e podem ser usados para conjugar o anticorpo a outras porções, tais como porções de fármaco ou porções de ligante-fármaco, para criar um imunocjugado, como descrito mais no presente documento. Em algumas modalidades, qualquer um ou mais dos resíduos que seguem podem ser substituídos com cisteína: A118 (numeração EU) da cadeia pesada; e S400 (numeração EU) da região Fc de cadeia pesada. Porções de anticorpo engenheirado com cisteína podem ser geradas como descrito, por exemplo, na Patente U.S. No. 7.521.541.

i) Derivados de anticorpo

[0312] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo descrita no presente documento pode ser modificada mais para compreender porções não proteináceas adicionais que são conhecidas na técnica e prontamente disponíveis. As porções adequadas para derivatização do anticorpo incluem, mas não estão limitadas a, polímeros solúveis em água. Exemplos não limitantes de polímeros solúveis em água incluem, mas não estão limitados a, polietileno glicol (PEG), copolímeros de etileno glicol/propileno glicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool de polivinila, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anidrido maleico, poliaminoácidos (ou homopolímeros ou copolímeros aleatórios) e dextrano ou poli(n-vinil pirrolidona)polietileno glicol, homopolímeros de propileno glicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polióis polioxiethylados (por exemplo, glicerol), álcool de polivinila e misturas dos mesmos. Propionaldeído polietileno glicol pode ter vantagens na fabricação devido à sua estabilidade em água. O polímero pode ser de qualquer peso molecular, e pode ser ramificado ou não ramificado. O número de polímeros ligado ao anticorpo pode variar, e se mais de um polímero for ligado, eles podem ser

moléculas iguais ou diferentes. Em geral, o número e/ou tipo de polímeros usado para derivatização pode ser determinado com base em considerações incluindo, mas não limitado a, propriedades ou funções particulares do anticorpo a ser melhorado, se o derivado de anticorpo for usado em diagnóstico sob condições definidas, etc.

[0313] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo pode ser modificada mais para compreender uma ou mais proteína biologicamente ativa, polipeptídeos ou seus fragmentos. “Bioativo” ou “biologicamente ativo” como no presente documento usado intercomutavelmente significa mostrar atividade biológica no corpo para realizar uma função específica. Por exemplo, pode significar a combinação com uma biomolécula particular tal como proteína, DNA, etc., e então promoção ou inibição da atividade de tal biomolécula. Em algumas modalidades, a proteína bioativa ou fragmentos da incluem proteínas e polipeptídeos que são administrados a pacientes como a substância de fármaco ativa para prevenção de ou tratamento de uma doença ou condição, bem como proteínas e polipeptídeos que são usados para propósitos de diagnóstico, tais como enzimas usadas em testes de diagnóstico ou ensaios *in vitro*, bem como proteínas e polipeptídeos que são administrados a um paciente para evitar uma doença tal como uma vacina.

VI. Métodos de preparação

[0314] Em algumas modalidades, é provido um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a um ligante de ponto de checagem imune. Os agentes de imagem descritos no presente documento podem ser preparados através de vários processos como geralmente descrito abaixo e mais especificamente nos Exemplos.

[0315] Em algumas modalidades, é provido um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a um ligante de ponto de checagem imune, compreendendo: (a) conjugação de um agente de

quelação a uma porção de anticorpo (por exemplo, scFv) se ligando especificamente ao ligante de ponto de checagem imune para prover um conjugado de porção de anticorpo; e (b) contato de um radionuclídeo com o conjugado de porção de anticorpo, dessa maneira provendo o agente de imagem. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou derivados do mesmo. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, o composto de quelação é conjugado a uma lisina da porção de anticorpo. Em algumas modalidades, o método compreende ainda isolamento do agente de imagem do composto de quelação e/ou do radionuclídeo.

[0316] Em algumas modalidades, é provido um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a um ligante de ponto de checagem imune, compreendendo: (a) conjugação de um composto de quelação a qualquer uma das porções de anticorpo descritas no presente documento para prover um conjugado de porção de anticorpo, em que a porção de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune; e (b) contato de um radionuclídeo com o conjugado da porção de anticorpo, dessa maneira provendo o agente de imagem. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOA ou derivados dos mesmos. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F ,

^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, o composto de quelação é conjugado a uma lisina da porção de anticorpo. Em algumas modalidades, o método compreende ainda isolamento do agente de imagem a partir do composto de quelação e/ou radionuclídeo.

[0317] Em algumas modalidades, é provido um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a um ligante de ponto de checagem imune, compreendendo: (a) contato de um composto de quelação com um radionuclídeo; (b) conjugação do composto de quelação que quela o radionuclídeo para qualquer uma das porções de anticorpo descritas no presente documento, em que a porção de anticorpo se liga especificamente ao ligante de ponto de checagem imune, dessa maneira provendo o agente de imagem. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é PD-L1. Em algumas modalidades, o ligante de ponto de checagem imune é um ligante do tipo PD-L1. Em algumas modalidades, o composto de quelação é NOTA, DOTA ou seus derivados. Em algumas modalidades, o radionuclídeo é selecionado do grupo consistindo em ^{64}Cu , ^{18}F , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{19}F , ^{66}Ga , ^{72}Ga , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{86}Y , ^{88}Y e ^{45}Ti . Em algumas modalidades, o radionuclídeo é ^{68}Ga . Em algumas modalidades, o composto de quelação é conjugado a uma lisina da porção de anticorpo. Em algumas modalidades, o método compreende ainda isolamento do agente de imagem do composto de quelação e/ou um radionuclídeo.

[0318] Em algumas modalidades, é provido um método de preparação de um agente de imagem se direcionando a um ligante de ponto de checagem imune, compreendendo: (a) conjugação de um scFv especificamente se ligando ao ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1) a p-SNC-Bn-NOTA para prover um conjugado de scFv; (b) contato de ^{68}Ga com o conjugado de scFv,

dessa maneira provendo o agente de imagem. Em algumas modalidades, o conjugado de scFv é isolado passando a mistura do scFv e p-SCN-Bn-NOTA através de uma coluna (por exemplo, coluna NAP-5). Em algumas modalidades, o agente de imagem é isolado passando a mistura de ^{68}Ga com o conjugado de scFv através de uma coluna (por exemplo, coluna NAP-5).

Expressão e Produção de Anticorpo

[0319] As porções de anticorpo descritas no presente documento podem ser preparadas usando quaisquer métodos conhecidos na técnica, incluindo aqueles descritos abaixo e nos Exemplos.

Anticorpos monoclonais

[0320] Anticorpos monoclonais são obtidos de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto por mutações de ocorrência natural possíveis e/ou modificações pós-traducionais (por exemplo, isomerização, amidações) que possam estar presentes em quantidades pequenas. Portanto, o modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos diferentes. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser feitos usando o método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e outros, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante (Pat. U.S. No. 4.816.567). No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um *hamster* ou uma lhama, é imunizado como descrito no presente documento acima para elicitar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína usada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles*

and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Vide também Exemplo 1 para imunização em Camelos.

[0321] O agente de imunização incluirá tipicamente a proteína anti-gênica ou uma variante de fusão da mesma. Em geral, quaisquer linfócitos de sangue periférico ("PBLs") são fundidos se células de origem humana forem desejadas, ou células do baço ou células do nó linfático são usadas se fontes de mamífero não humanas forem desejadas. Os linfócitos são então fundidos com uma linhagem de célula imortalizada usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103.

[0322] Linhagens de célula imortalizadas são geralmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origem de roedor, bovina e humana. Geralmente, linhagens de célula de mieloma de rato ou camundongo são usadas. As células de hibridoma então preparadas são semeadas e cultivadas em um meio de cultura adequado que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência de células de mieloma parentais, não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não tiverem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirão tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), que são substâncias que evitam o crescimento de células deficientes em HGPRT.

[0323] Células de mieloma imortalizadas preferidas são aquelas que fundem eficientemente, dão apoio à produção de alto nível de anticorpo pelas células de produção de anticorpo selecionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Dentre essas, preferidas são linhagens de mieloma de murino, tais como aquelas derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA e células SP-2 (e seus

derivados, por exemplo, X63-Ag8-653) disponíveis da American Type Culture Collection, Manassas, Va. USA. Linhagens de célula de mieloma humano e heteromieloma não humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur e outros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0324] Meio de cultura em que células de hibridoma estão crescendo é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA).

[0325] O meio de cultura em que as células de hibridoma são cultivadas pode ser ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno desejado. Preferivelmente, a afinidade e especificidade de ligação do anticorpo monoclonal podem ser determinadas através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio ligado à enzima (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidos no campo. Por exemplo, afinidade de ligação pode ser determinada através de análise Scatchard de Munson e outros, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0326] Após serem identificadas células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados através da limitação dos procedimentos de diluição e cultivo através de métodos padrão (Goding, *supra*). Meios de cultura adequados para esse propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Ainda, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores em um mamífero.

[0327] Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascites ou soro através de procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, Protein A Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

[0328] Anticorpos monoclonais também podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante, tais como aqueles descritos na Pat. U.S. No. 4.816.567 e descritos acima. DNA codificando os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves de anticorpos de murino). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser posto em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras tais como células de E. coli, células COS de símio, células de ovário de hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína imunoglobulina, a fim de sintetizar anticorpos monoclonais em tais células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA codificando o anticorpo incluem Skerra e outros, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) e Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

[0329] Em uma modalidade adicional, anticorpos podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo geradas usando as técnicas descritas em McCafferty e outros, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson e outros, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks e outros, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos de murino e humano, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) através de embaralhamento de cadeia (Marks e

outros, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como infecção combinatorial e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse e outros, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Portanto, essas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma de anticorpo monoclonal tradicionais para isolamento de anticorpos monoclonais.

[0330] O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação para domínios constante de cadeia pesada e cadeia leve no lugar de sequências de murino homólogas (Pat. U.S. No. 4.816.567; Morrison, e outros, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) ou unindo covalentemente à sequência de codificação de imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo não imunoglobulina. Tipicamente tais polipeptídeos não imunoglobulina são substitutos para os domínios constantes de um anticorpo ou eles são substitutos para os domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno tendo especificidade para um antígeno e um outro sítio de combinação de antígeno tendo especificidade para um antígeno diferente.

[0331] Os anticorpos monoclonais descritos no presente documento podem ser monovalentes, cuja preparação é bem conhecida na técnica. Por exemplo, um método envolve expressão recombinante de cadeia leve da imunoglobulina e uma cadeia pesada modificada. A cadeia pesada é truncada em geral em qualquer ponto na região Fc de modo a evitar reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos cisteína relevantes podem ser substituídos com um outro resíduo de aminoácido ou são deletados de modo a evitar reticulação. Métodos *in vitro* são também adequados para preparação de anticorpos monovalentes. Digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, particularmente

fragmentos Fab, pode ser realizada usando técnicas de rotina conhecidas no campo.

[0332] Anticorpos quiméricos ou híbridos podem ser também preparados *in vitro* usando métodos conhecidos em química de proteína sintética, incluindo aqueles envolvendo agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando uma reação de troca de dissulfeto ou através da formação de uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para esse propósito incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato.

[0333] Vide também o Exemplo 1 para produção de anticorpo monoclonal.

Moléculas de Ácido Nucleico Codificando Porções de Anticorpo

[0334] O presente pedido provê ainda moléculas de ácido nucleico isoladas compreendendo polinucleotídeos que codificam uma ou mais cadeias das porções de anticorpo (por exemplo, porções de anticorpo anti-PD-L1) descritas no presente documento. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada ou uma cadeia leve de uma porção de anticorpo (por exemplo, porção de anticorpo anti-PD-L1). Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico compreende ambos um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada e um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve, de uma porção de anticorpo (por exemplo, uma porção de anticorpo anti-PD-L1). Em algumas modalidades, uma primeira molécula de ácido nucleico compreende um primeiro polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada e uma segunda molécula de ácido nucleico compreende um segundo polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico codificando um scFv (por exemplo, scFv anti-PD-L1) é provida.

[0335] Em algumas modalidades, a cadeia pesada e a cadeia leve são expressas a partir de uma molécula de ácido nucleico, ou de duas

moléculas de ácido nucleico separadas, como dois polipeptídeos separados. Em algumas modalidades, tal como quando um anticorpo é um scFv, um polinucleotídeo único codifica um polipeptídeo único compreendendo ambas uma cadeia pesada e uma cadeia leve unidas.

[0336] Em algumas modalidades, um polinucleotídeo codificando uma cadeia pesada ou cadeia leve de uma porção de anticorpo (por exemplo, porção de anticorpo anti-PD-L1) compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência líder que, quando traduzida, está localizada no terminal amino da cadeia pesada ou da cadeia leve. Como discutido acima, a sequência líder pode ser a sequência líder de cadeia pesada ou leve nativa ou pode ser uma outra sequência líder heteróloga.

[0337] Moléculas de ácido nucleico podem ser construídas usando técnicas de DNA recombinante convencionais no campo. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão que é adequado para expressão em uma célula hospedeira selecionada.

Vetores

[0338] Vetores compreendendo polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e/ou cadeias leves de qualquer uma das porções de anticorpo descritas no presente documento (por exemplo, porções de anticorpo anti-PD-L1) são providos. Vetores, compreendendo polinucleotídeos que codificam qualquer um dos scFv descritos no presente documento (por exemplo, scFv anti-PD-L1) são também providos. Tais vetores incluem, mas não estão limitados a, vetores de DNA, vetores de fago, vetores virais, vetores retrovirais, etc. Em algumas modalidades, um vetor compreende uma primeira sequência de nucleotídeo codificando uma cadeia pesada e uma segunda sequência de polinucleotídeo codificando uma cadeia leve. Em algumas modalidades, a cadeia pesada e a cadeia leve são expressas a partir do vetor de modo a separar

polipeptídeos. Em algumas modalidades, a cadeia pesada e a cadeia leve são expressas como parte de um polipeptídeo único tal como, por exemplo, quando o anticorpo é um scFv.

[0339] Em algumas modalidades, um primeiro vetor compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada e um segundo vetor compreende um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve. Em algumas modalidades, o primeiro vetor e o segundo vetor são transfectados em células hospedeiras em quantidades similares (tais como quantidades molares similares ou quantidades de massa similares). Em algumas modalidades, uma razão em mol ou massa entre 5:1 e 1:5 do primeiro vetor e do segundo vetor é transfectada em células hospedeiras. Em algumas modalidades, uma razão em massa entre 1:1 e 1:5 para o vetor codificando a cadeia pesada e o vetor codificando a cadeia leve é usada. Em algumas modalidades, uma razão em massa de 1:2 para o vetor codificando a cadeia pesada e o vetor codificando a cadeia leve é usada.

[0340] Em algumas modalidades, é selecionado um vetor que é otimizado para expressão de polipeptídeos em CHO ou células derivadas de CHO ou em células NOS. Exemplos de tais vetores são descritos, por exemplo, em Running Deer e outros, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

Células Hospedeiras

[0341] Em algumas modalidades, as porções de anticorpo descritas no presente documento (por exemplo, porções de anticorpo anti-PD-L1) podem ser expressas em células procarióticas, tais como células bacterianas; ou em células eucarióticas, tais como células fúngicas (tais como levedura), células de planta, células de inseto e células de mamífero. Tal expressão pode ser realizada, por exemplo, de acordo com procedimentos conhecidos na técnica. Células eucarióticas exemplares que

podem ser usadas para expressar polipeptídeos incluem, mas não estão limitadas a, células COS, incluindo células COS 7; células 293, incluindo células 293-6E; células CHO; incluindo CHO-S, DG44. Células CHO Lec13 e células CHO FUT8; células PER.C6[®] (Crucell); e células NSO. Em algumas modalidades, as porções de anticorpo descritas no presente documento (por exemplo, porções de anticorpo anti-PD-L1) podem ser expressas em levedura. Vide, por exemplo, Publicação U.S. US 2006/0270045 A1. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira eucariótica particular é selecionada com base em sua habilidade em fazer modificações pós-traducionais desejadas nas cadeias pesadas e/ou cadeias leves da porção de anticorpo. Por exemplo, em algumas modalidades, células CHO produzem polipeptídeos que têm um nível maior de sialilação do que o mesmo polipeptídeo produzido em células 293.

[0342] Introdução de um ou mais ácidos nucleicos em uma célula hospedeira desejada pode ser realizada através de qualquer método, incluindo, mas não limitado a, transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, transfecção mediada por lipídeo catiônico, eletroporação, transdução, infecção, etc. Métodos exemplares não limitantes são descritos, por exemplo, em Sambrook e outros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Ácidos nucleicos podem ser transientemente ou estavelmente transfectados nas células hospedeiras desejadas, de acordo com qualquer método adequado.

[0343] A invenção também provê células hospedeiras compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos ou vetores descritos no presente documento. Em algumas modalidades, a invenção provê uma célula hospedeira compreendendo um anticorpo anti-PD-L1. Quaisquer células hospedeiras capazes de superexpressar DNAs heterólogos podem ser usadas para o propósito de isolamento dos genes codificando

o anticorpo, polipeptídeos ou proteína de interesse. Exemplos não limitantes de células hospedeiras de mamífero incluem, mas não estão limitados a, células COS, HeLa e CHO. Vide também Publicação PCT No. WO 87/04462. Células hospedeiras de não mamífero adequadas incluem procariontes (tal como *E. coli* ou *B. subtilis*) e levedura (tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; ou *K. lactis*).

[0344] Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é produzida em um sistema livre de células. Sistemas livres de células exemplares não limitantes são descritos, por exemplo, em Sitaraman e outros, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo e outros, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

Purificação de porções de anticorpo

[0345] As porções de anticorpo (por exemplo, porções de anticorpo anti-PD-L1) podem ser purificadas através de qualquer método adequado. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, uso de matrizes de afinidade ou cromatografia de interação hidrofóbica. Ligantes de afinidade adequados incluem o ROR1 ECD e ligantes que se ligam a regiões constantes de anticorpo. Por exemplo, uma coluna de afinidade de Proteína A, Proteína G, Proteína A/G ou um anticorpo pode ser usada para obter a região constante e purificar uma porção de anticorpo compreendendo um fragmento Fc. Cromatografia de interação hidrofóbica, por exemplo, uma coluna de butila ou fenila, pode ser também adequada para purificação de alguns polipeptídeos tais como anticorpos. Cromatografia de troca iônica (por exemplo, cromatografia de troca aniônica e/ou cromatografia de troca catiônica) pode também ser adequada para purificação de alguns polipeptídeos tais como anticorpos. Cromatografia de modo misto (por exemplo, de fase reversa/troca aniônica, fase reversa/troca catiônica, interação hidrofílica/troca aniônica, interação hidrofílica/troca catiônica, etc.) pode também ser adequada para purificação de alguns polipeptídeos tais como anticorpos. Muitos

métodos de purificação de polipeptídeos são conhecidos na técnica.

VII. Métodos de Tratamento

[0346] Para a prevenção ou tratamento de doença, o agente de anticorpo anti-PD-L1 como no presente documento descrito pode ser administrado a indivíduos (por exemplo, mamíferos tais como humanos) para tratar ou prevenir uma doença ou condição.

[0347] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que:

a) uma V_H compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada (HC-CDR) 1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42, e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e b) uma V_L compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve (LC-CDR) 1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável

de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42, e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e/ou b) uma V_L compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19. Em algumas modalidades, a doença ou condição é um câncer. E algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, carcinoma urotelial, linfoma de Hodgkin, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores de cabeça e pescoço, câncer de estômago, linfoma de célula B, carcinoma de célula de Merkel, câncer de fígado e câncer cervical. Em algumas modalidades, o indivíduo é

um humano. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é quimérica ou humanizada. Em algumas modalidades a porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em Fv de cadeia única (scFv), um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂, um VHH, uma fusão Fv-Fc, uma fusão scFv-Fc, uma fusão scFv-Fv, um diacorpo, um tricorpo e um tetracorpo. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um anticorpo de cadeia única. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo compreende um fragmento Fc. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é um anticorpo de comprimento integral. Em algumas modalidades, a porção de anticorpo tem um isotipo selecionado do grupo consistindo em um IgG, um IgM, um IgA e IgD e um IgE. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG. Em algumas modalidades, o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 ou IgG4. Em algumas modalidades, o fragmento Fc compreende mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 é cerca de 0,005 µg/kg a cerca de 5 g/kg de peso do corpo total do indivíduo. Em algumas modalidades, o agente de anticorpo é administrado intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou oralmente.

[0348] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: (a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (b) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID

NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (c) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (d) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (e) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (f) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (g) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (h) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; ou (i) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0349] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo, em que uma porção de anticorpo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% (tal como pelo menos cerca de 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21 ou 23.

[0350] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma

HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0351] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de melanoma em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de melanoma em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma

LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0352] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de carcinoma de célula renal em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de carcinoma de célula renal em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3,

7, 15, 17 e 19.

[0353] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer colorretal em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer colorretal em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0354] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de carcinoma urotelial em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo

anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de carcinoma urotelial em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0355] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de linfoma de Hodgkin em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H

compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de linfoma de Hodgkin em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0356] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de pulmão de pequenas células em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-

CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de pulmão de pequenas células em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0357] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0358] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de tumores de cabeça e pescoço em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido

um método de tratamento de tumores de cabeça e pescoço em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0359] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de estômago em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de estômago em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-

L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0360] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de linfoma de célula B em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de linfoma de célula B em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as

sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0361] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de fígado em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer de fígado em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma

LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0362] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de carcinoma de célula de Merkel em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de carcinoma de célula de Merkel em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de

SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0363] Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer cervical em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46. Em algumas modalidades, é provido um método de tratamento de câncer cervical em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0364] Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero (por exemplo, humano, primata não humano, rato, camundongo, vaca, ca-

valo, porco, ovelha, cabra, cachorro, gato, etc.). Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano. Em algumas modalidades, o indivíduo é um paciente clínico, um voluntário de teste clínico, um animal experimental, etc. Em algumas modalidades, o indivíduo é uma pessoa mais jovem do que cerca de 60 anos (incluindo, por exemplo, mais jovem do que cerca de 50, 40, 30, 25, 20, 15 ou 10 anos de idade). Em algumas modalidades, o indivíduo é mais velho do que cerca de 60 anos de idade (incluindo, por exemplo, mais velho do que cerca de qualquer um de 70, 80, 90 ou 100 anos de idade). Em algumas modalidades, o indivíduo é diagnosticado com ou geneticamente propenso a uma ou mais das doenças ou distúrbios descritos no presente documento (tais como melanoma, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, carcinoma urotelial, linfoma de Hodgkin, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores de cabeça e pescoço, câncer de estômago, linfoma de célula B, carcinoma de célula de Merkel, câncer de fígado ou câncer cervical). Em algumas modalidades, o indivíduo tem um ou mais fatores de risco associados com uma ou mais doenças ou distúrbios descritos no presente documento.

Dosagem e Método de Administração do Agente de Anticorpo Anti-PD-L1

[0365] A dose do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou a porção de anticorpo) usado para tratamento de uma doença ou distúrbio como descrito no presente documento administrado ao indivíduo pode variar com o agente de anticorpo particular (ou a porção de anticorpo), o modo de administração e o tipo de doença ou condição sendo tratada. Em algumas modalidades, o tipo de doença ou condição é câncer. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou a porção de anticorpo) é uma quantidade que é eficaz para resultar em uma resposta objetiva (tal como uma resposta parcial ou uma resposta completa). Em algumas modalidades, a quantidade eficaz

do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é uma quantidade que é suficiente para resultar em uma resposta completa no indivíduo. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é uma quantidade que é suficiente para resultar em uma resposta parcial no indivíduo. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é uma quantidade que é suficiente para produzir uma taxa de resposta geral de mais do que cerca de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 64%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% ou 90% dentre uma população de indivíduos tratados com o agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou a porção de anticorpo). Respostas de um indivíduo ao tratamento dos métodos descritos no presente documento podem ser determinadas, por exemplo, com base em níveis de RECIST.

[0366] Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é uma quantidade que é suficiente para prolongar a sobrevivência livre de progresso do indivíduo. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é uma quantidade que é suficiente para prolongar a sobrevivência geral do indivíduo. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é uma quantidade que é suficiente para produzir o benefício clínico de mais do que cerca de qualquer um de 50%, 60%, 70% ou 77% dentre uma população de indivíduos tratados com o agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou a porção de anticorpo).

[0367] Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) sozinho ou em combinação com um segundo, terceiro e/ou quarto agente é uma quantidade suficiente para diminuir o tamanho de um tumor, diminuir o número de células de câncer ou diminuir a taxa de crescimento de um tumor em

pelo menos cerca de qualquer um de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% comparado com o tamanho do tumor correspondente, número de células de câncer ou taxa de crescimento de tumor no mesmo indivíduo antes do tratamento ou comparado com a atividade correspondente em outros indivíduos não recebendo o tratamento. Métodos padrão podem ser usados para medir a magnitude desse efeito, tais como ensaios *in vivo* com enzima purificada, ensaios baseados em célula, modelos de animal ou teste humano.

[0368] Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou a porção de anticorpo) é uma quantidade que está abaixo do nível que induz um efeito toxicológico (isto é, um efeito acima de um nível de toxicidade clinicamente aceitável) ou está em um nível onde um efeito colateral potencial pode ser controlado ou tolerado quando a composição é administrada ao indivíduo.

[0369] Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou a porção de anticorpo) é uma quantidade que está próximo de uma dose máxima tolerada (MTD) da composição seguindo o mesmo regime de dosagem. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é mais do que cerca de qualquer um de 80%, 90%, 95% ou 98% da MTD.

[0370] Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) está incluída em uma faixa de cerca de 0,001 µg a cerca de 10 g, por exemplo, cerca de 0,001 µg a cerca de 0,01 µg, cerca de 0,01 µg a cerca de 0,1 µg, cerca de 0,1 µg a cerca de 1 µg, cerca de 1 µg a cerca de 10 µg, cerca de 10 µg a cerca de 100 µg, cerca de 100 µg a cerca de 1 mg, cerca de 1 mg a cerca de 10 mg, cerca de 10 mg a cerca de 100 mg, cerca de 100 mg a cerca de 1 g ou cerca de 1 g a cerca de 10 g. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de

anticorpo) é pelo menos cerca de 0,001 µg, 0,01 µg, 0,1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 1 g ou 5 g. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) não é mais do que cerca de 0,05 µg, 0,1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 1 g ou 10 g.

[0371] Em algumas modalidades de qualquer um dos aspectos acima, a quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) está na faixa de cerca de 0,005 µg/kg a cerca de 5g/kg do peso total do corpo, por exemplo, cerca de 0,005 µg/kg a cerca de 0,05 µg/kg, cerca de 0,05 µg/kg a cerca de 0,5 µg/kg, cerca de 0,5 µg/kg a cerca de 5 µg/kg, cerca de 5 µg/kg a cerca de 50 µg/kg, cerca de 50 µg/kg a cerca de 500 µg/kg, cerca de 500 µg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, cerca de 50 mg/kg a cerca de 500 mg/kg ou cerca de 500 mg/kg a cerca de 5g/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) é pelo menos cerca de 0,005 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,5 µg/kg, 5 µg/kg, 50 µg/kg, 500 µg/kg, 5 mg/kg, 50 mg/kg, 500 mg/kg, ou 2,5g/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1 (ou da porção de anticorpo) não é mais do que cerca de 0,01 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,5 µg/kg, 5 µg/kg, 50 µg/kg, 500 µg/kg, 5 mg/kg, 50 mg/kg, 500 mg/kg ou 5 g/kg.

[0372] O agente de anticorpo anti-PD-L1 pode ser administrado a um indivíduo (tal como um humano) por meio de várias vias incluindo, por exemplo, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intrapulmonar, oral, inalação, intravesicular, intramuscular, intratraqueal, subcutânea, intraocular, intratecal, transmucosal e transdermal. Em algumas modalidades, o agente de anticorpo anti-PD-L1 está incluído em uma composição farmacêutica enquanto administrado ao indivíduo. Em algumas modalidades, formulação de liberação contínua sustentada da compo-

sição pode ser usada. Em algumas modalidades, a composição é administrada intravenosamente. Em algumas modalidades, a composição é administrada intraperitonealmente. Em algumas modalidades, a composição é administrada intramuscularmente. Em algumas modalidades, a composição é administrada subcutaneamente. Em algumas modalidades, a composição é administrada intravenosamente. Em algumas modalidades, a composição é administrada oralmente.

Terapia de combinação

[0373] O presente pedido também provê métodos de administração de um agente de anticorpo anti-PD-L1 a um indivíduo para tratamento de uma doença ou condição (tal como câncer), em que o método compreende ainda administrar um segundo agente ou terapia. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia é um agente padrão ou comumente usado para tratamento da doença ou condição. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende um agente quimioterapêutico. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende uma cirurgia. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende uma terapia de radiação. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende uma imunoterapia. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende uma terapia hormonal. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende um inibidor de angiogênese. Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia compreende um inibidor da tirosina cinase.

[0374] Em algumas modalidades, o agente de anticorpo anti-PD-L1 é administrado simultaneamente com o segundo agente ou terapia. Em algumas modalidades, o agente de anticorpo anti-PD-L1 é administrado concomitantemente com o segundo agente ou terapia. Em algumas modalidades, o agente de anticorpo anti-PD-L1 é administrado sequencialmente com o segundo agente ou terapia. Em algumas modalidades, o

agente de anticorpo anti-PD-L1 é administrado na mesma forma de dosagem unitária que o segundo agente ou terapia. Em algumas modalidades, o agente de anticorpo anti-PD-L1 é administrado em uma forma de dosagem unitária diferente do segundo agente ou terapia.

[0375] Em algumas modalidades, o segundo agente ou terapia é selecionado do grupo consistindo em Brentuximabe, BMS-986016, Urelumabe, Mogamulizumabe, Varlilumabe, DS-8273a, Pomalidomide, elotuzumabe, Epacadostate, BMS-986205, Indoximode, ABT-399, Motolimode, cetuximabe, BMS-986012, Glembatumumabe vedotin, BMS-986148, ALT-803, Cabiralizumabe, ABBV-085, Bevacizumabe, pemetrexede, erlotinibe, crizotinibe, BMS-986156, Lirilumabe, Elotuzumabe, Interferon-gama, BMS-986179, BMS-986178, ABBV-368, Ramucirumabe, Interleucins 2, Daratumumabe, Oregovomabe, NKTR-214, ABBV-927, JTX-2011 eecaliximab, BMS-986207, Dinutuximab beta, Nimotuzumab, ABBV-428, X4P-001, Trastuzumabe-DM1, Ipilimumabe, Interferon alfa-2b, MK-4166, Indoximode, Rituximabe, Necitumumabe, Enoblituzumabe, GSK3174998, Ublituximabe, TGR-1202, MK-1248, PV-10, Mirvetuximabe soravtansina, AFM13, Margetuximabe, IMP321, APX005M, AMG820, sEphB4-HAS, MK-4280, Demcizumabe, GSK3359609, Proteína de fusão EphB4-HSA recombinante, Resimmune, radioterapia, AM0010, Interleucina-12, Interferon gama-1b, MK-7684, IMM-101, entinostate, cobimetinibe, vanucizumabe, PEG- Interferon alfa-2b, obinutuzumabe, Ácido acetilsalicílico, MOXR0916, RO6874281, tazemetostate, ibrutinibe, polatuzumabe vedotin, lenalidomida, Bendamustina, CHOP, RG7888, Vanucizumabe, RO7009789, Emactuzumabe, Cergutuzumabe amunaleucina, RO6958688, Daratumumabe, daratumumabe, CDX-1401, pertuzumabe, Trastuzumabe emtansina, doxorubicina, ciclofosfamida, docetaxel, RG6058, ALX148, Daratumumabe, Efizonerimode, Mogamulizumabe, Oleclumabe, Monalizumabe, MEDI0562, IMC-CS4, MEDI5083, Utomilumabe, PF-

04518600, PD 0360324, azacitidina, bendamustina, M9241, vemurafenibe, PDR001, LY3321367, Durvalumabe, Plozalizumabe, vedolizumabe, TAK-580, Rovalpituzumabe tesirina, Brentuximabe vedotin, Blinatumomabe, MBG453, GWN323, Decitabina, Canacinumabe, CJM112, trametinibe, EGF816, NIS793, REGN1979, REGN3767, Acalabrutinibe, Lenvatinibe, Vorinostate, Dinaciclibe, dabrafenibe, Axitinibe, Ibrutinibe, Abemaciclibe, Eribulina, BL-8040, Dexametasona, CMP-001, Afatinibe, Amcasertibe, ARRY-382, Azacitidina, romidepsina, B-701, BGB324, Binimetinibe, Birinapante, Carfilzomibe, GM-CSF, Defactinibe, Encorafenibe, Enobosarme, Exemestano, leuprolida, G100, GR-MD-02, Imatinibe, IMO-2125, INCB054828, Itacitinibe, INCB050465, Ietozol, palbociclibe, MK-1454, Napabucasina, Nintedanibe, Niraparibe, Olaparibe, enzalutamida, prednisona, Pazopanibe, PEGPH20, PLX3397, Preladenante, Ruxolitinibe, Sargramostim, SCH 900353, SD-101, Vismodegibe, X4P-001, XL888, Ziv-aflibercepte, Ibrutinibe, Dasatinibe, Plinabulina, Veliparibe, PT2385, EGF816, INC280, Ceritinibe, Galunisertibe, Temsirolimus, irinotecano, capecitabina, Amcasertibe, IPI-549, Chidamida, CB-839, TAK-659, Sitravatinibe, Glesatinibe, sitravatinibe, mocetinostate, Avadomida, RRx-001, Omaveloxolona, Valproato, CB-1158, Azacitidina, midostaurina, citarabina, Ibrutinibe, Mocetinostate, Mesilato de osimertinibe, Gefitinibe, AZD6738, cediranibe, MEDI9197, AZD5069, nab-paclitaxel, AZD4547, AZD1775, vistusertibe, Galunisertibe, LY2510924, AZD4635, Pexidartinibe, Selumetinibe, Trabectedina, Ensartinibe, Alectinibe, Rociletinibe, CPI-444, Etoposídeo, carboplatina, trilaciclibe, Rucaparibe, Veliparibe, lorlatinibe, Sunitinibe, Beigene-290, BGB-3111, Savolitinibe, Apatinibe, merestinibe, Citarinostato, Emurafenibe, Cabozantinibe, pazopanibe, WNT974, FGF401, PBF 509, LXH254, Regorafenibe, Sorafenibe, LCL101, everolimus, panobinostate, Capmatinibe, BLZ945, vacina Ad-CEA, Axalimogene filolisbac, Vigil, TPIV 200, PVX-410, Hiltonol, Vacina de Célula de Fusão DC/AML,

LTX-315, LV305, Terapia BCG intravesical BCG, ADXS-PSA, p53MVA, Vacina de DNA de plasmídeo pTVG-HP, 6MHP, GVAX pancreatic, GVAX, DNX-2401, Vacina DPX-Survivac, Terapia com células dendríticas, criocirurgia, Pevnar 13, mDC3/8, NY-ESO-1, gp100:280-288, CRS-207, ISA101, Viagenpumatucel-L, Vacina de Célula Dendrítica, Vacin WT1, TG4010, CV-301, vacina de peptídeo PD-L1/IDO, DCVax-L, NEO-PV-01, Vacina CimaVax-EGF, Vírus do sarampo atenuado, Prostatovac, CMB305, Sipuleucel-T, ONCOS-102, Coxsackievírus A21, Coxsackievírus A22, Pelareorepe, Ad-MAGEA3/MG1-MAGEA3, Talimogene laherparepvec, adenovírus expressando HSV-tk, Pexa-Vec, Enadenotucirev, células T CD8+ autólogas específicas de MCPyV TAG CD8+ T, IMCgp100, terapia com TIL, Células T iC9-GD2 T, Células T E7 TCR, pIL-12, ISF35, NY-ESO-1 TCR PBMC, Células T específicas de HPV, imunoterapias NK, Axicabtagene ciloleucel, AZD9150, Poly ICLC e Imprime PGG.

Doença ou condição

[0376] O agente de anticorpo anti-PD-L1 descrito no presente documento pode ser usado para tratamento de qualquer doença ou condição. Em algumas modalidades, a doença ou condição compreende uma infecção. Em algumas modalidades, a doença ou condição é uma infecção (tal como uma infecção bacteriana ou infecção por vírus). Em algumas modalidades, a doença ou condição é um distúrbio autoimune. Em algumas modalidades, a doença ou condição é um câncer.

[0377] Em algumas modalidades, o agente de anticorpo anti-PD-L1 é usado em um método de tratamento de um câncer. Cânceres que podem ser tratados com qualquer um dos métodos descritos no presente documento incluem tumores que não são vascularizados, ou ainda não substancialmente vascularizados, bem como tumores vascularizados. Tipos de cânceres a serem tratados com o agente de anticorpo anti-PD-L1 como descrito no presente pedido incluem, mas não estão limitados

a, carcinoma, blastoma, sarcoma, tumores benignos e malignos e males, por exemplo, sarcomas, carcinomas e melanomas. Tumores/cânceres adultos e tumores/cânceres pediátricos são também incluídos.

[0378] Em várias modalidades, o câncer é câncer em estágio inicial, câncer não metastático, câncer primário, câncer avançado, câncer localmente avançado, câncer metastático, câncer em remissão, câncer recorrente, câncer em um ambiente adjuvante, câncer de um ambiente neoadjuvante ou câncer substancialmente refratário a uma terapia.

[0379] Exemplos de cânceres que podem ser tratados pelos métodos do presente pedido incluem, mas não estão limitados a, câncer anal, astrocitoma (por exemplo, cerebelar e cerebral), carcinoma de célula basal, câncer de bexiga, câncer de osso, (osteossarcoma e histiocitoma fibroso maligno), tumor cerebral (por exemplo, glioma, glioma do tronco cerebral, astrocitoma cerebelar ou cerebral (por exemplo, astrocitoma, glioma maligno, meduloblastoma e glioblastoma), câncer de mama, linfoma do sistema nervoso central, câncer cervical, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer endometrial (por exemplo, câncer uterino), câncer esofageal, câncer do olho (por exemplo, melanoma intraocular e retinoblastoma), câncer gástrico (estômago), tumor estromal gastrointestinal (GIST), câncer de cabeça e pescoço, câncer hepatocelular (fígado) (por exemplo, carcinoma hepático e heptoma), leucemia, câncer de fígado, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), neoplasma linfoide (por exemplo, linfoma), meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, síndromes mielodisplásticas, câncer nasofaríngeo, neuroblastoma, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer paratireoide, câncer do peritônio, tumor da pituitária, linfoma, câncer retal, câncer renal, câncer de bexiga renal e ureter (câncer de célula transicional), rhabdomyosarcoma, câncer de pele (por exemplo, não melanoma (por exemplo, carcinoma de célula

escamosa), melanoma e carcinoma de célula de Merkel), câncer do intestino delgado, câncer de célula escamosa, câncer testicular, câncer da tireoide, esclerose tuberosa e distúrbio linfoproliferativo pós-transplante (PTLD).

[0380] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, carcinoma urotelial, linfoma de Hodgkin, carcinoma de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores de cabeça e pescoço, câncer de estômago, Linfoma de célula B, carcinoma de célula de Merkel, câncer de fígado e câncer cervical.

VII. Composições, Estojos e Artigos de Fabricação

[0381] São também providas no presente documento composições (tais como formulações) compreendendo qualquer um dos agentes de imagem ou dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento, ácido nucleico codificando as porções de anticorpo (por exemplo, porções de anticorpo anti-PD-L1), vetor compreendendo o ácido nucleico codificando as porções de anticorpo ou células hospedeiras compreendendo o ácido nucleico ou vetor.

[0382] Formulações adequadas dos agentes de imagem ou dos agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados descritos no presente documento podem ser obtidas misturando os agentes de imagem ou os agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados tendo o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos para recipientes nas dosagens e concentrações usadas e incluem também tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de

benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butil ou benzil álcool; alquil parabenos tal como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol), polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como olivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes de quelação tal como EDTA; açúcares tal como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons de formação de sal tal como sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tal como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG). Formulações liofilizadas adaptadas para administração subcutânea são descritas no WO97/04801. Tais formulações liofilizadas podem ser reconstituídas com um diluente adequado para uma concentração de proteína alta e a formulação reconstituída pode ser administrada subcutaneamente ao indivíduo a ter imagem capturada, diagnosticado ou tratado no presente documento.

[0383] As formulações a serem usadas para administração *in vivo* deve ser estéreis. Isso é rapidamente obtido através de, por exemplo, filtração através de membranas de filtração estéril.

[0384] São também providos no presente documento estojos compreendendo qualquer um dos agentes de imagem, os agentes de anticorpo anti-PD-L1 isolados e/ou opcionalmente o composto de quelação e/ou um radionuclídeo descrito no presente documento. Os estojos podem ser úteis para qualquer um dos métodos de imagem, diagnóstico e tratamento descritos no presente documento.

[0385] Em algumas modalidades, é provido um estojo compreendendo uma porção de anticorpo ligando especificamente um ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo

PD-L1) e um composto de quelação (por exemplo, NOTA, DOTA ou seus derivados). Em algumas modalidades, o estojo compreende ainda um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga). Em algumas modalidades, o composto de quelação quela o radionuclídeo.

[0386] Em algumas modalidades, é provido um estojo compreendendo um agente de imagem compreendendo uma porção de anticorpo marcada com um radionuclídeo (por exemplo, ^{68}Ga), em que a porção de anticorpo liga especificamente um ligante de ponto de checagem imune (por exemplo, PD-L1 ou um ligante do tipo PD-L1). Em algumas modalidades, a porção de anticorpo é conjugada a uma porção de quelação (por exemplo, NOTA, DOTA ou seus derivados) que quela o radionuclídeo. Em algumas modalidades, o estojo compreende ainda uma porção de anticorpo não marcada com um radionuclídeo.

[0387] Em algumas modalidades, o estojo compreende ainda um dispositivo capaz de administrar o agente de imagem ou o agente de anticorpo anti-PD-L1 isolado. Um tipo de dispositivo, para aplicações tal como uma administração parental, é uma seringa que é usada para injetar a composição no corpo de um indivíduo. Dispositivos de inalação também podem ser usados para certas aplicações.

[0388] Em algumas modalidades, o estojo compreende ainda um agente terapêutico para tratamento de uma doença ou condição, por exemplo, câncer, doença infecciosa, doença autoimune ou doença metabólica. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é um inibidor do ligante de ponto de checagem imune ou seu receptor. Em algumas modalidades, o agente terapêutico é uma molécula radiomarcada que liga especificamente o ligante de ponto de checagem imune ou seu receptor.

[0389] Os estojos do presente pedido estão em embalagem adequada. Embalagem adequada inclui, mas não está limitada a, frascos,

garrafas, jarras, embalagem flexível (por exemplo, Mylar selada ou bolsas plásticas) e similar. Os estojos podem prover opcionalmente componentes opcionais tais como tampões e informação interpretativa.

[0390] O presente pedido então provê artigos de fabricação. O artigo de fabricação pode compreender um recipiente e um rótulo ou bula no ou associado com o recipiente. Recipientes adequados incluem frascos (tais como frascos selados), garrafas, jarras, embalagem flexível e similar. Em geral, o recipiente contém uma composição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O rótulo ou bula indica que a composição é usada para imagem, diagnóstico ou tratamento de uma condição particular em um indivíduo. O rótulo ou bula compreenderá ainda instruções para administração da composição ao indivíduo e para imagem do indivíduo. O rótulo pode indicar orientações para reconstituição e/ou uso. O recipiente contendo a composição pode ser um frasco de múltiplos usos, que permite administrações repetidas (por exemplo, de 2-6 administrações) da formulação reconstituída. Bula se refere a instruções incluídas comumente em embalagens comerciais de produtos de diagnóstico que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contraindicações e/ou avisos com relação ao uso de tais produtos de diagnóstico. Ainda, o artigo de fabricação pode compreender ainda um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacêuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode incluir ainda outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e de usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

[0391] Os estojos ou artigo de fabricação podem incluir doses unitárias múltiplas das composições e instruções para uso, embaladas em

quantidades suficientes para armazenamento e uso em farmácias, por exemplo, farmácias de hospitais e farmácias de manipulação.

[0392] Aqueles versados na técnica reconhecerão que várias modalidades são possíveis dentro do escopo e espírito da presente invenção. A invenção será agora descrita em mais detalhes a título de referência aos exemplos não limitantes que seguem. Os exemplos que seguem ilustram mais a invenção, mas, decerto, não devem ser absolutamente considerados limitantes de seu escopo.

MODALIDADES EXEMPLARES

[0393] Modalidade 1. Uso de uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1 na preparação de um medicamento para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, em que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1 (HC-CDR1) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42, e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e b) uma V_L compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve 1 (LC-CDR1) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs.

[0394] Modalidade 2. O uso da modalidade 1, em que: a) uma V_H

compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46.

[0395] Modalidade 3. O uso da modalidade 1 ou modalidade 2, em que: a) uma V_H compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11 e 13; e/ou b) uma V_L compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOS: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0396] Modalidade 4. O uso da modalidade 3, em que uma porção de anticorpo compreende: (a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (b) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (c) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (d) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (e) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; (f) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19; (g) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID

NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15; (h) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; ou (i) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

[0397] Modalidade 5. O uso da modalidade 1, em que uma porção de anticorpo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21 ou 23.

[0398] Modalidade 6. Uso de uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1 na preparação de um medicamento para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, em que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo: a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

[0399] Modalidade 7. O uso de qualquer uma das modalidades 1-6, em que uma porção de anticorpo é quimérica ou humanizada.

[0400] Modalidade 8. O uso de qualquer uma das modalidades 1-4, 6 e 7, em que uma porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂, uma V_HH , uma fusão Fv-Fc, uma fusão scFv-Fc, uma fusão

scFv-Fv, um diacorpo, um tricorpo e um tetracorpo.

[0401] Modalidade 9. O uso de qualquer uma das modalidades 1-4 e 6-8, em que uma porção de anticorpo é um anticorpo de cadeia única.

[0402] Modalidade 10. O uso da modalidade 9, em que uma porção de anticorpo é um scFv.

[0403] Modalidade 11. O uso de qualquer uma das modalidades 1-4 e 6-8, em que a porção de anticorpo compreende um fragmento Fc.

[0404] Modalidade 12. O uso da modalidade 11, em que uma porção de anticorpo é um anticorpo de comprimento integral.

[0405] Modalidade 13. O uso da modalidade 12, em que uma porção de anticorpo tem um isotipo selecionado do grupo consistindo em um IgG, um IgM, um IgA, um IgD e um IgE.

[0406] Modalidade 14. O uso de qualquer uma das modalidades 11-13, em que o fragmento F é um fragmento Fc de IgG.

[0407] Modalidade 15. O uso da modalidade 14, em que o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 ou IgG4.

[0408] Modalidade 16. O uso de qualquer uma das modalidades 11-15, em que o fragmento Fc compreende as mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

[0409] Modalidade 17. O uso de qualquer uma das modalidades 1-16, em que o indivíduo é um humano.

[0410] Modalidade 18. O uso de qualquer uma das modalidades 1-17, em que a doença ou condição é um câncer.

[0411] Modalidade 19. O uso da modalidade 18, em que o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, carcinoma urotelial, linfoma de Hodgkin, carcinoma de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores de cabeça e pescoço, câncer de estômago, Linfoma de célula B, carcinoma de célula de Merkel, câncer de fígado e

câncer cervical.

[0412] Modalidade 20. O uso de qualquer uma das modalidades 1-19, em que o agente de anticorpo é adequado para administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea ou oral.

[0413] Modalidade 21. O uso de qualquer uma das modalidades 1-20, em que o medicamento é usado em combinação com uma quantidade eficaz de um segundo agente.

[0414] Modalidade 22. O uso da modalidade 21, em que o segundo agente é um agente quimioterapêutico.

[0415] Modalidade 23. Um método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada (HC-CDR) 1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42, e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43, ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e b) uma V_L compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve (LC-CDR) 1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46, ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs.

[0416] Modalidade 24. O método da modalidade 23, em que a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 é cerca de 0,005 $\mu\text{g/kg}$

a cerca de 5g/kg do peso total do corpo do indivíduo.

[0417] Modalidade 25. Uma composição farmacêutica compreendendo um agente de anticorpo anti-PD-L1 e um veículo farmacêutico aceitável, em que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que: a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs.

[0418] Modalidade 26. Composição farmacêutica da modalidade 25, em que a composição farmacêutica é liofilizada.

[0419] Modalidade 27. Composição farmacêutica da modalidade 25, em que a composição farmacêutica é uma solução.

[0420] Modalidade 28. A composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 25-27, compreendendo cerca de 0,001 μ g a cerca de 10 g da porção de anticorpo.

[0421] Modalidade 29. Um estojo para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo compreendendo a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades 25-28 e uma instrução.

EXEMPLOS

[0422] Os exemplos abaixo pretendem ser puramente exemplares da invenção e não devem então ser considerados limitar a invenção de

modo algum. Os exemplos e descrição detalhada que seguem são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

Exemplo 1: preparação e caracterização de anticorpos monoclonais contra PD-L1 humano

Imunização

[0423] Camundongos deficientes em PD-L1 fêmeas de 8-10 semanas de vida (H. Dong e outros, *Immunity*. 2004 Mar; 20(3):327-36) foram imunizados subcutaneamente (s.c.) em sítios múltiplos com 200 µl de emulsão compreendendo 100 µg de proteína de fusão hPD-L1mlg e adjuvante completo de Freund (CFA) (Sigma-Aldrich). Cada animal recebeu dois ou três reforços com emulsão compreendendo a mesma concentração de proteína de fusão hPD-L1mlg formulada em adjuvante de Freund incompleto (IFA) (Sigma-Aldrich). Amostras de sangue foram coletadas dos animais duas semanas após cada imunização para teste de título de soro. Quando obtendo um título suficiente, os animais receberam uma injeção de reforço com 60 µg da proteína de fusão PD-L1mlg em PBS através de injeção intraperitoneal (i.p.). Os animais foram sacrificados e seus baços foram coletados assepticamente 5 dias após a injeção de reforço.

[0424] Baço inteiro foi dissociado em suspensões de célula única. Glóbulos vermelhos foram lisados usando o tampão de ACK. As células do baço foram então misturadas com células de mieloma SP2/0-Ag14 (da ATCC) em uma razão 1:1 em tubos centrífugos cônicos de 50 ml. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e fusão celular foi induzida com polietileno glicol 50% (Roche). As células fundidas foram cultivadas por 8-10 dias no meio de seleção HAT. Os teores no sobrenadante foram analisados quanto à sua habilidade em se ligar a células expressando hPD-1 usando ELISA e os clones positivos foram confirmados mais usando análise de citometria de fluxo. Subclonagem do híbrido positivo foi realizada usando a técnica de diluição limitante por

5 vezes para obter uma cultura monoclonal pura.

Caracterização do anticorpo monoclonal anti-hPD-L1

Especificidade de ligação do anticorpo monoclonal anti-hPD-L1

[0425] A especificidade de ligação do mAb anti-hPD-L1 foi determinada usando células CHO transfectadas com hPD-L1 (células CHO/hPD-L1) através de citometria de fluxo (FACSVerse, BD Biosciences). Especificamente, células CHO/hPD-L1 foram incubadas com quantidades crescentes do mAb anti-hPD-L1 5B7 (0,06 ng, 0,125 ng, 0,25 ng, 0,5 ng, 1 ng, 2 ng, 4 ng e 100 ng) em gelo por 30 minutos. As células foram então lavadas e incubadas mais com anti-mIgG-APC (eBioscience) antes da análise de citometria de fluxo. Como mostrado nas FIGs. 1A e 1B, o mAb anti-hPD-L1 5B7 se ligou a hPD-L1 com alta especificidade de uma maneira dependente da dose.

[0426] O isotipo do anticorpo monoclonal foi determinado ser IgG1 κ usando o Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit (BD Biosciences).

Reatividade cruzada de espécie

[0427] Células CHO transfectadas com PD-L1 de camundongo (CHO-mPD-L1) foram usadas para avaliar a reatividade cruzada de espécie do mAb anti-hPD-L1 com PD-L1 de camundongos. As células foram incubadas com o mAb anti-hPD-L1 antes da análise de citometria de fluxo. A FIG. 2A mostra a especificidade de ligação do mAb anti-hPD-L1 a PD-L1 humano. Como mostrado na FIG. 2B, o mAb anti-hPD-L1 também se liga a PD-L1 de camundongo.

Bloqueio de ligação de ligante

[0428] Para avaliar o efeito de bloqueio do mAb anti-hPD-L1 sobre ligação entre PD-L1 e PD-1, o experimento de bloqueio que segue foi conduzido: 100 ng de proteína de fusão hPD-L1hIg foram preincubados com doses indicadas do mAb (400, 300, 200, 100, 50 ng/10 μ l) ou Ig controle por 30 minutos a 4° C antes de ser usados para ligar células CHO-hPD-1. As células foram então lavadas e tingidas mais com anti-

hIgC-APC de cabra. O efeito de bloqueio do mAb foi avaliado com citometria de fluxo. Usando um método similar, a habilidade do mAb PD-L1 em bloquear a ligação entre PD-L1 e B7-1 (CD80) também foi avaliada. [0429] A FIG. 3A mostra que mAb anti-hPD-L1 pode bloquear a ligação de hPD-L1 a hPD-1 de uma maneira dependente da dose. A FIG. 3B mostra que mAb pode também bloquear a ligação de hPD-L1 a hB7-1 de uma maneira similar. Como pode ser visto, o mAb pode bloquear a ligação de PD-L1 a suas contrapartes de ligação.

Sequenciamento de células de hibridoma de produção de anticorpo anti-hPD-L1

[0430] Para sequenciar células de hibridoma de produção de anticorpo, 1×10^7 células de hibridoma foram coletadas e lavadas com PBS. RNAs mensageiros foram extraídos de hibridomas usando RNeasy Mini Kit (Qiagen). cDNAs RACE-Ready de primeiro filamento foram sintetizados usando SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Seguindo transcrição reversa, reações de PCR RACE 5' foram realizadas com cDNA ready como modelo e com primer universal 5' (UPM) provido pelo estojo e *primers* específicos de gene 3' (GSP1) projetados usando as sequências de região variável de cadeia pesada e região variável de cadeia leve de IgG de camundongo. Produtos de RACE foram determinados através de análise em eletroforese em gel. Produtos de PCR foram então clonados a um vetor T usando Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). Após transformação, os plasmídeos foram verificados através de análise de sequência. Sequências da região variável de cadeia pesada e região variável de cadeia leve foram analisadas usando VBASE2 (worldwide web.vbase2.org) e listadas na Tabela 3.

Exemplo 2: humanização e caracterização de anticorpos anti-hPD-L1

Humanização de anticorpos anti-PD-L1

[0431] Humanização foi realizada com base nas sequências de região variável de cadeia pesada (VH) e região variável de cadeia leve (VL) de células de hibridoma de anti-PD-L1. Como uma etapa inicial, um mAb quimérico camundongo-humano compreendendo as sequências de VH e VL de camundongo parentais, a região constante de IgG humana e a cadeia κ humana foi gerado. Quando da caracterização do anticorpo quimérico, três sequências humanizadas de VH e três de VL foram projetadas e usadas para gerar nove anticorpos humanizados. As sequências de VH e VL dos anticorpos anti-hPD-L1 quiméricos e humanizados são listadas na Tabela 2.

Caracterização de anticorpos anti-hPD-L1 humanizados

Atividades de bloqueio de anticorpos anti-hPD-L1 humanizados

[0432] Para examinar as atividades de bloqueio dos anticorpos humanizados (combinações de três VHS e três VLs, nove no total) comparado com o anticorpo quimérico parental, bloqueios de experimentos de ligação de ligante similares àqueles do Exemplo 1 foram conduzidos, mas proteína de fusão hPD-L1mIg foi usada ao invés de anticorpos humanizados e quiméricos. A FIG. 4 mostra que a ligação de PD-L1 a células CHO/hPD-1 foi inibida de uma maneira dependente da dose por todos os anticorpos humanizados. Como pode ser visto, todas as combinações têm atividade de bloqueio próximo daquela de anticorpo quimérico parental. Em dosagens menores, alguns anticorpos humanizados têm atividade de bloqueio ainda maior do que o anticorpo quimérico parental.

Exemplo 3: preparação e caracterização de anticorpos scFv-hFc anti-hPD-L1

Projeto e síntese de sequência de anticorpos scFv-hFc

[0433] A região variável de cadeia pesada (VH) e a região variável de cadeia leve (VL) da variante 2 de anticorpo anti-hPD-L1 humanizado

foram usadas para gerar o anticorpo scFv-hFc. Especificamente, a cadeia pesada e a cadeia leve foram conectadas por um ligante, que foi seguido por uma sequência de dobra (GACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCCC, SEQ ID NO: 50) e uma porção Fc de IgG1 da imunoglobulina humana (região CH2-CH3). Ainda, mutações H310A (isto é, CAC ou GCC) e H435Q (isto é, CAC ou CAG) foram introduzidas nas regiões CH2 e CH3 para eliminação rápida do anticorpo *in vivo* (FIG. 5). As sequências dos anticorpos scFv-hFc com as regiões CH2-CH3 do tipo selvagem (scFv-hFc Wt) e com as regiões CH2-C3 mutantes (scFv-hFc Mt) são mostradas na Tabela 6.

[0434] As sequências de DNA de scFv-hFc Wt e scFv-hFc Mt foram clonadas em vetores de pcDNA3.3 respectivamente e usadas para transfectar transientemente células ExPi 293. As proteínas do sobrenadante de cultura celular foram purificadas com coluna Protein G Sepharose (GE healthcare) para análise funcional

Caracterização de anticorpos scFv-hFc

[0435] Os anticorpos scFv-hFc Wt e scFv-hFc Mt anti-hPD-L1 foram identificados através de SDS Page Gel Electroporation. Como mostrado na FIG. 6, os anticorpos scFv-hFc foram identificados em ambas condições reduzida e não reduzida no gel SDS-PAGE. As afinidades de ligação dos anticorpos scFv-hFc com hPD-L1, comparado com aquelas do anticorpo parental, foram examinadas através de FACS e os resultados são mostrados na FIG. 7. Como mostrado nos histogramas, ambos scFv-hFc Wt e scFv-hFc Mt demonstraram afinidades de ligação similares ao anticorpo parental. As afinidades de ligação e cinética dos anticorpos scFv-hFc (scFv-hFc Wt e scFv-hFc Mt) com hPD-L1, comparado com aquelas do anticorpo parental (IgG1 anti-Pd-L1), foram analisadas mais usando o sistema Fortebio Octet. A Tabela 7 mostra as afinidades de ligação e parâmetros cinéticos de IgG1 anti-PD-L1, IgG1-C52W anti-PD-L1 (isto é, um anticorpo anti-PD-L1 tendo uma região Fc IgG1 com

uma mutação C52W), scFv-hFc Mt e scFv-hFc Wt.

Tabela 7: parâmetros cinéticos de ligação de scFv-hFc anti-hPD e anti-corpos controle parentais

Amostra	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	R ²
anti-PD-L1 IgG1	1,54E-11	1,77E+5	2,72E-5	0,9834
anti-PD-L1 IgG1 C52W	3,40E-10	1,33E+5	4,53E-4	0,9732
anti-PD-L1 scFv-hFc Wt	3,48E-10	6,98E+6	2,43E-4	0,97
anti-PD-L1 scFv-hFc Mt	2,32E-10	1,66E+6	3,85E-4	0,9812

[0436] Estudos farmacocinéticos foram realizados através de injeção de anticorpos scFv-hFc Wt e scFv-hFc Mt *in vivo*, seguido por medição dos títulos no soro dos anticorpos scFv-hFc e hIgG nos Dias 1, 2, 3, 4 e 6 após injeção. Como mostrado nas FIGs. 8A e 8B, scFv-hFc Wt mostrou título sérico maior do anticorpo e o hIgG comparado com scFv-hFc Mt.

Exemplo 4: geração e caracterização de scFv anti-PD-L1

Geração e expressão em pequena escala de scFv anti-PD-L1 humanizado

[0437] Diagramas esquemáticos dos projetos de construto para scFvs anti-hPD-L1, o anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e um scFv controle negativo são mostrados na FIG. 9. Especificamente, fragmentos contendo domínios de ligação de antígeno VH e VL do anticorpo anti-PD-L1 humanizado e um ligante peptídeo entre os mesmos foram sintetizados artificialmente, o que incluía ambas as orientações (isto é, VH-ligante-VL e VL-ligante-VH). O peptídeo (Gly4-Ser)₄ (SEQ ID NO: 47) e ligante peptídico GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 48) foram usados na construção de todos os scFvs. Ainda, sc-dsFvs foram também construídos introduzindo mutações únicas em

VH44/VL100 ou VH105/VL43 (de acordo com o sistema de numeração Kabat). Os fragmentos contendo VH e VL também incluíam sítios de reconhecimento HindIII e EcoRI de endonuclease de restrição nas extremidades 5' e 3', respectivamente, bem como uma sequência de marcador His no terminal C. Os fragmentos contendo VH e VL foram fundidos ou com CH1-CH2-CH3 de cadeia pesada de IgG humana ou CL de cadeia leve de IgG1, na extremidade 5' através de PCR de sobreposição. A cadeia pesada e a cadeia leve fundida foram então clonadas nos sítios de reconhecimento HindIII e EcoRI correspondentes do vetor de expressão de pcDNA3.1(+). Um total de oito scFvs foi projetado e sintetizado. Os scFv compreendem as sequências mostradas na Tabela 5. Ainda, cada scFv compreende um marcador His fundido ao terminal C por meio de um ligante peptídico curto (isto é, SEQ ID NO: 51). Construtos para o anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e um scFv controle negativo (irr-scFv controle) foram também sintetizados.

[0438] Os construtos foram transientemente transfectados em células expiCHO. Uma alimentação única foi adicionada 18 horas mais tarde e o sobrenadante foi coletado após cultura por 5 dias consecutivos. As proteínas do sobrenadante foram purificadas pela coluna Protein L Sepharose (GE healthcare) e coluna de aumento Superdex-75 (GE healthcare) para análise funcional. O anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e o scFv controle negativo foram similarmente transfectados e purificados. Os títulos dos scFv foram medidos através de Fortebio Octet. As concentrações dos scFv purificados finais foram determinadas através de Nanodrop. O sc-dsFv com o rendimento mais alto de 50 mg/L foi escolhido para marcação de isotipo e é referido como scFv (PD-L1). A FIG. 10 mostra os resultados de SDS-PAGE de scFv (PD-L1), o anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental e o scFv controle negativo, sob ambas as condições reduzida e não reduzida.

Caracterização de scFv (PD-L1)

Atividade de ligação de PD-L1 de scFv (PD-L1) conforme medido através de FACS

[0439] Células estáveis CHO/PD-L1 foram coletadas e lavadas duas vezes com tampão FACS (1XPBS com FBS 1%). As células foram então tingidas com o anticorpo controle positivo IgG1 humanizado parental (IgG1anti-PD-L1) ou scFv (PD-L1) em várias diluições por 30 minutos em gel. As células foram então lavadas duas vezes com tampão FACS e tingidas mais ou com 60 ng de anticorpo Fc anti-humano conjugado a PE (anti-HuFc-PE, BD) ou com 60 ng de anticorpo antimarcaador His conjugado a PE (anti-Histag-PE, eBioscience), por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com tampão FACS e suspensas em 300 mL de tampão FACS. Como mostrado pelos histogramas na FIG. 11, a atividade de ligação de ambos anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental (IgG1 anti-PD-L1) e scFv (PD-L1) demonstram um padrão dependente da concentração.

Afinidade de ligação com PD-L1 de scFv (PD-L1) conforme medido através de ForteBio Octet RED96

[0440] Todas as amostras foram preparadas em tampão PBS (pH=7,4). A proteína de fusão hPD-L1-Fc de camundongo marcada com biotina foi carregada em sensores SA em um limiar de carregamento predeterminado. scFv (PD-L1) foi aplicado aos sensores em um gradiente de concentração de 3,125 nM-50 nM. Subtração de base foi usada para corrigir movimento do sensor. Os dados foram ajustados a um modelo de ligação 1:1 usando software de análise de dados da ForteBio a fim de obter as taxas de associação (K_{on}) e dissociação (K_{off}). Os valores de K_D foram calculados com base em K_{off}/K_{on} . Como mostrado na Tabela 8, a afinidade de ligação de scFv (PD-L1) foi similar àquela do anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental.

Tabela 8. Análise de afinidade de ligação de scFv (PD-L1) e do anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental

Amostra	K_D (M)	K_{off} (1/s)	K_{on} (1/Ms)	R^2
IgG1 PD-L1 anti-humano	6,92E-09	2,25E-04	3,26E+04	0,9993
scFv (PD-L1)	7,11E-09	7,01E-04	9,85E+04	0,995

Temperatura de exposição hidrofóbica de scFv (PD-L1) conforme medido através de Fluorimetria de Varredura Diferencial (DSF)

[0441] scFv (PD-L1), o anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental e o scFv controle negativo (scFv controle irr) foram expressos e purificados como descrito acima. Duas condições do tampão (1xPBS em pH 7,4 e tampão de Na-Citrato em pH 5,5) foram usadas e foram obtidas por meio de troca de tampão de um estoque de proteína concentrada usando colunas Hitrap G25 (GE Healthcare). Seguindo troca do tampão, a concentração de proteína do eluato foi determinada em um Nanodrop (Thermofisher). Seguindo troca do tampão, a concentração de proteína do eluato foi determinada em um Nanodrop (Thermofisher). As concentrações finais de scFv (PD-L1) e scFv controle irr foram 1 mg/ml e a concentração do anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental foi 0,5 mg/ml. Imediatamente antes do uso, a solução de estoque de SYPRO Orange (5000x) foi diluída com um tampão correspondente para uma concentração de 25x. O corante diluído foi então adicionado às amostras de proteína para obter uma concentração de trabalho final de 5x SYPRO Orange. O CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories) foi usado para medir os sinais de SYPRO Orange. Os ajustes de filtro de excitação/emissão foram determinados de acordo com o canal "FRET" compatível com o sinal de fluorescência de SYPRO Orange. As amostras foram expostas a um gradiente de temperatura de 25° C a 95° C em uma taxa de aquecimento de 1° C/min

com aumentos de 0,5 C. As curvas de $-d(\text{RFU})/dT$ representando a mudança em sinais de SYPRO Orange com relação ao gradiente de temperatura são mostradas na FIG. 12. A primeira depressão da curva $-d(\text{RFU})/dT$ foi definida como a temperatura de exposição hidrofóbica (T_{m1} ou T_h) e foi calculada pelo software CFX MANAGER™ usando o método matemático de segunda derivada. Como mostrado na FIG. 12, scFv (PD-L1) exibiu uma T_{m1} de 61° C, o anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental exibiu uma T_{m1} de 62° C, enquanto o scFv controle negativo exibiu uma T_m de 54° C. scFv (PD-L1) exibiu termoestabilidade similar ao anticorpo parental em ambos tampão de PBS e tampão de Na-Citrato.

Estabilidade de scFv (PD-L1) em temperatura baixa e condições de pH ácido

[0442] Um Teste de estabilidade acelerada de 40°C foi realizado em scFv (PD-L1) e no anticorpo controle positivo para IgG1 humanizado parental. Em suma, o scFv (PD-L1) e anticorpos controle foram postos em uma câmara de teste de estabilidade ou de 4°C ou 40°C (Mettler ICH110L) em uma concentração de 1 mg/mL. A cada duas semanas, as amostras foram removidas das câmaras e sua afinidade de ligação com PD-L1 foi medida usando FACS. Como mostrado nas FIGs. 13A-13D, a afinidade de ligação de scFv (PD-L1) reduziu drasticamente com o tempo sob a condição de temperatura alta (40°C) e pH alto (pH 7,4). scFv (PD-L1) exibiu características relativamente estáveis na condição de temperatura baixa (4°C) e pH ácido (pH 5,5).

Exemplo 5: radiomarcagem de scFv anti-hPD-L1 e caracterização de scFv anti-hPD-L1 radiomarcado

Preparação de porções de anticorpo ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1

[0443] Os experimentos descritos abaixo usaram um scFv anti-hPD-L1 como um exemplo para preparar um agente de imagem para detecção de PD-L1 humano. Agentes de imagem tendo outras porções

de anticorpo anti-hPD-L1 foram preparados usando procedimento experimental similar através da substituição do scFv anti-hPD-L1 abaixo com uma outra porção de anticorpo anti-hPD-L1 (por exemplo, scFv, scFv-Fc ou anticorpo de comprimento integral).

Acoplamento de scFv anti-hPD-L1 e NOTA

[0444] Anticorpos scFv foram formulados em uma concentração de 2,318 mg/mL (tamponados em ácido cítrico/citrato de sódio/cloreto de sódio 20 mM, +0,8% (m/v), pH 5,5). 400 µL de NaHCO₃-Na₂CO₃ 0,05M (pH 8,7) foram adicionados à solução de anticorpo scFv, seguido por centrifugação a 16000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi removido para obter um volume final de 100 µL. As etapas acima foram repetidas mais uma vez e a solução final 100 µL foi transferida para um tubo de centrifuga de 1,5 mL. 2,64 µL de p-SCN-Bn-NOTA foram adicionados ao tubo de centrifuga em uma concentração final de 927 µM, seguido por incubação por uma hora a 37°C.

[0445] A coluna NAP-5 foi pre-equilibrada com PBS antes da solução de scFv/NOTA ter sido adicionada à coluna. A coluna foi então lavada com 0,4 mL de PBS e eluída com 0,5 mL de PBS. O eluato foi separado em alíquotas em porções de 0,05 mL e armazenado a -20°C.

Marcação de NOTA-scFv anti-PD-L1 com ⁶⁸Ga

[0446] ⁶⁸Ga foi lavado com HCl 0,05N para uma concentração final de 21 mCi/mL. 46,5 µL de acetato de sódio 1,25 M foram então adicionados para chegar em um pH final de 4. 50 µL de NOTA-scFv anti-PD-L1 (0,05 mg/ml) foram adicionados a 350 uL de ⁶⁸Ga, seguido por incubação por 10 min a 25°C. A taxa de marcação de ⁶⁸Ga-NOTA-scFv anti-PD-L1 foi determinada usando o papel de cromatografia de camada final. Quando citrato 0,1M foi usado como o agente de expansão, a taxa de marcação foi determinada ser 17%. Quando PBS foi usado como o agente de expansão, a taxa de marcação foi determinada ser 100%.

Purificação de ⁶⁸Ga-NOTA-ScFv anti-PD-L1

[0447] Purificação de ^{68}Ga -NOTA-scFv PD-L1 foi realizada primeiro equilibrando a coluna de NAP-5 com PBS, seguido por adição de 400 μL de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1. A coluna foi então lavada com 400 μL de PBS, seguido por eluição com outros 400 μL de PBS.

Controle de qualidade de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1

[0448] A pureza radioquímica do ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 foi medida usando cromatografia de camada fina instantânea-Sílica Gel (ITLC-SG) com citrato de sódio 0,1 M como o agente de desenvolvimento, com o ponto de origem sendo o produto marcado e a borda frontal do agente de desenvolvimento sendo ^{68}Ga dissociado. Como mostrado nas FIGs. 14 e 15, o rendimento de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 foi 17% e a pureza foi 93,5%.

Ligação específica de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 a PD-L1 humano *in vitro*

[0449] Ensaio de ligação de célula ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1. Células MC38 e MC38-PD-L1 foram cada uma plaqueadas em 12 poços de uma placa de 24 poços em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço. As células foram cultivadas de um dia para o outro a 37°C . No dia seguinte, ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 foi adicionado aos poços em concentrações finais de 0,20, 0,40, 0,80, 1,60, 3,20 e 6,40 nM (cada concentração tinha duas duplicatas) e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após três lavagens com PBS gelado, as células foram lisadas com NaOH 0,1M e radioatividade foi medida usando um instrumento de contagem gama. O valor de K_D de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 foi calculado usando o software GraphPad Prism. Como mostrado na FIG. 16, ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 exibiu afinidade de ligação muito maior com células MC38-PD-L1 (também referidas como “MC38-B7H1”) comparado com células MC38 com o valor de K_D para ligação de MC38-PD-L1 $1,53 \pm 0,44 \text{ nM}$.

[0450] Ensaio de ligação competitiva ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1.

Células MC38 foram plaqueadas em 8 poços e células MC38-PD-L1 foram plaqueadas em 16 poços de uma placa de 24 poços, em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço. No dia seguinte, IgG1 anti-PD-L1 foi adicionado em concentrações finais de 20, 40, 80 e 160 nM. IgG1 anti-PD-L1 e ^{68}Ga -NOTA-anti-scFv PD-L1 foram adicionados em duplicatas em concentrações finais de 0,20, 0,40, 0,80, 1,60, 3,20 e 6,40 nM. As células foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após três lavagens com PBS gelado, as células foram lisadas com NaOH 0,1M e radioatividade foi medida usando um instrumento de contagem gama.

[0451] Como mostrado na FIG. 17, IgG1 anti-PD-L1 bloqueou a ligação de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 a células MC38-PD-L1. Esse resultado demonstrou que ligação de ^{68}Ga -NOTA scFv anti-PD-L1 a PD-L1 humano foi específica.

Imagem ao vivo *in vivo* de ^{68}Ga -NOTA-anti-PD-L1 scFv

Ensaio de imagem ao vivo *in vivo*

[0452] Células MC38 e células MC38-PD-L1 foram cultivadas e contadas após digestão com tripsina. 1×10^6 células MC38-PD-L1 foram injetadas na axila direita de cinco camundongos fêmea de 6-8 semanas de vida e 1×10^6 células MC38 foram injetadas na axila esquerda dos mesmos camundongos. Outros cinco camundongos fêmea de 6-8 semanas de vida foram injetados apenas com 1×10^6 células MC38-PD-L1 na axila direita. Os tumores atingiram um diâmetro de cerca de 0,5 cm após 6 dias, ponto no qual os animais receberam ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 200uCi por meio de injeção na veia da cauda. Imagem ao vivo foi realizada 0,5 hora, 1 hora e 2 horas pós-injeção com um tempo de exposição de 5 minutos.

[0453] As imagens de exposição máximas obtidas em 1 hora e 2 horas pós-injeção são mostradas na FIG. 18. Tumores na axila direita (injetadas com células MC38-PD-L1) mostraram expressão mais forte comparado com tumores na axila esquerda (injetadas com células

MC38). Tumores na axila esquerda eram mais visíveis em 2 horas após injeção, comparado com 1 hora após injeção. Absorção e exposição baixas foram observadas em tecidos do fígado e coração, enquanto absorção alta foi observada em rim.

[0454] A FIG. 19 mostra resultados de imagem *in vivo* de animais No. 1-No. 6 em 0,5 hora, 1 hora e 2 horas após injeção de ^{68}Ga -NOTA-anti-scFv PD-L1. Os animais No. 1-No. 4 receberam células MC38-PD-L1 na axila direita apenas, enquanto os animais No. 5 e No. 6 receberam também células MC38 na axila esquerda em adição a células MC38-PD-L1 na axila direita. Os resultados mostraram que sinal radioativo era detectável mais ou menos 0,5 hora e a absorção pelo rim não diminuiu significativamente com o tempo. O animal No. 1 mostrou imagem clara e pode ser relacionado ao estado de crescimento específico do tumor.

Ensaio de imagem in vivo de competição de ligação

[0455] Células MC38 e células MC38-PD-L1 foram cultivadas e contadas após digestão com tripsina. 1×10^6 células MC38-PD-L1 foram injetadas na axila direita de cinco camundongos fêmea e 6-8 semanas de vida (No. 2, No. 3, No. 4, No. 7 e No. 8). 1×10^6 células MC38 foram também injetadas na axila esquerda dos camundongos No. 7 e No. 8. Os tumores atingiram um diâmetro de cerca de 0,5 cm após 6 dias. Os animais No. 3, No. 4, No. 7 e No. 8 receberam ambos anticorpo não marcado IgG1 anti-PD-L1 e 140uCi de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 por meio de injeções na veia da cauda. O anticorpo não marcado IgG1 anti-PD-L1 foi injeção em uma concentração que era 50 vezes a concentração do ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1. O animal No. 2 recebeu 140uCi de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 apenas como controle. Imagem ao vivo foi realizada 0,5 hora, 1 hora e 2 horas após injeção com um tempo de exposição de 5 minutos. Como mostrado na FIG. 20, o animal No. 2 mostrou ligação de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 a B7H1 (PD-L1), en-

quanto anticorpo a b-220 não marcado quando injetado em uma concentração 50 vezes aquela de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 bloqueou a ligação de ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 a B7H1 (PD-L1).

Comparação entre ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 e ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1

[0456] Células MC38 e células MC38-PD-L1 foram cultivadas e contadas após digitação com tripsina. 1×10^6 células MC38-PD-L1 foram injetadas na axila direita de cinco camundongos fêmea de 6-8 semanas de vida e 1×10^6 células MC38 foram injetadas na axila esquerda dos mesmos camundongos. Os tumores atingiram um diâmetro de cerca de 0,5 cm após 6 dias, ponto no qual os animais receberam ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 200 μCi , scFv anti-PD-L1 não marcado com ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1 200 μCi ou ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1 200 μCi por meio de injeção na veia da cauda. Imagem ao vivo foi feita 0,5 hora, 1 hora e 2 horas após injeção com um tempo de exposição de 5 minutos. Para camundongos injetados com ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1, as imagens foram obtidas com ajuste de sensibilidade de câmera normal e um ajuste de sensibilidade de câmera reduzido (1/4 de condições normais).

[0457] A FIG. 21 mostra uma comparação lado-a-lado de resultados de imagem em 30 minutos após injeção dos agentes de imagem. Da esquerda para a direita da figura mostra resultados de imagem de um camundongo injetado com ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1, um camundongo injetado com scFv anti-PD-L1 não marcado e ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1, um camundongo injetado com ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1 (wt) em ajuste de sensibilidade de câmera normal e o mesmo camundongo injetado com ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1 (wt) em um ajuste de sensibilidade de câmera reduzida.

[0458] A Figura 22 mostra uma comparação lado-a-lado de resultados de imagem em 60 minutos (painel superior) e 120 minutos (painel

inferior) após injeção dos agentes de imagem. Da esquerda para a direita da figura mostra resultados de imagem de um camundongo injetado com ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1, um camundongo injetado com scFv anti-PD-L1 não marcado e ^{68}Ga -NOTA-scFv anti-PD-L1, um camundongo injetado com ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1 (wt) e ajuste de sensibilidade de câmera normal e o mesmo camundongo injetado com ^{68}Ga -NOTA-scFv-Fc anti-PD-L1 (wt) em um ajuste de sensibilidade de câmera reduzida.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1 na preparação de um medicamento para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), em que:

a) uma V_H compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada 1 (HC-CDR1) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e

b) uma V_L compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve 1 (LC-CDR1) compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43; e

b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo

a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46,

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que:

a) uma V_H compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e/ou

b) uma V_L compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo compreende:

(a) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15;

(b) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17;

(c) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19;

(d) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15;

(e) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17;

(f) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19;

(g) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15;

(h) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; ou

(i) uma V_H compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13 e uma V_L compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19.

5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21 ou 23.

6. Uso de uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1 na preparação de um medicamento para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo:

a) uma HC-CDR1, uma HC-CDR2 e uma HC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia pesada (V_H) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 11 e 13; e

b) uma LC-CDR1, uma LC-CDR2 e uma LC-CDR3, compreendendo respectivamente as sequências de aminoácido de uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3 dentro de uma região variável de cadeia leve (V_L) tendo a sequência mostrada em qualquer uma de SEQ ID NOs: 3, 7, 15, 17 e 19.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo é quimérica

ou humanizada.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, 6 e 7, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo é selecionada do grupo consistindo em um Fv de cadeia única (scFv), um Fab, um Fab', um F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento Fv estabilizado com dissulfeto (dsFv), um (dsFv)₂, um V_HH, uma fusão Fv-Fc, uma fusão scFv-Fc, uma fusão scFv-Fv, um diacorpo, um tricorpo e um tetracorpo.

9. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 6 a 8, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo é um anticorpo de cadeia única.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo é um scFv.

11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 6 a 8, caracterizado pelo fato de que a porção de anticorpo compreende um fragmento Fc.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo é um anticorpo de comprimento integral.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que uma porção de anticorpo tem um isotipo selecionado do grupo consistindo em um IgG, um IgM, um IgA, um IgD e um IgE.

14. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que o fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que fragmento Fc é um fragmento Fc de IgG1 ou IgG4.

16. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que o fragmento Fc compreende as

mutações H310A e H435Q, em que as posições de aminoácido são baseadas no sistema de numeração Kabat.

17. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um humano.

18. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é um câncer.

19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo consistindo em melanoma, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, carcinoma urotelial, linfoma de Hodgkin, carcinoma de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, tumores de cabeça e pescoço, câncer de estômago, Linfoma de célula B, carcinoma de célula de Merkel, câncer de fígado e câncer cervical.

20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o agente de anticorpo é adequado para administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea ou oral.

21. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que o medicamento é usado em combinação com uma quantidade eficaz de um segundo agente.

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o segundo agente é um agente quimioterapêutico.

23. Método de tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um agente de anticorpo anti-PD-L1, em que o agente de anticorpo anti-PD-L1 compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), caracterizado pelo fato de que:

a) uma V_H compreende uma região de determinação de comple-

mentaridade de cadeia pesada (HC-CDR) 1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e

b) uma V_L compreende uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve (LC-CDR) 1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz do agente de anticorpo anti-PD-L1 é cerca de 0,005 $\mu\text{g/kg}$ a cerca de 5g/kg do peso total do corpo do indivíduo.

25. Composição farmacêutica compreendendo um agente de anticorpo anti-PD-L1 e um veículo farmacêutico aceitável, em que o agente de anticorpo compreende uma porção de anticorpo compreendendo uma região variável de cadeia pesada (V_H) e uma região variável de cadeia leve (V_L), caracterizada pelo fato de que:

a) uma V_H compreende uma HC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 41, uma HC-CDR2 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 42 e uma HC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 43 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas HC-CDRs; e

b) uma V_L compreende uma LC-CDR1 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 44, uma LC-CDR2 compreendendo

a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45 e uma LC-CDR3 compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 46 ou uma variante da mesma compreendendo até um total de cerca de 5 substituições de aminoácido nas LC-CDRs.

26. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é liofilizada.

27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica é uma solução.

28. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 27, caracterizada pelo fato de que compreende cerca de 0,001 µg a cerca de 10 g da porção de anticorpo.

29. Estojo para tratamento de uma doença ou condição em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende a composição farmacêutica como definida em qualquer uma das reivindicações 25 a 28 e uma instrução.

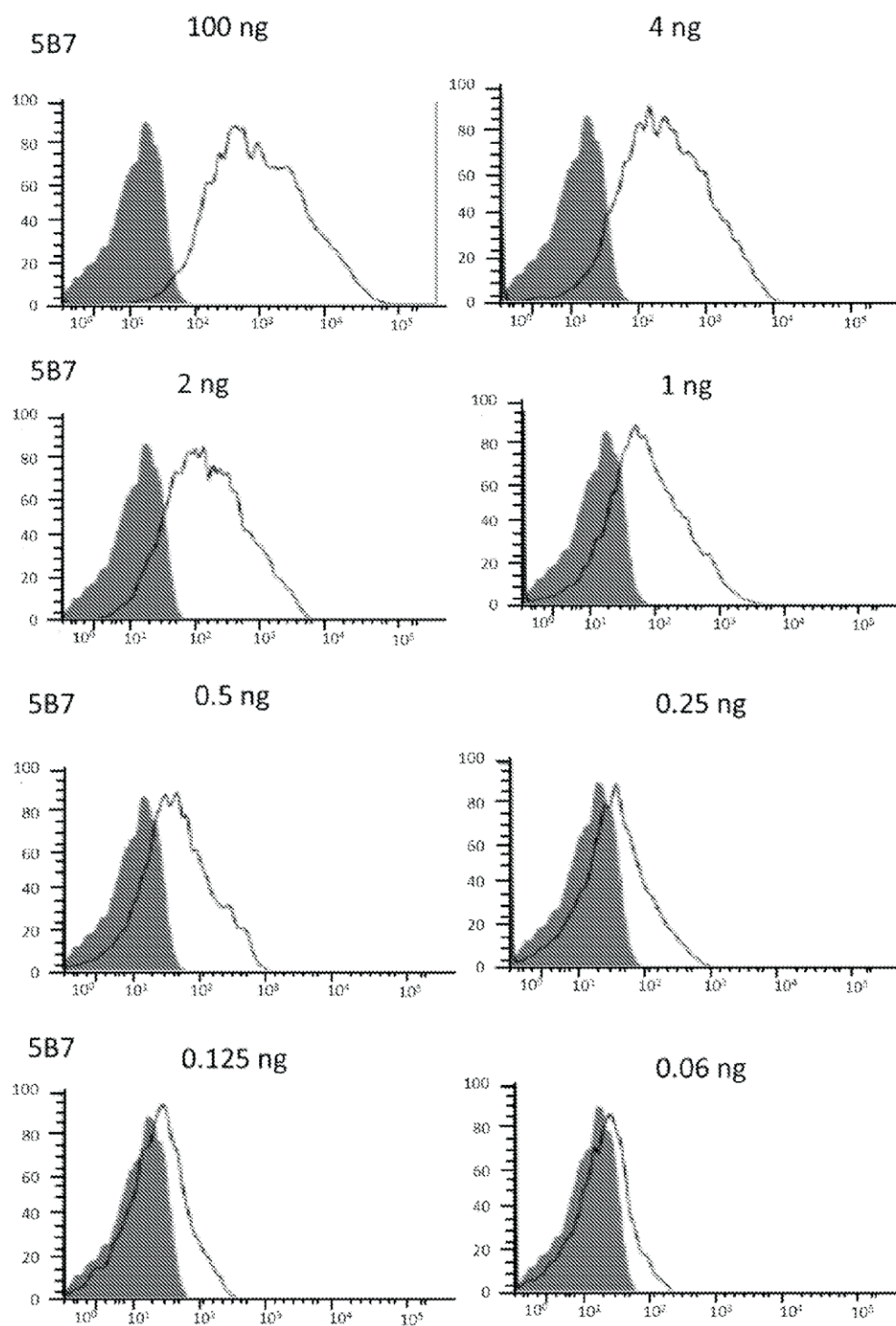


FIG. 1A

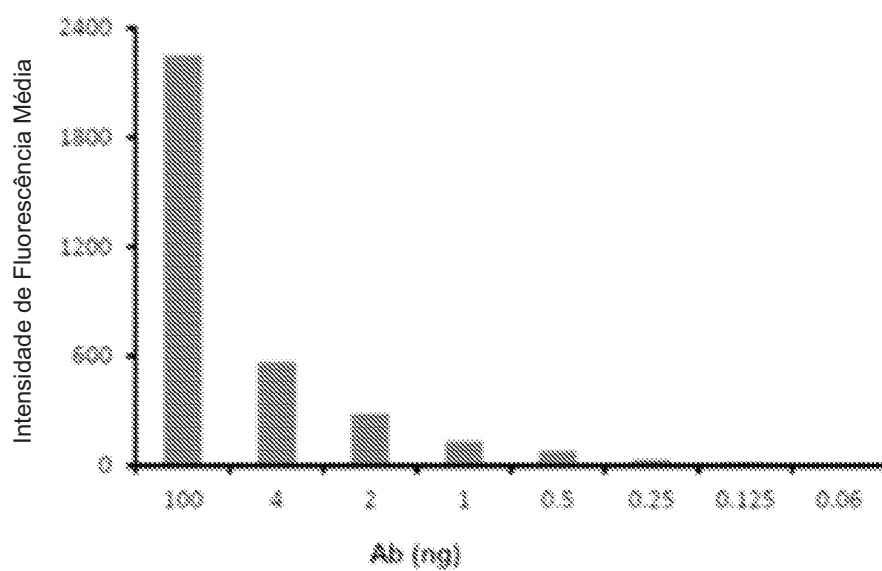


FIG. 1B

CHO/hPD-L1

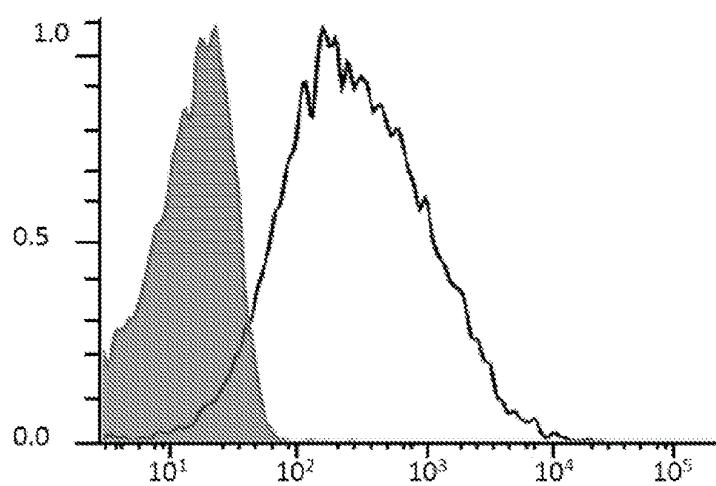


FIG. 2A

CHO/mPD-L1

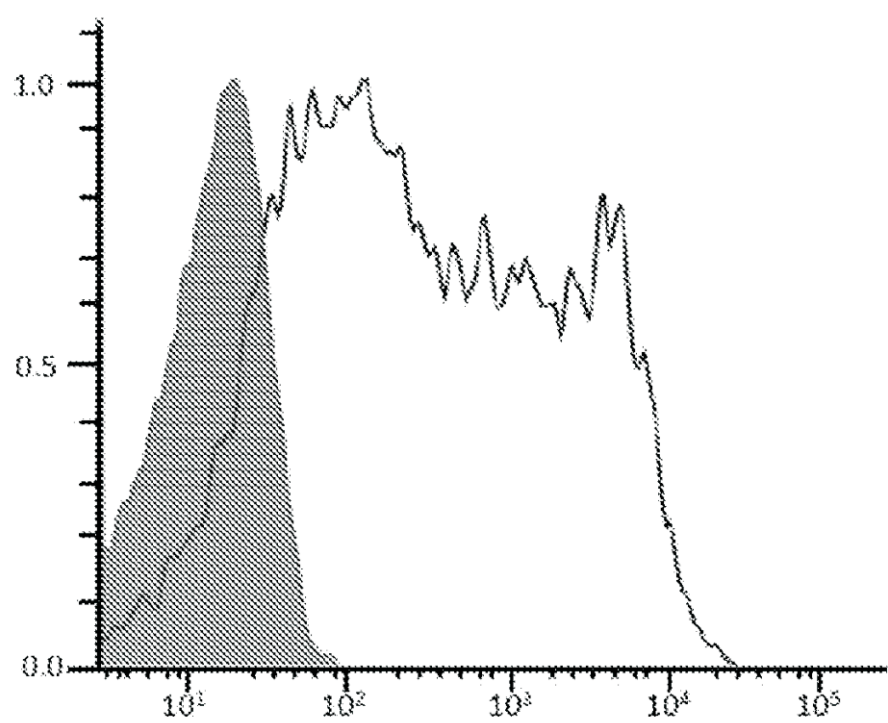


FIG. 2B

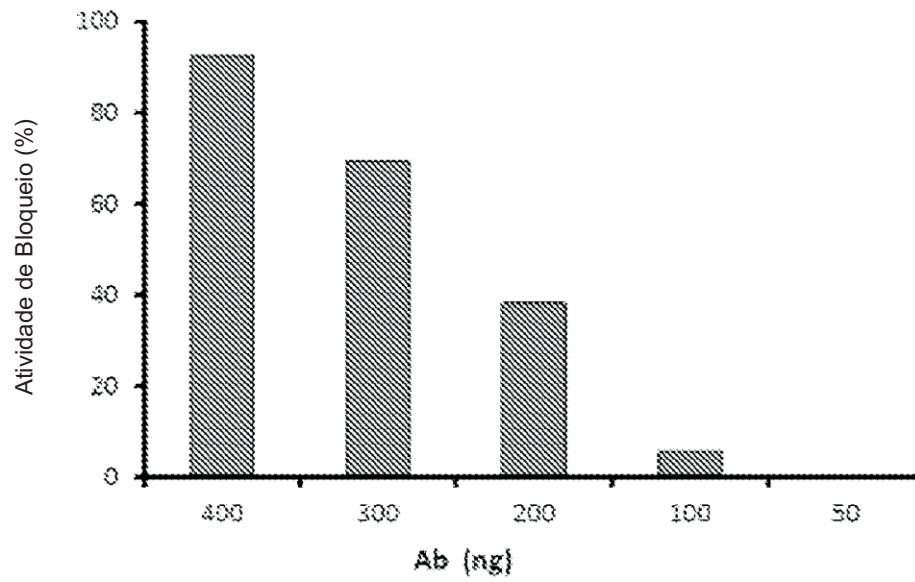


FIG. 3A

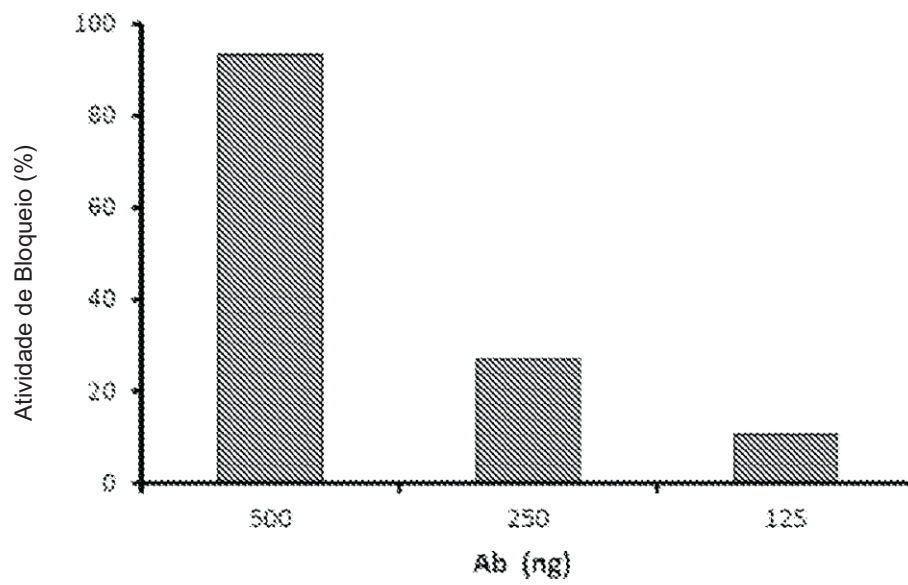


FIG. 3B

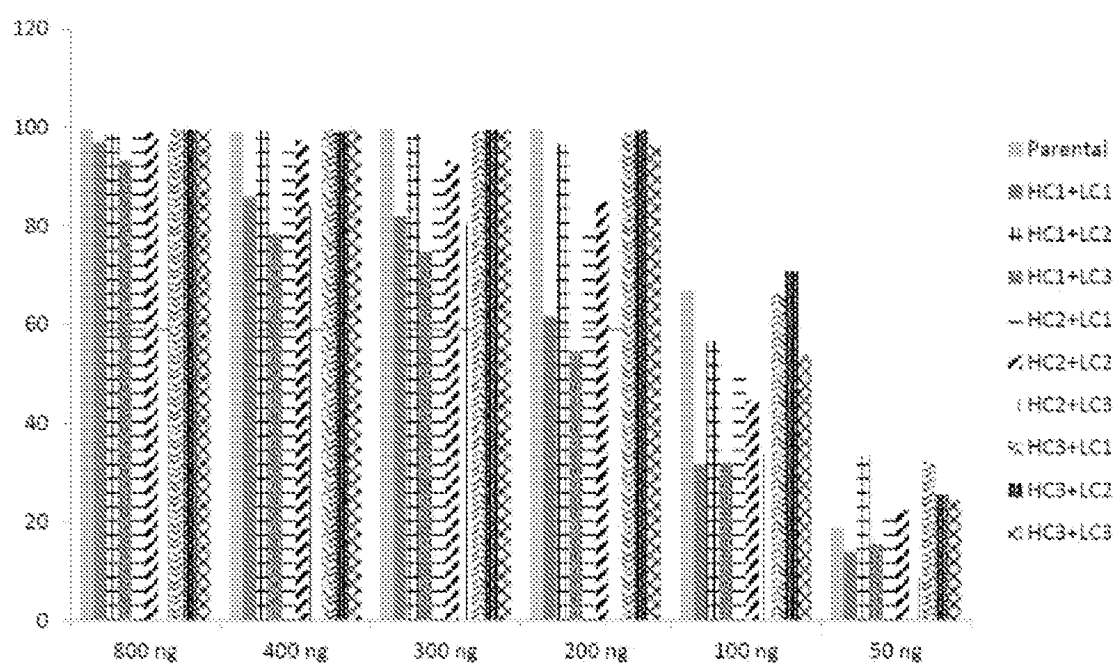


FIG. 4

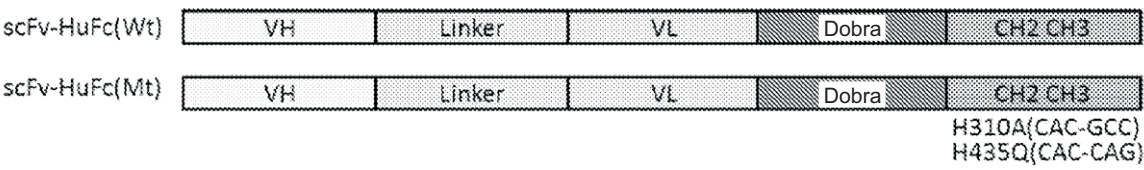


FIG. 5

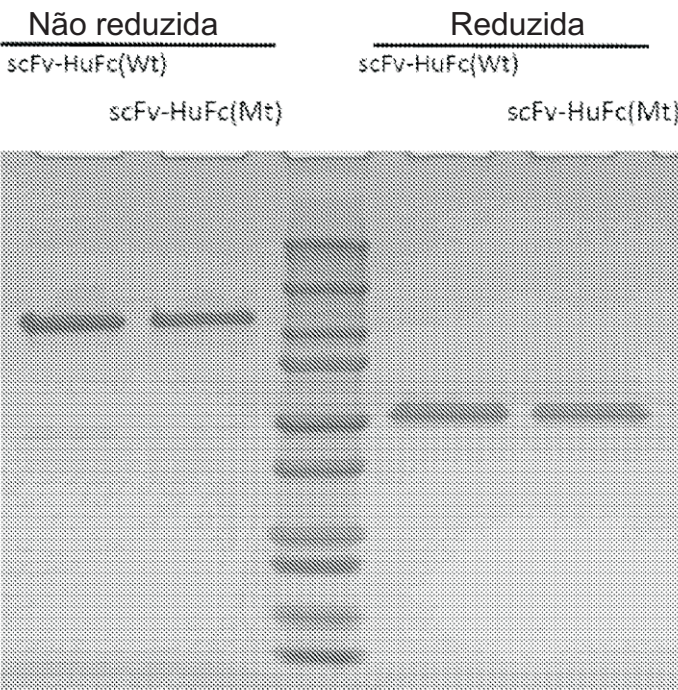


FIG. 6

7/22

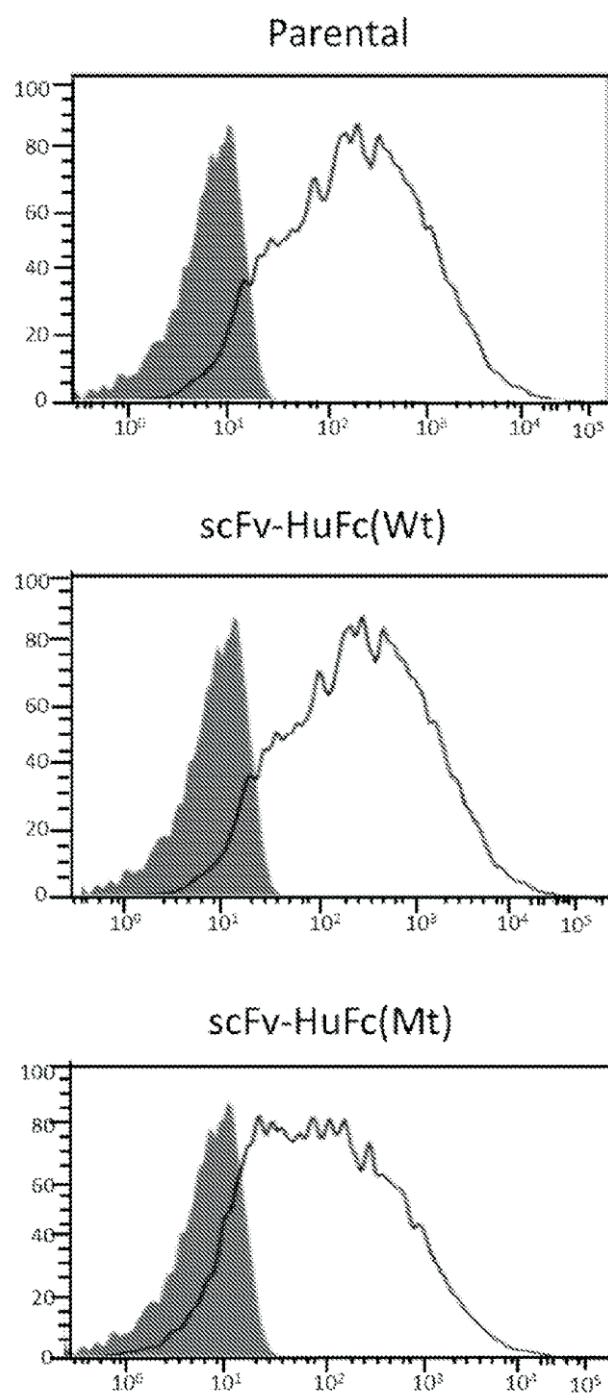


FIG. 7

Título sérico de anticorpos para hPD-L1

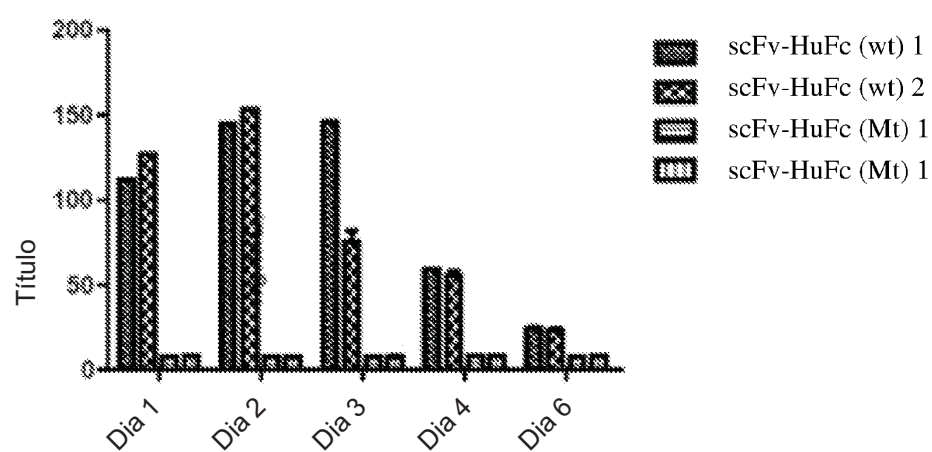


FIG. 8A

Título sérico de hIgG

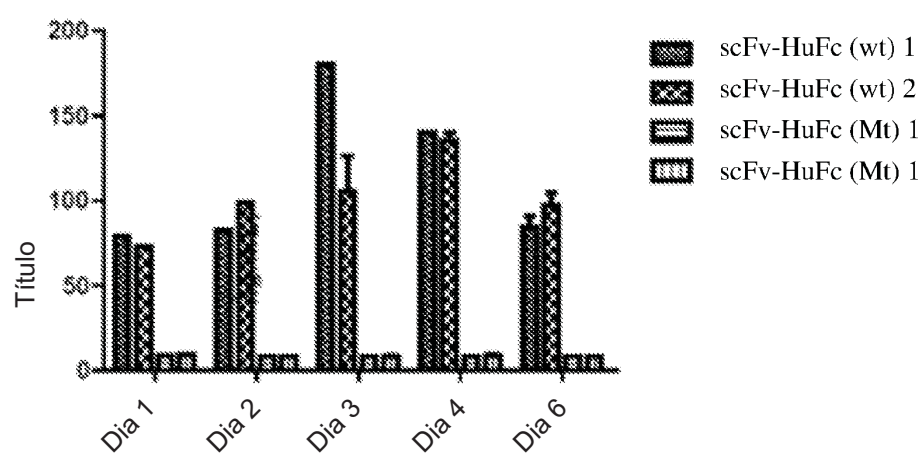


FIG. 8B

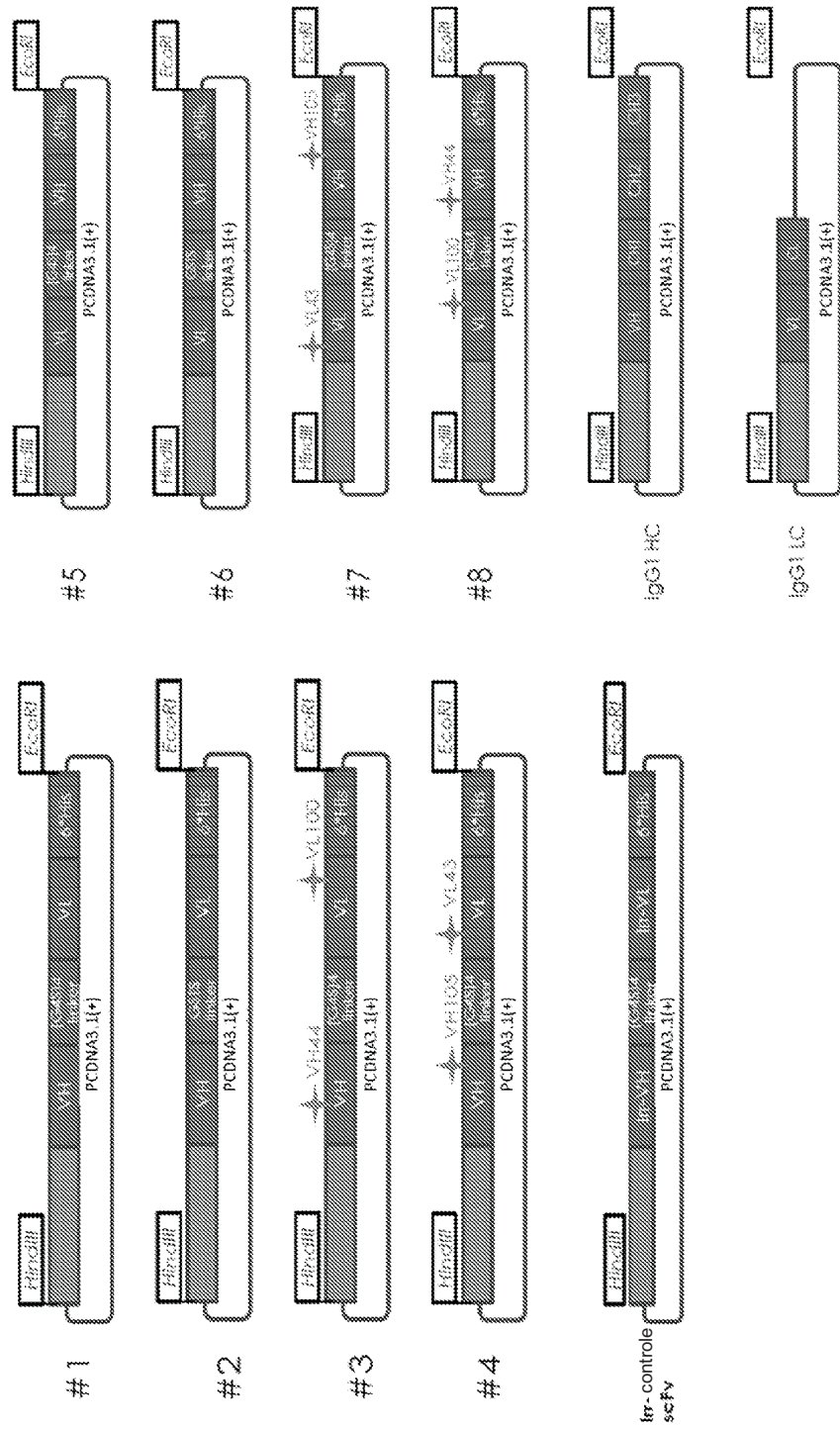
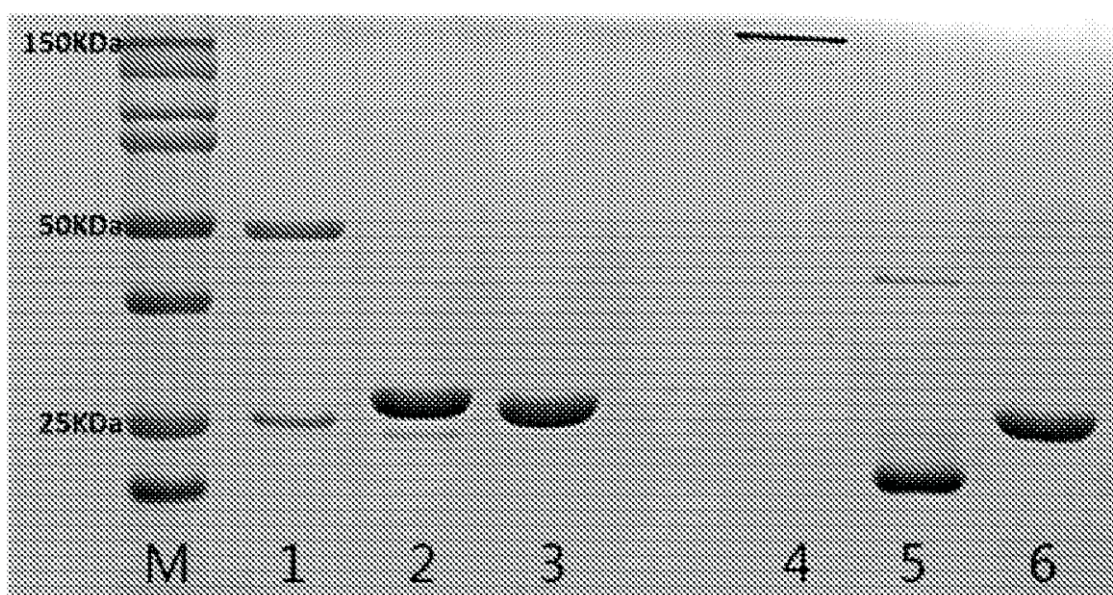


FIG. 9



Faixa 1. Controle IgG1 humanizado parental reduzido
 Faixa 2. scFv(PD-L1) reduzido
 Faixa 3. scFv(controle irrelevante) reduzido
 Faixa 4. Controle IgG1 humanizado parental não reduzido
 Faixa 5. scFv(PD-L1) não reduzido
 Faixa 6. scFv(controle irrelevante) não reduzido

FIG. 10

11/22

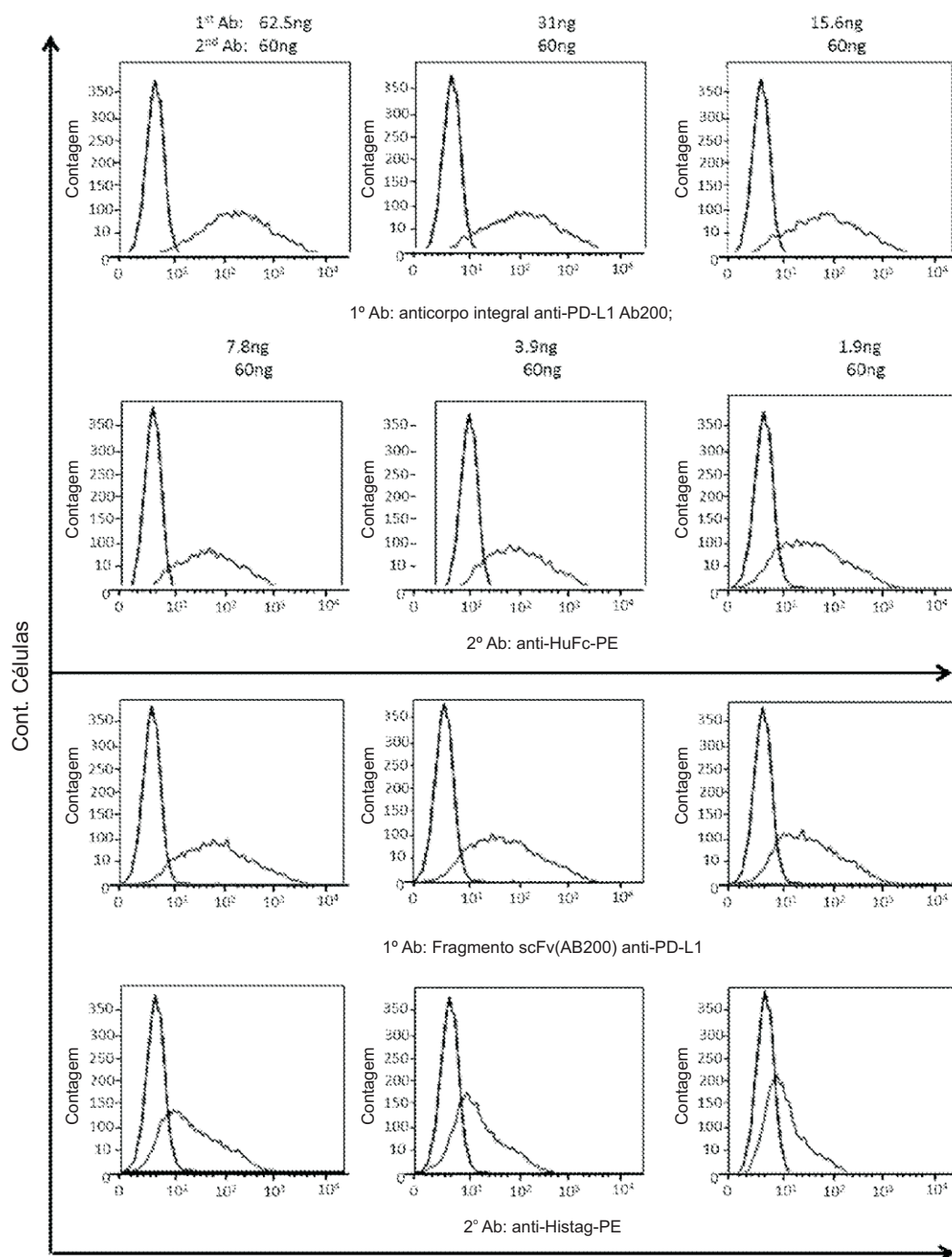


FIG. 11

12/22

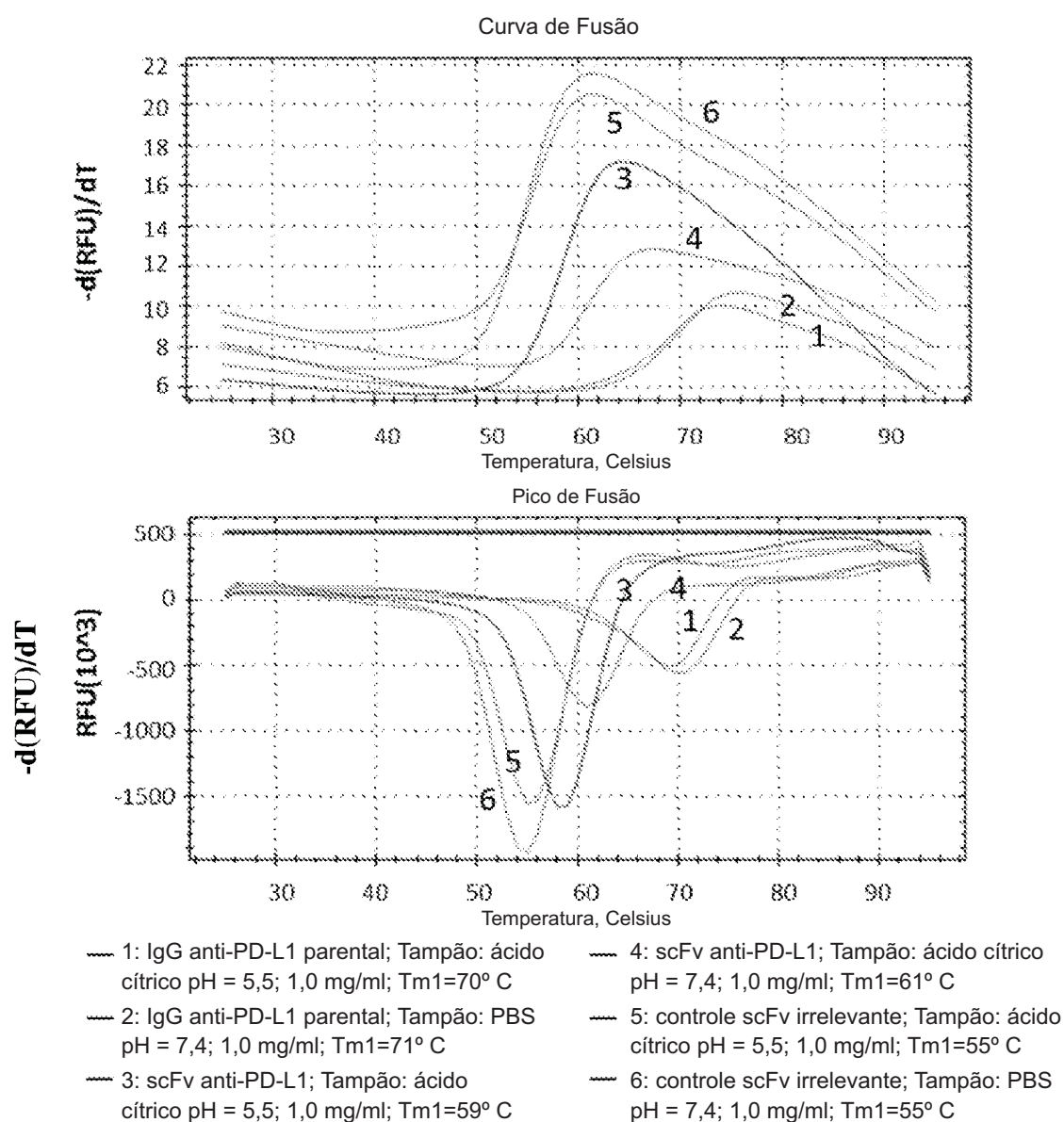


FIG. 12

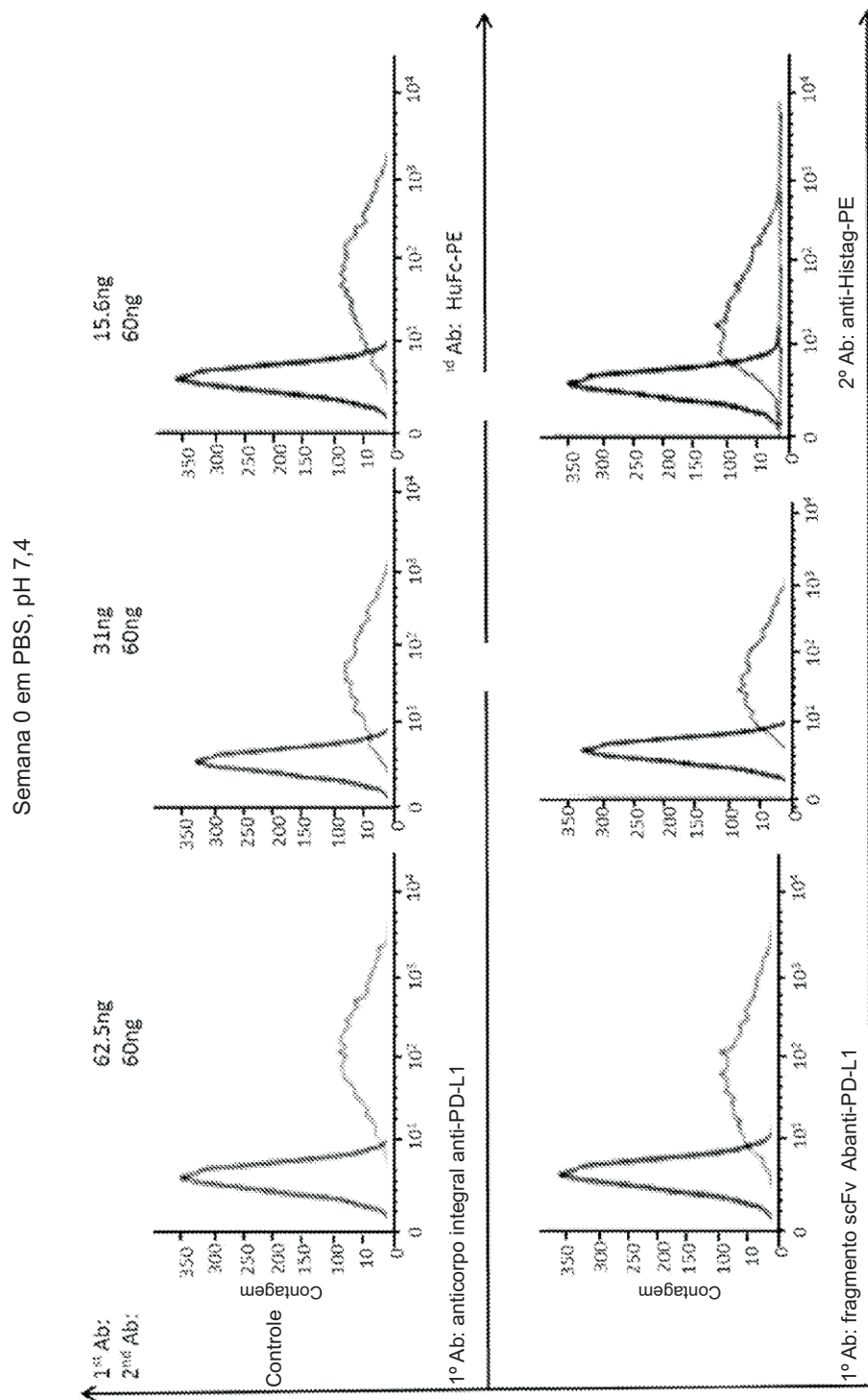


FIG. 13A

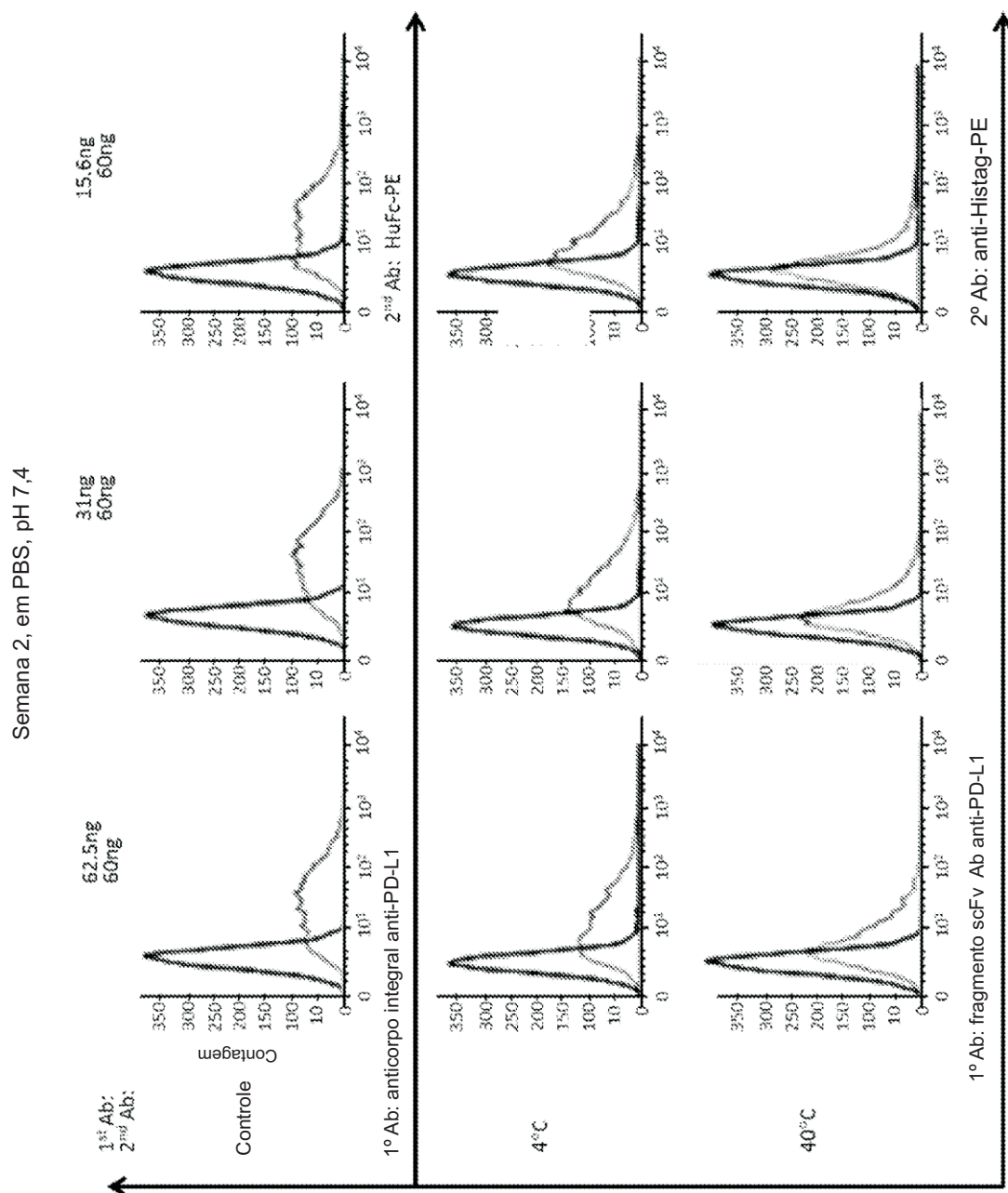


FIG. 13B

Semana 0 em citrato de Na, pH = 5,5

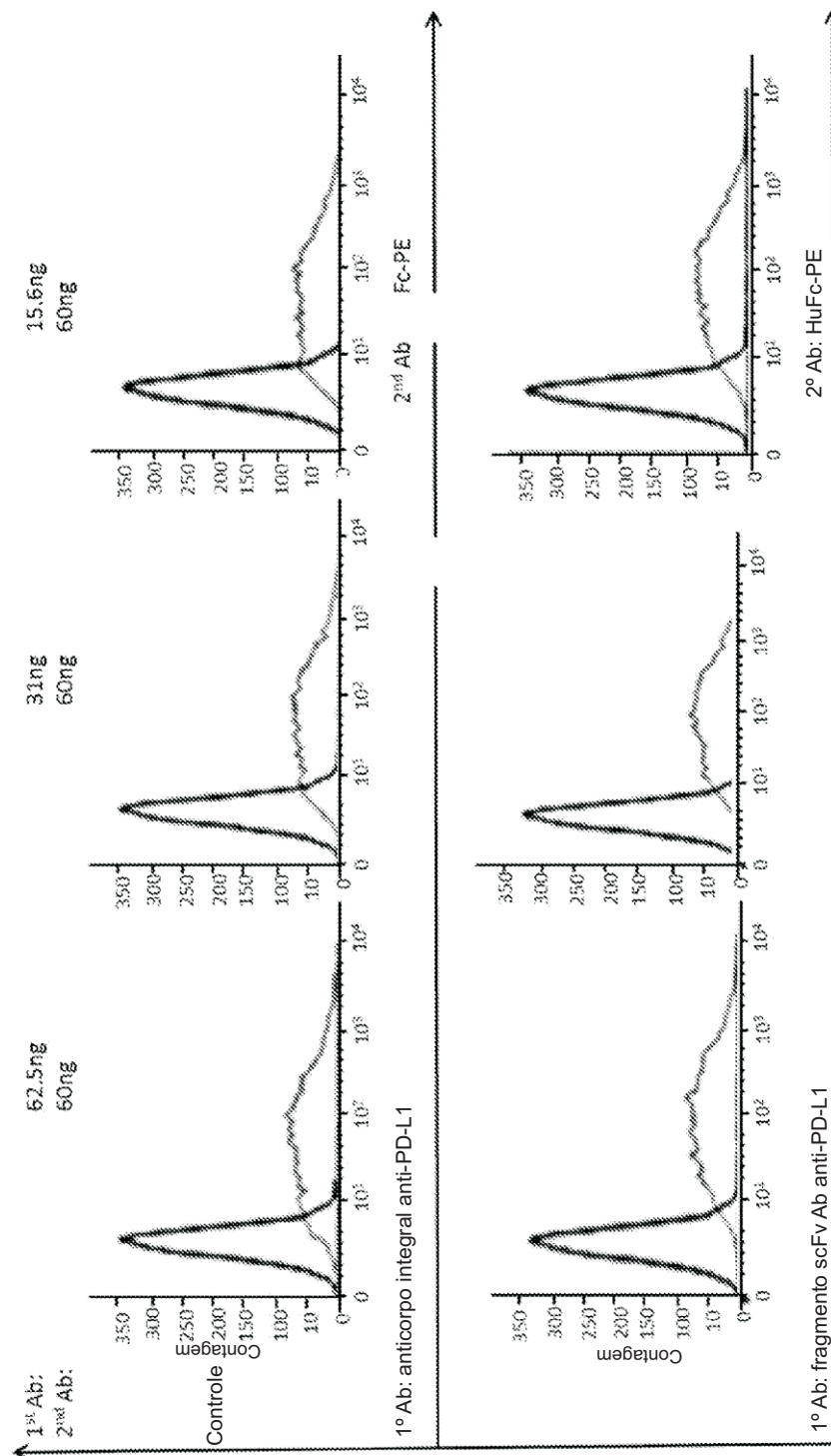


FIG. 13C

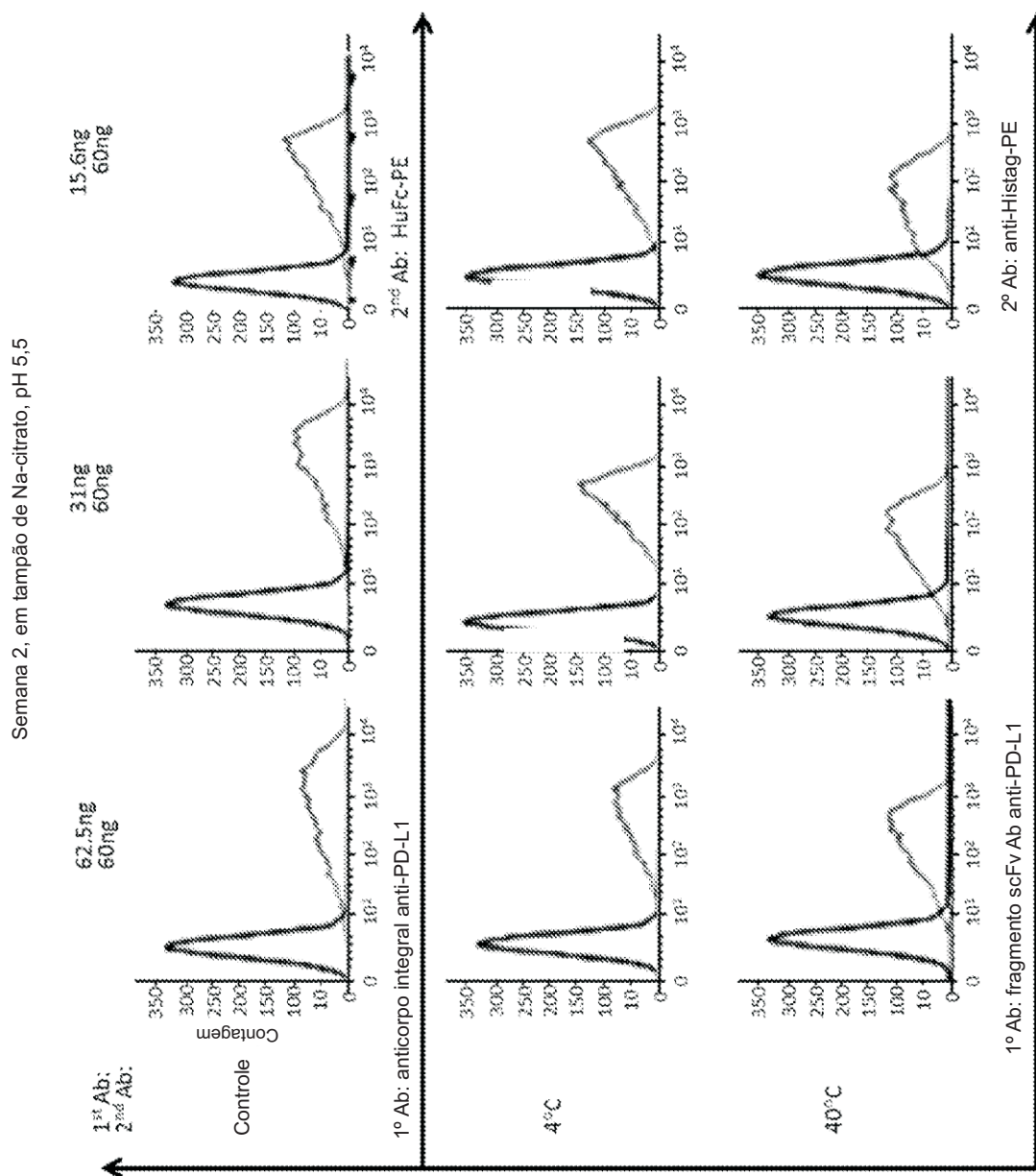


FIG. 13D

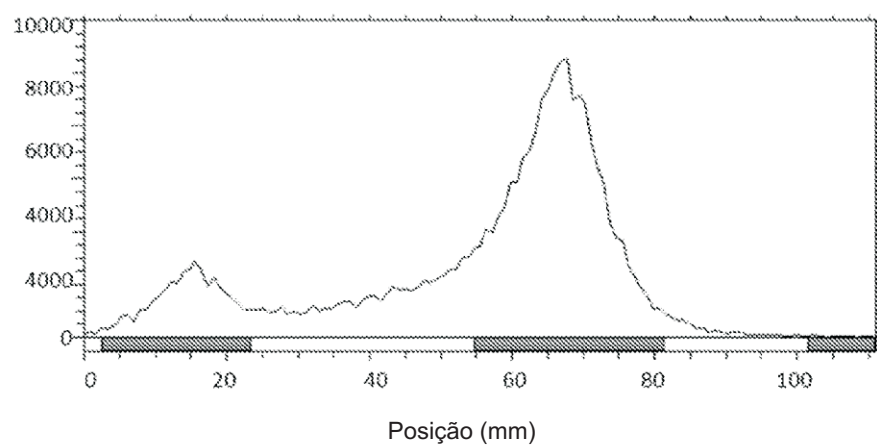


FIG. 14

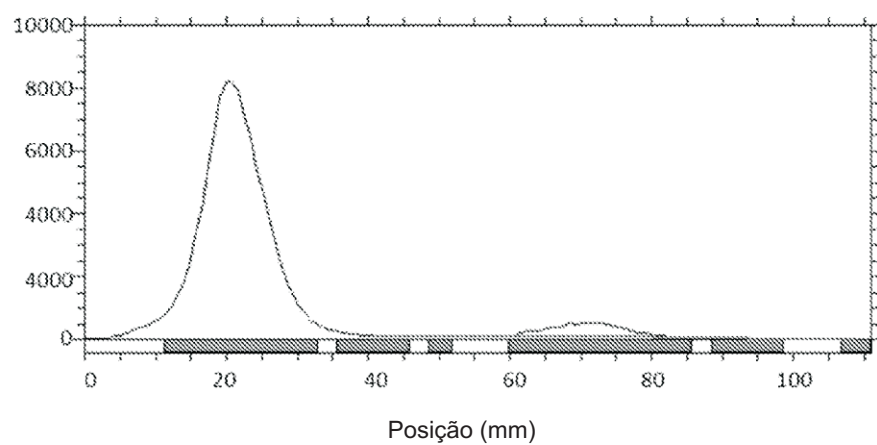


FIG. 15

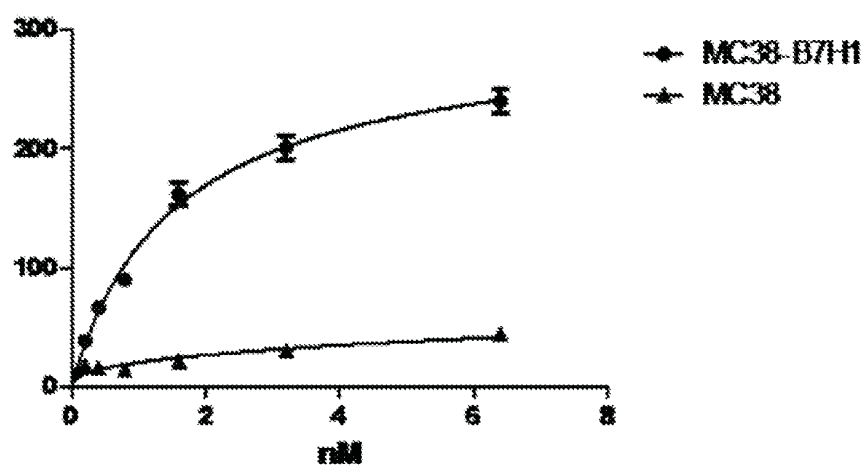


FIG. 16

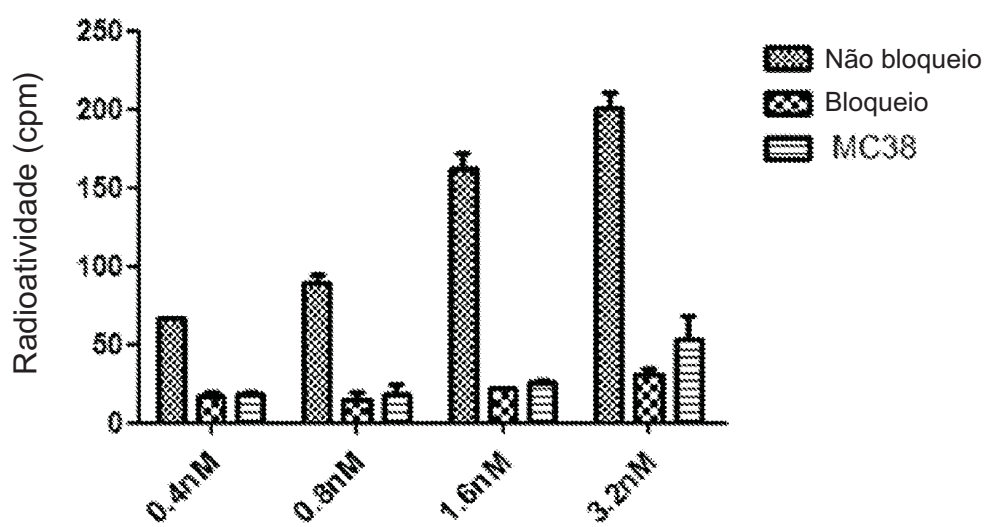


FIG. 17

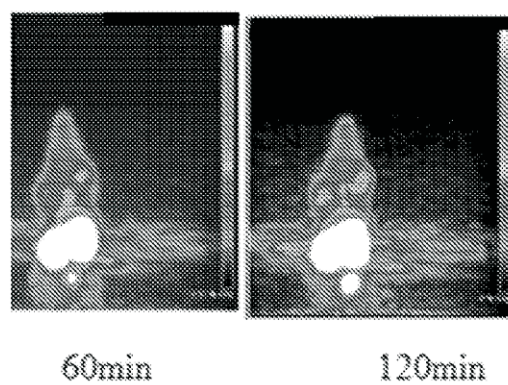


FIG. 18

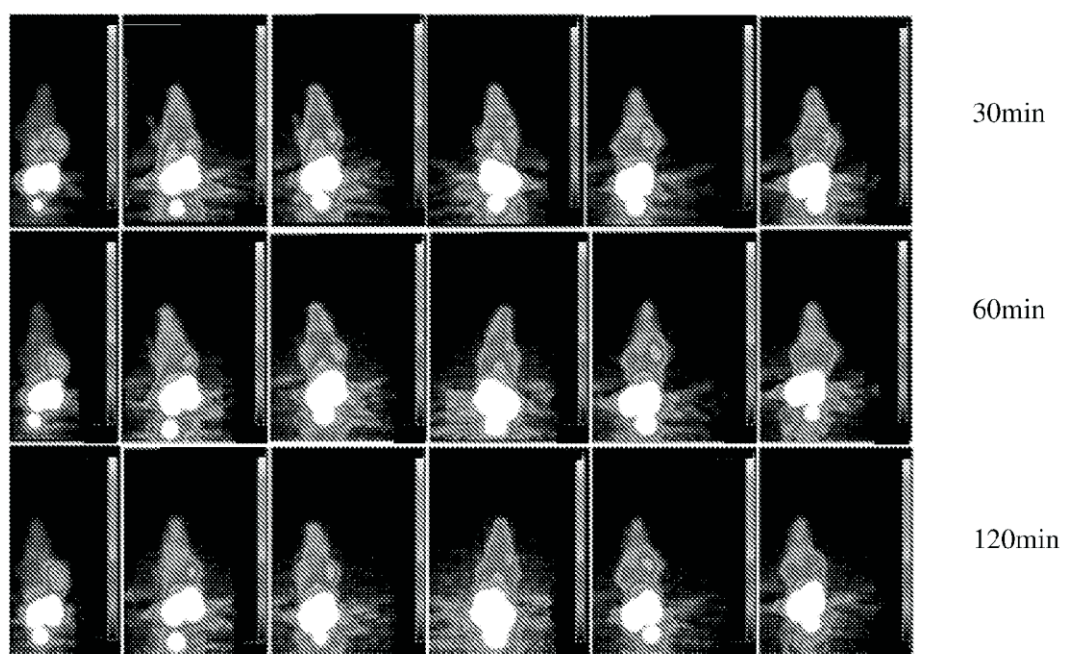


FIG. 19

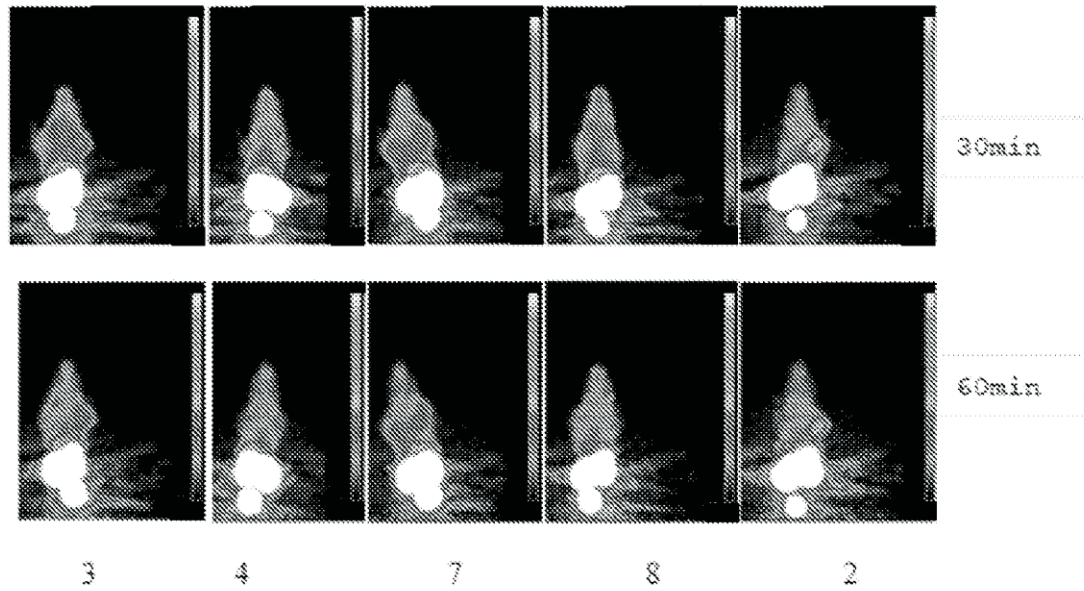


FIG. 20

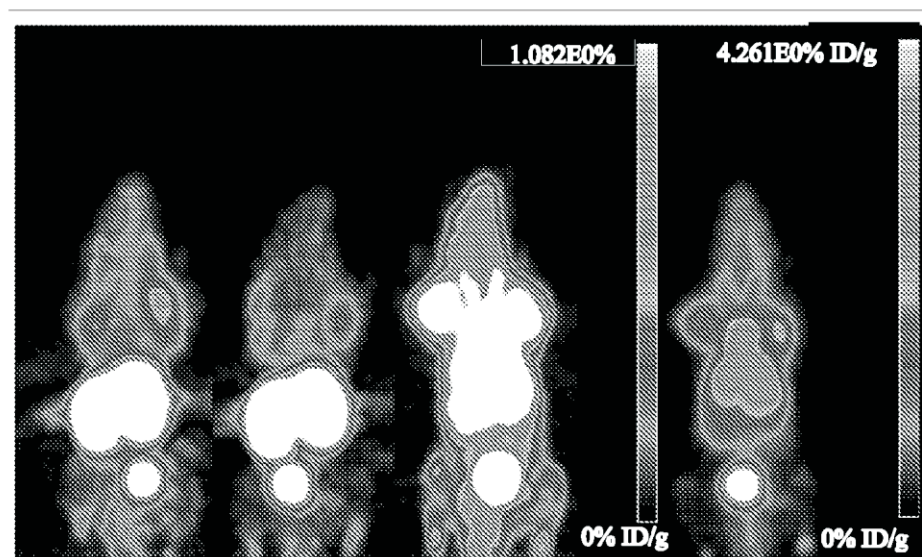


FIG. 21

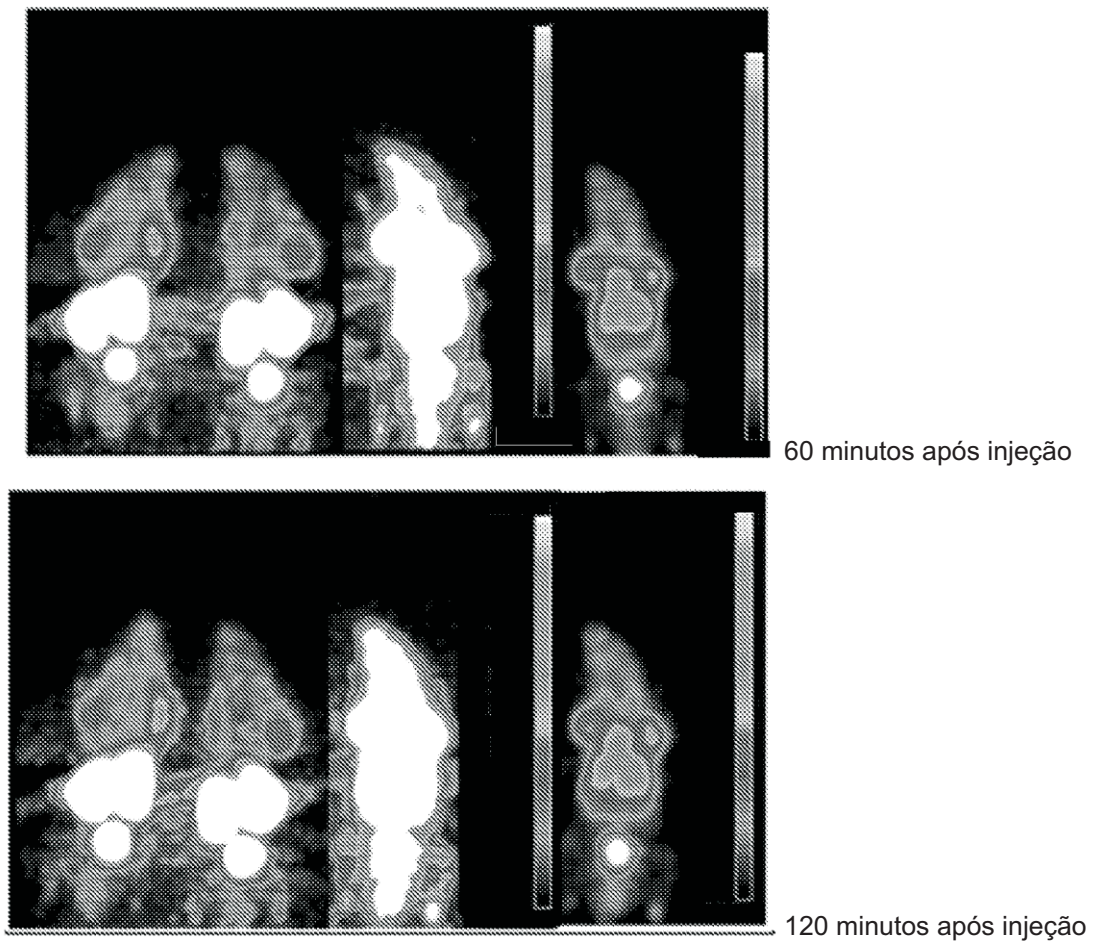


FIG. 22

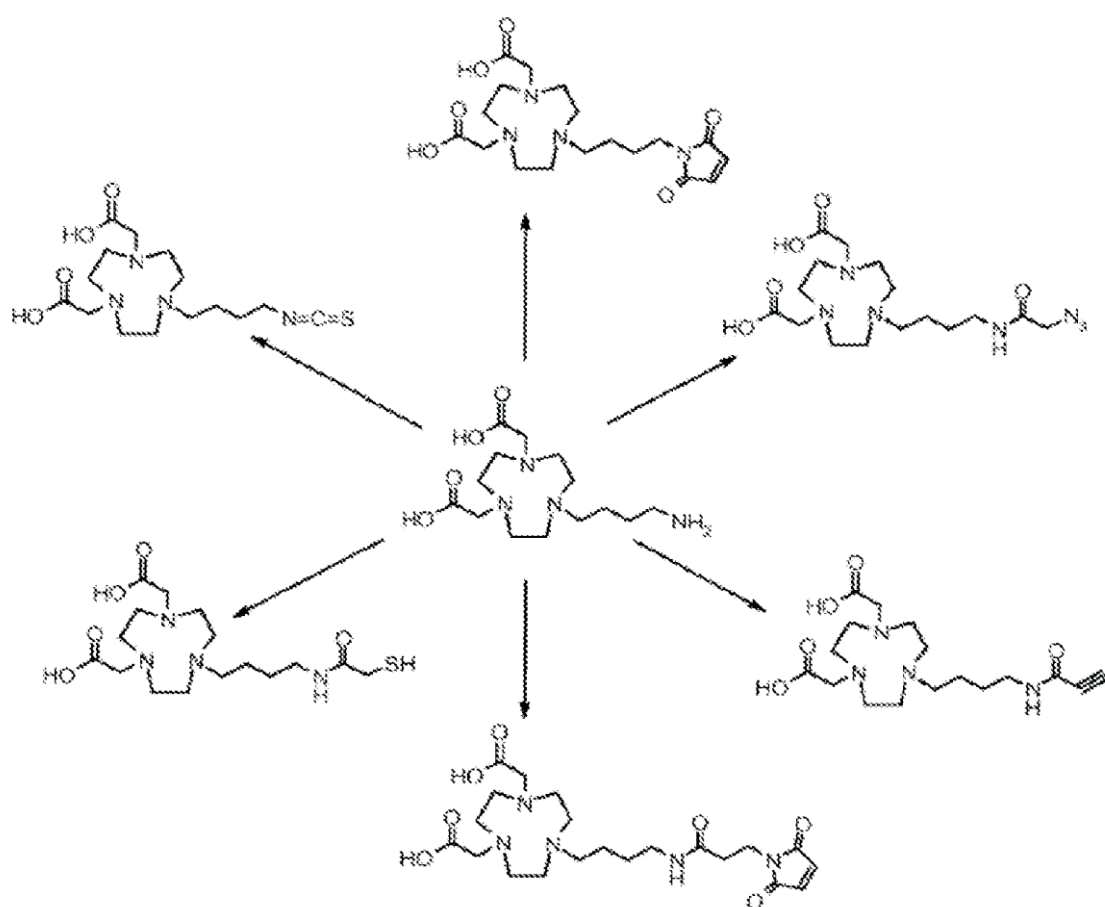


FIG. 23

RESUMO

Patente de Invenção: **“COMPOSIÇÕES E USOS DAS MESMAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇA OU CONDIÇÃO”**.

A presente invenção refere-se a métodos, agentes de imagem e estojos para determinação da distribuição e níveis de expressão de um ligante de ponto de checagem imune (tal como PD-L1 ou ligante do tipo PD-L1) em um indivíduo tendo uma doença ou condição. Agentes de anticorpos anti-PD-L1 e métodos para tratamento de doenças ou distúrbios através da administração de agentes de anticorpos anti-PD-L1 são também providos.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagem de sequência p250124.TXT
- Data de Geração do Código: 18/11/2020
- Hora de Geração do Código: 10:50:16
- Código de Controle:
 - Campo 1: D3E5577996FDE4E8
 - Campo 2: EC3FA587F29C1C80