

* R R 1 1 2 0 2 1 0 0 0 3 9 4 A 2 7

(43) Data da Publicação Nacional: 06/04/2021

(57) Resumo: MOLÉCULAS DE ANTICORPO QUE SE LIGAM A PD-L1 E CD137. O presente pedido se refere a moléculas de anticorpo que se ligam tanto a PD-L1 quanto a CD137 e são capazes de induzir agonismo de CD137. As moléculas de anticorpo compreendem um sítio de ligação com base em CDR para PD-L1, e um sítio de ligação a antígeno CD137 que está localizado em um domínio constante da molécula de anticorpo. As moléculas de anticorpo da invenção têm aplicação, por exemplo, no tratamento de doenças, como câncer.

MEST	M8																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Revisi																												
Revisi 2																												
Revisi 3																												
Revisi 4																												
Revisi 5																												
Revisi 6																												
Revisi 7																												
Revisi 8																												
Revisi 9																												
Revisi 10																												
Revisi 11																												
Revisi 12																												
Revisi 13																												
Revisi 14																												
Revisi 15																												
Revisi 16																												
Revisi 17																												
Revisi 18																												
Revisi 19																												
Revisi 20																												
Revisi 21																												
Revisi 22																												
Revisi 23																												
Revisi 24																												
Revisi 25																												
Revisi 26																												
Revisi 27																												
Revisi 28																												
Revisi 29																												
Revisi 30																												

"MOLECULAS DE ANTICORPO QUE SE LIGAM A PD-L1 E CD137"**Campo da Invenção**

[0001] A presente invenção se refere a moléculas de anticorpo que se ligam tanto a PD-L1 quanto a CD137 e são capazes de induzir agonismo de CD137. As moléculas de anticorpo compreendem um sítio de ligação com base em CDR para PD-L1, e um sítio de ligação a antígeno CD137 que está localizado em um domínio constante da molécula de anticorpo. As moléculas de anticorpo da invenção têm aplicação, por exemplo, no tratamento de doenças, como câncer.

Antecedentes da Invenção

[0002] A morte celular programada 1 (PD-1) e seus ligantes PD-L1 (CD274, B7-H1) e PD-L2 (B7-DC) liberam sinais inibidores que regulam o equilíbrio entre ativação de célula T, tolerância e imunopatologia. PD-L1 é transientemente expresso em todas as células imunológicas e algumas células tumorais. PD-L1 é um membro da família de proteína B7 e compartilha aproximadamente 20 % de identidade de sequência de aminoácidos com B7.1 e B7.2. PD-L1 humano compartilha 70 % e 93 % de identidade de aminoácidos com os ortólogos de murino e cinomolgo de PD-L1, respectivamente.

[0003] PD-L1 se liga a seu receptor PD-1 com uma afinidade (K_D) de 770 nM. PD-1 é expresso em células T, células B e células mieloides ativadas, e modula a ativação ou inibição de respostas imunológicas celulares. A ligação de PD-L1 a PD-1 libera um sinal inibidor, reduzindo a produção de citocina e proliferação de células T. Consequentemente, a expressão de PD-L1 por células pode mediar proteção contra extermínio de linfócito T citotóxico (CTL) e é um mecanismo

regulador que amortece as respostas imunológicas crônicas durante infecções virais. O câncer, que é uma doença crônica e pró-inflamatória, subverte essa via de proteção imunológica através da regulação crescente da expressão de PD-L1 para evitar a resposta imunológica do hospedeiro. No contexto de uma resposta imunológica ativa, o interferon-gama (IFN- γ) também regula de forma crescente a expressão de PD-L1.

[0004] PD-L1 também medeia a supressão imunológica através da interação com outra proteína, B7.1 (também conhecida como CD80), que bloqueia sua capacidade de entregar um dos sinais secundários de ativação em células T através de CD28. Em termos de expressão de PD-L1 em células tumorais e sua relação com B7.1, a relevância dessa interação específica na resistência imunológica tumoral ainda não é clara.

[0005] A expressão de PD-L1 foi mostrada em uma ampla variedade de tumores sólidos. Das 654 amostras examinadas em um estudo, abrangendo 19 tumores de diferentes locais, 89 (14 %) eram positivas para PD-L1 (≥ 5 % de frequência). As frequências positivas para PD-L1 mais altas foram vistas na cabeça e pescoço (17/54; 31 %), cervical (10/34; 29 %), câncer de origem primária desconhecida (CUP; 8/29; 28 %), glioblastoma multiforme (GBM; 5/20; 25 %), bexiga (8/37; 21 %), esofágico (16/80; 20 %), mama triplo negativo (TN) (6/33; 18 %) e hepatocarcinoma (6/41; 15 %) (Grosso et al, 2013). Mostrou-se que a expressão de PD-L1 associada um tumor confere resistência imunológica e potencialmente protege as células tumorais de apoptose mediada por célula T.

[0006] Os testes clínicos mostraram o benefício clínico

de alvejar PD-L1 em pacientes que resultaram na aprovação de três anti-PD-L1 que alvejam anticorpos monoclonais até o momento. Atezolizumabe (MPDL3280A, RG7466, Tecentriq™), um anticorpo IgG1 humanizado que se liga ao PD-L1, é aprovado para o tratamento de primeira linha de carcinoma pulmonar de célula não pequena (NSCLC) e o tratamento de primeira e segunda linha de câncer de bexiga após os testes clínicos terem mostrado taxas de resposta objetiva (ORR) de 38 % e 43 %, respectivamente, em pacientes com tumores positivos de PD-L1 (Iwai et al., 2017). Avelumabe (MSB0010718C, Bavencio™) é um anticorpo IgG1 completamente humano que se liga ao PD-L1 e é aprovado para o tratamento de carcinoma de célula de Merkel e o tratamento de segunda linha de câncer de bexiga, em que o anticorpo IgG1 completamente humano durvalumabe (MEDI4736, Imfinzi™) é aprovado para o tratamento de câncer de bexiga de segunda linha. Testes adicionais com esses anticorpos e outras terapias anti-PD-L1 estão em andamento em que focam na expansão da faixa de cânceres sólidos que podem ser tratados, incluindo câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de mama, carcinoma de célula de cabeça e pescoço, pancreática, ovariana e renal.

[0007] CD137 (4-1BB; TNFRSF9) é uma molécula coestimulatória da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral (TNFRSF). CD137 é amplamente conhecido por se regular de modo ascendente em células T CD8⁺ após a ativação, e também pode ser expresso em células T auxiliaadoras CD4⁺ ativadas, células B, células T regulatórias, células exterminadoras naturais (NK), células T exterminadoras naturais (NKT) e células dendríticas (DCs) (Bartkowiak & Curran, 2015). O papel funcional principal de

CD137 em intensificar a citotoxicidade de célula T foi primeiro descrita em 1997 (Shuford *et al.*, 1997), e logo após isso os mAbs anti-mAbs CD137 propostos como terapias anticâncer.

[0008] CD137 é uma proteína transmembrana com quatro domínios enriquecidos por cisteína extracelular, denominada CRD1-4, e uma região citoplásmica responsável pela sinalização de CD137. O ligante para CD137 é CD137L. Embora nenhuma estrutura de cristal exista para o complexo de CD137/CD137L, é previsto que CD137 forme um complexo de trímero/trímero com CD137L (Won *et al.*, 2010). O engate de CD137L resulta em formação de trímero receptor e agrupamento subsequente de múltiplos trímeros receptores, e resulta na ativação da cascata de sinalização de CD137. Essa cascata de sinalização fornece um sinal de sobrevivência para células T contra morte celular induzida por ativação (Hurtado *et al.*, 1997), dessa forma, desempenhando um papel crítico em sustentar as respostas imunológicas de célula T eficazes e gerando memória imunológica (Bartkowiak & Curran, 2015).

[0009] CD137 é expresso por células T ativadas e foi usado como um marcador para identificar células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas de antígeno (Wolfl *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2014). Tipicamente, a expressão de CD137 é maior em células T CD8⁺ que em células T CD4⁺ (Wen *et al.*, 2002). No caso de células T CD8⁺, a proliferação, sobrevivência e função efetora de citotoxicidade por meio da produção de interferon gama e interleucina-2 foram atribuídas à reticulação de CD137. A reticulação de CD137 também contribui com a diferenciação e manutenção de células T CD8⁺ de memória (Chacon *et al.*, 2013). Em alguns subconjuntos de células T

CD4⁺, a reticulação de CD137 resulta de modo similar na proliferação e na ativação e resulta na liberação de citocinas como interleucina-2 (Makkouk et al., 2016). Demonstrou-se também que CD137 foi expresso nos subconjuntos reativos a tumor de linfócitos de infiltração de tumor (TILs). Mostrou-se que a monoterapia de CD137 foi eficaz em diversos modelos de tumor imunogênicos pré-clínicos como linfomas de MC38, CT26 e célula B.

[0010] O desenvolvimento clínico de mAbs CD137 foi lento devido à inflamação de fígado de grau alto dose-limitada associada ao tratamento com anticorpo agonista CD137. Urelumabe (BMS-663513), um anticorpo de isotipo IgG4 humano de bloqueio de não ligante (Chester et al., 2018), foi o primeiro anticorpo anti-CD137 a entrar em testes clínicos, mas esses foram interrompidos após a toxicidade de fígado dependente de dose, no alvo e significativa ter sido observada (Chester et al., 2018; Segal et al., 2017; e Segal et al., 2018). Mais recentemente, os testes clínicos de urelumabe no tratamento de cânceres sólidos foram recomeçados, em que o tratamento com urelumabe foi combinado com radioterapia (NCT03431948) ou com outros anticorpos terapêuticos, como rituximabe (NCT01775631), cetuximabe (NCT02110082), anticorpo anti-PD-1 nivolumabe (NCT02253992, NCT02534506, NCT02845323), e uma combinação de nivolumabe e o anticorpo anti-LAG-3 BMS986016 (NCT02658981). No entanto, para reduzir toxicidade de fígado associada ao tratamento com urelumabe, a dosagem de urelumabe nesses testes teve que ser limitada e os resultados de eficácia foram desapontadores (Chester et al., 2018).

[0011] A toxicidade dose-limitada foi observada com

anticorpo anti-CD137 utomilumabe da Pfizer (PF-05082566), um anticorpo isotipo IgG2 humano, na faixa de dose 0,03 mg/kg até 10 mg/kg na Fase I de testes clínicos de câncer avançado (Chester *et al.* 2016; Segal *et al.*, 2018). No entanto, a taxa de resposta objetiva geral com esse anticorpo foi de apenas 3,8 % em pacientes com tumores sólidos, que indica potencialmente que utomilumabe tem um potencial e eficácia clínica mais fracos que urelumabe, enquanto tem um perfil de segurança mais favorável (Chester *et al.*, 2018; Segal *et al.*, 2018). Utomilumabe foi testado em combinação com radioterapia (NCT03217747) ou quimioterapia, bem como em combinação com outras terapias de anticorpo, incluindo anticorpo anti-PD-L1 avelumabe (NCT02554812), e anticorpo anti-PD-1 pembrolizumabe (NCT02179918), para avaliar a segurança, tolerabilidade, toxicidades dose-limitadas (DLTs), dose máxima tolerada (MTD) e eficácia das combinações de tratamento diferentes. Esses testes estão em andamento em que resultados anteriores mostram nenhum DLTs para doses de até 5 mg/kg e uma taxa de resposta de pacientes de 26 % para uma combinação de utomilumabe e pembrolizumabe. (Tolcher *et al.*, 2016) (Pérez-Ruiz *et al.*, 2017).

[0012] Os testes clínicos estão em andamento para testar anticorpo anti-CD137, utomilumabe, em combinação com anticorpo anti-PD-L1, avelumabe (NCT02554812, NCT3390296). As combinações triplas de utomilumabe com avelumabe e outras terapias também estão sendo testadas (NCT02554812, NCT03217747, NCT03440567, NCT03414658).

[0013] Uma diversidade de moléculas biespecíficas que alvejam CD137 também estão em estágio inicial de desenvolvimento, por exemplo, aquelas que alvejam CD137, bem

como FAP-alfa (Link *et al.*, 2018; Reichen *et al.*, 2018), HER2 (Hinner *et al.*, 2015 e documento WO 2016/177802 A1), ou EphA2 (Liu *et al.*, 2017). As proteínas de fusão CD137L que alvejam tumores, por exemplo, via FAP-alfa (Claus *et al.*, 2017) também estão em desenvolvimento. O CD137 biespecífico mais clinicamente avançado é PRS-343, uma molécula biespecífica CD137/HER2 que recentemente entrou na Fase I de testes clínicos para tratamento de uma faixa de tumores sólidos para avaliar sua segurança, tolerabilidade e eficácia (NCT03330561).

[0014] Há outras abordagens para combinar atividade anti-CD137 e atividade anti-PD-L1 em terapias biespecíficas. Uma abordagem usou a tecnologia biclonics para produzir um IgG humano heterodimérico de comprimento completo com ligação monovalente tanto a CD137 quanto ao PD-L1 (documento WO2018056821) que resulta em uma molécula que pode se ligar tanto a CD137 quanto ao PD-L1 e induzir o agonismo de CD137 na presença de altos níveis de PD-L1. Uma segunda abordagem foi descrita com o uso de fusões de sdAb-Fc para alvejar tanto o CD137 quanto o PD-L1 (documento WO2017123650). Ambas as abordagens têm a capacidade para se ligarem a CD137 na ausência de ligação ao PD-L1 e induzirem baixos níveis de agonismo de CD137 na ausência de PD-L1, em que esse agonismo é aumentado na presença de altos níveis de PD-L1. Um anticorpo biespecífico heterodimérico adicional foi descrito com ligação monovalente tanto a CD137 quanto ao PD-L1 (documento WO2019/025545 A1), que contém uma região de ligação ao anti-CD137 humanizado e uma região de anti-PD-L1 humano que induz agonismo de CD137 na presença de níveis de PD-L1.

[0015] Os dados atuais mostram que o tratamento geral com monoterapia de anti-PD-L1 resulta em uma resposta de menos de 50 % dos pacientes com câncer. Assim, permanece a necessidade na técnica de moléculas adicionais que possam ser direcionadas a PD-L1 e que possam ser aplicadas na terapia contra o câncer.

[0016] O bloqueio de PD-1/PD-L1 tem uma validação clínica forte, no entanto, menos que 50 % dos pacientes responderam em uma configuração de monoterapia. Espera-se que as combinações de PD-L1 e moduladores imunológicos demonstrem eficácia aprimorada. No entanto, tais combinações podem ser ligadas a um aumento em tratamento relacionada a eventos adversos e como resultado, a eficácia pode ser restrita pela janela terapêutica limitada. As moléculas agonísticas que alvejam CD137 ainda precisam demonstrar respostas significativas em pacientes com câncer, isso pode, em parte, ser devido aos níveis relativamente baixos de dose devido a um índice terapêutico limitado. Desse modo, resta uma necessidade na técnica de desenvolver tratamentos que combinem bloqueio de PD-L1 e suscitem agonismo de CD137 em terapias seguras e eficazes.

Declarações da invenção

[0017] Como explicado na seção de antecedentes acima, o desenvolvimento clínico de moléculas de agonista de CD137 foi mantido devido ao tratamento ser associada à inflamação de fígado de grau alto dose-limitada (urelumabe) ou baixa eficácia clínica (utomilumabe).

[0018] Os presentes inventores reconhecem que há uma necessidade na técnica de moléculas de agonista de CD137 que exibam alta atividade e em que o agonismo possa estar

localizado ao microambiente tumoral. Tais moléculas podem ser administradas aos indivíduos em doses que otimizam a potência e, portanto, a eficácia da molécula, e podem ser empregadas no tratamento de câncer como agentes imunoterápicos, por exemplo.

[0019] As moléculas de anticorpo da presente invenção compreendem um sítio de ligação a antígeno CD137 que está localizado em um domínio constante da molécula de anticorpo. Os presentes inventores realizaram uma seleção e maturação extensivas de programa de afinidade para isolar um painel de sítio de ligação a antígeno CD137 que contém moléculas (também denominado "Fcabs" no presente documento) que se liga a CD137 dimérico com uma afinidade maior que a CD137 monomérico.

[0020] "Afinidade", como denominado no presente documento, pode se referir à força da interação de ligação entre uma molécula de anticorpo e seu antígeno cognato, como medido por K_D . Como seria prontamente aparente ao elemento versado na técnica, em que a molécula de anticorpo tem a capacidade para formar múltiplas interações de ligação com um antígeno (por exemplo, em que a molécula de anticorpo tem a capacidade para se ligar o antígeno de modo bivalente e, opcionalmente, o antígeno é dimérico) a afinidade, como medida por K_D , também pode ser influenciada por avides, em que avides se refere à força geral de um complexo de anticorpo-antígeno.

[0021] A expressão de CD137 pelas células T é regulada de modo ascendente na ativação. Sem desejar se ligar por teoria, acredita-se que devido à alta expressão de CD137 em células T ativadas, CD137 estará na forma de dímeros, trímeros e

multímeros de ordem superior na superfície de tais células. Por outro lado, células imunológicas naïve, como células T naïve, expressam níveis baixos ou dispensáveis de CD137 em suas superfícies celulares e qualquer CD137 presente é, portanto, propenso a estar na forma monomérica. Portanto, espera-se que as moléculas de anticorpo que compreendem um sítio de ligação a antígeno CD137 que se ligam a CD137 dimérico ou multimérico com alta avides, se ligarão preferencialmente às células imunológicas ativadas, como células T ativadas, em oposição às células imunológicas naïve, por exemplo.

[0022] Acredita-se que esses recursos do sítio de ligação a antígeno CD137 distinguem as moléculas de anticorpo da presente invenção dos anticorpos conhecidos que se ligam a CD137, por exemplo, o anticorpo descrito no documento WO2018056821. O documento WO2018056821 descreve um anticorpo que contém um domínio de ligação de CD137 monovalente que se liga a CD137 com uma alta afinidade (baixa faixa de nM, consultar a Tabela 6 do documento WO2018056821). Visto que esses anticorpos não distinguem entre CD137 monomérico e dimérico ou multimérico, não se espera que esses anticorpos da técnica anterior exibam a mesma ligação preferencial às células imunológicas ativadas.

[0023] Como descrito na seção de antecedentes acima, acredita-se que ligação inicial de ligante CD137 a CD137 inicia uma cadeia de eventos que resulta na trimerização do receptor, seguida pelo agrupamento de receptor, ativação e iniciação subsequente de atividade de célula T antitumoral potente. Para um agente terapêutico obter eficientemente a ativação de CD137, espera-se, portanto, que diversos

monômeros receptores precisem ser ligados de forma a imitar a ligação pelo ligante trimérico.

[0024] Utomilumabe é uma molécula IgG2 e é dependente da reticulação por receptores Fcγ para sua atividade agonista. Urelumabe é uma molécula IgG4 com atividade constitutiva e, assim, não exige reticulação por receptores Fcγ para atividade, embora sua atividade agonista seja intensificada na reticulação por alguns receptores Fcγ. Os receptores Fcγ são encontrados ao longo de todo o corpo humano. A atividade de ativação de célula imune de utomilumabe e urelumabe é, portanto, não limitada aos sítios particulares no corpo e, desse modo, pode ocorrer em localizações diferentes do microambiente tumoral, como o fígado.

[0025] Os presentes inventores mostraram que o sítio de ligação a antígeno CD137 presente nas moléculas de anticorpo da invenção exige a reticulação a fim de agrupar e ativar CD137. No entanto, deve-se observar que esse não é um recurso intrínseco de ligantes CD137. Em vez disso, diversos dos ligantes CD137 isolados durante o programa de triagem ligados a CD137, mas não exigiu a reticulação para o agrupamento e ativação de CD137 ou induziu agrupamento e ativação de CD137 limitados na ausência de reticulação.

[0026] Como mencionado acima, a reticulação mediada por receptor Fcγ tem a desvantagem de que os receptores Fcγ são encontrados ao longo de todo o corpo humano e, desse modo, a ativação de CD137 não é limitada a um sítio particular. Os presentes inventores, portanto, introduziram mutações no domínio CH2 dos Fcabs para reduzir ou anular a ligação de receptor Fcγ. Desse modo, na ausência de reticulação através de um agente diferente dos receptores Fcγ, as moléculas de

anticorpo da invenção não exibiram atividade agonista de CD137. Ademais, espera-se que essas mutações resultarão nas moléculas de anticorpo da presente invenção que não têm a capacidade para induzir citotoxicidade celular de anticorpo, assim, as moléculas de anticorpo não suscitarão a morte das células imunológicas que as mesmas ativaram.

[0027] Os presentes inventores demonstraram que as moléculas de anticorpo que contêm o sítio de ligação a antígeno CD137 descritas acima e um sítio de ligação com base em CDR para PD-L1 são altamente eficazes em ativar células imunológicas em localizações em que CD137 e PD-L1 são coexpressos, por exemplo, em um microambiente tumoral. A coexpressão nesse sentido abrange situações em que CD137 e PD-L1 são expressos nas mesmas células, por exemplo, uma célula T, e situações em que CD137 e PD-L1 são expressos em células diferentes, por exemplo, uma célula T e uma célula tumoral, respectivamente.

[0028] As moléculas de anticorpo têm a capacidade para se ligarem simultaneamente a CD137 e a PD-L1. Desse modo, nas localizações em que PD-L1 e CD137 são coexpressos, acredita-se que a ligação das moléculas de anticorpo a PD-L1 causa a reticulação das moléculas de anticorpo, que, por sua vez, resultam no agrupamento e ativação de CD137 ligado na superfície de célula T.

[0029] Como demonstrado pelos presentes inventores, reduzindo-se ou anulando-se a ligação de receptor Fcγ, a atividade agonística das moléculas de anticorpo é dependente tanto de PD-L1 quanto de CD137 estarem presente. Em outras palavras, a atividade agonística é condicional e espera-se que as moléculas de anticorpo, portanto, tenham a capacidade

para ativar apenas células imunológicas em localizações em que PD-L1 está presente, como no microambiente tumoral. Espera-se que essa ativação de células imunológicas alvejada seja benéfica em evitar a inflamação de fígado observada no tratamento com urelumabe, por exemplo.

[0030] De fato, os presentes inventores demonstraram que as moléculas de anticorpo que têm os recursos descritos acima não exibiram hepatotoxicidade grave quando administradas em um camundongo modelo em doses terapêuticas. Apenas a patologia de fígado mínima foi observada em camundongos que foram administrados com essas moléculas de anticorpo, que não foi considerada como representado a hepatotoxicidade grave que foi anteriormente relatada para outros anticorpos agonistas anti-CD137. Estudos preliminares em macacos cinomolgos também mostraram que as moléculas de anticorpo são seguras e bem toleradas até 30 mg/kg. Sem desejar se ligar por teoria, espera-se que os resultados desses animais modelos se traduzam na clínica em prever o risco de hepatotoxicidade em pacientes humanos e, portanto, que as moléculas de anticorpo da invenção tenham baixo risco de induzir hepatotoxicidade em pacientes humanos tratados em doses terapêuticas.

[0031] Os presentes inventores também fornecem evidência *in vitro* de que o nível de atividade agonística de CD137 induzida pela molécula de anticorpo se correlaciona com a quantidade de expressão de PD-L1 na superfície celular. Os inventores demonstraram que a molécula de anticorpo tem a capacidade para tornar CD137 em agonista mesmo quando há um nível baixo de expressão de PD-L1 e que conforme o nível de PD-L1 no sistema aumenta, também aumenta a atividade

agonística de CD137. Esse resultado sustenta adicionalmente a evidência de que a atividade agonística de CD137 é dependente da expressão de PD-L1 e sugere que as moléculas de anticorpo da invenção terão uma faixa ampla de atividade em tumores que expressam níveis variantes de PD-L1 na superfície de célula tumoral.

[0032] Os sítios de ligação com base em CDR para PD-L1 descritos acima têm a capacidade para bloquear eficazmente a ligação de PD-L1 a seu PD-1 receptor. PD-1 é expresso em células T, células B e células mieloides ativadas, e modula a ativação ou inibição de respostas imunológicas celulares. A ligação de PD-L1 a PD-1 libera um sinal inibidor, reduzindo a produção de citocina e proliferação de células T, portanto, dispensando a resposta imunológica. No câncer, a interação de PD-L1 em uma célula tumoral com PD-1 em uma célula T reduz a atividade de célula T para impedir que o sistema imunológico ataque as células tumorais. Portanto, espera-se que bloqueando a ligação de PD-L1 ao PD-1, as moléculas de anticorpo da invenção possam impedir as células tumorais de sair do sistema imunológico dessa forma. Sem desejar se ligar por teoria, acredita-se que esse bloqueio eficaz de ligação de PD-L1 ao PD-1 funcione em conjunto com a atividade agonística de CD137 descrita acima para aumentar a potência antitumoral da molécula de anticorpo.

[0033] Os presentes inventores também mostraram que tais moléculas de anticorpo biespecífico que compreende o sítio de ligação a antígeno CD137 e o sítio de ligação com base em CDR para PD-L1 descritos acima têm a capacidade para suprimir o crescimento tumoral *in vivo*. Adicionalmente, a supressão de crescimento tumoral mais eficaz foi observada com as

moléculas de anticorpo biespecífico como em comparação com uma combinação de duas moléculas de anticorpo monoespecífico em que uma das moléculas de anticorpo compreendeu um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1 e a outra molécula compreendeu um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para CD137, demonstrando que o agrupamento e a sinalização intensificados de CD137, e, desse modo, a ativação de célula T e efeitos antitumorais correspondentes, são observados com as moléculas de anticorpo da invenção.

[0034] As moléculas de anticorpo que compreendem um sítio de ligação a antígeno CD137 da invenção pode adicionalmente ter a capacidade para se ligarem de modo bivalente ao PD-L1, tal que as moléculas de anticorpo se ligante tanto a CD137 quanto ao PD-L1 de modo bivalente. Espera-se que isso seja vantajoso, visto que se espera que a ligação bivalente de ambos os alvos crie uma ponte entre a célula T que expressa CD137 e o PD-L1 que expressa célula mais estável e, portanto, estenda o tempo de duração que a célula T está localizada em sítios onde PD-L1 é coexpresso com CD137, como no microambiente tumoral, e possa atuar na doença, por exemplo, no tumor. Isso é diferente da grande maioria de formatos de anticorpo biespecífico convencionais que são heterodiméricos e que ligam cada antígeno-alvo de modo monovalente por meio de um braço de Fab. Espera-se que tal interação monovalente não seja apenas menos estável, mas também menos eficaz em induzir o agrupamento de receptores de TNF como CD137 e/ou exija expressão superior de um ou ambos os alvos para induzir tal agrupamento, e, desse modo, a ativação de célula T. Isso é apoiado por experiências conduzidas pelos presentes inventores, que mostraram que moléculas de mAb² que

compreendem um sítio de ligação de Fab bivalente para PD-L1 e um sítio de ligação monovalente para CD137 em um dos domínios CH3 da molécula induzira, níveis menores de ativação de célula T, como medido pela liberação de IFN- γ , que uma ligação de mAb² para ambos os alvos de modo bivalente.

[0035] Um recurso adicional das moléculas de anticorpo identificado pelos inventores é que o sítio de ligação a antígeno para CD137 e o sítio de ligação com base em CDR para PD-L1 são ambos contidos na própria estrutura de anticorpo. Em particular, as moléculas de anticorpo não exigem que outras proteínas sejam fusionadas à molécula de anticorpo por meio de ligantes ou outros meios para resultar na molécula que se ligam de modo bivalente a ambos os seus alvos. Isso tem uma diversidade de vantagens. Especificamente, as moléculas de anticorpo podem ser produzidas com o uso de métodos similares àqueles empregados para a produção de anticorpos padrão, visto que os mesmos não compreendem quaisquer porções fusionadas. Espera-se também que a estrutura resulte em estabilidade de anticorpo aprimorada, visto que os ligantes podem se degradar com o tempo, o que resulta em uma população heterogênea de moléculas de anticorpo. Em tais populações heterogêneas, não é esperado que aqueles anticorpos na população que têm apenas uma proteína fusionada aos mesmos, e, desse modo, que se ligam a apenas um alvo de modo monovalente, induzam o agonismo condicional de receptores de TNF como CD137 de modo tão eficaz quanto aqueles anticorpos que têm duas proteínas fusionadas aos mesmos e que, desse modo, têm a capacidade para se ligarem a ambos os alvos de modo bivalente. A clivagem/degradação do ligante pode ocorrer antes da

administração ou após a administração do produto terapêutico ao paciente (por exemplo, através de clivagem enzimática ou do pH *in vivo* do paciente), portanto, que resulta em uma redução de sua eficácia enquanto circula no paciente. Visto que não há ligantes nas moléculas de anticorpo da invenção, espera-se que as moléculas de anticorpo retenham o mesmo número de sítios de ligação tanto antes quanto após a administração. Adicionalmente, a estrutura das moléculas de anticorpo também é preferencial a partir da perspectiva de imunogenicidade das moléculas, como a introdução de proteínas fusionadas ou ligantes ou ambos podem induzir a imunogenicidade quando as moléculas são administradas a um paciente, que resulta em eficácia reduzida da terapia.

[0036] Desse modo, a presente invenção fornece:

[1] Uma molécula de anticorpo que se liga ao ligante de morte programada 1 (PD-L1) e CD137, que compreende

- (a) um sítio de ligação a antígeno com base em região determinante de complementaridade (CDR) para PD-L1; e
- (b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende CDRs 1-6 apresentados em:

- (i) SEQ ID NOs **1, 2, 3, 4, 5 e 6**, respectivamente **[E12v2]**;
- (ii) SEQ ID NOs **1, 2, 3, 18, 19 e 20**, respectivamente **[E05v2]**; ou
- (iii) SEQ ID NOs **1, 2, 3, 18, 19 e 29**, respectivamente **[G12v2]**; e

em que o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende uma primeira sequência e uma segunda sequência localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3,

respectivamente, em que as primeira e segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114 [FS22-172-003]**, ou **79** e **80 [FS22-53-008]**, respectivamente.

[2] Uma molécula de anticorpo que se liga ao ligante de morte programada 1 (PD-L1) e CD137, que compreende

(a) um sítio de ligação a antígeno com base em região determinante de complementaridade (CDR) para PD-L1; e

(b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende CDRs 1-6 de acordo com IMGT] apresentados em:

(i) SEQ ID NOs **7, 8, 9, 10, 11 e 6**, respectivamente **[E12v2]**;

(ii) SEQ ID NOs **21, 8, 9, 22, 11 e 20**, respectivamente **[E05v2]**; ou

(iii) SEQ ID NOs **21, 8, 9, 22, 11 e 29**, respectivamente **[G12v2]**; e

em que o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende uma primeira sequência e uma segunda sequência localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3, respectivamente, em que as primeira e segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114 [FS22-172-003]**, ou **79** e **80 [FS22-53-008]**, respectivamente.

[3] A molécula de anticorpo, de acordo com [1] ou [2], em que a molécula de anticorpo compreende CDRs 1-6 apresentados em (i) ou (ii) de [1] ou [2].

[4] A molécula de anticorpo, de acordo com [1] ou [2], em que a molécula de anticorpo compreende CDRs 1-6 apresentados em (i) de [1] ou [2].

[5] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [4], em que a molécula de anticorpo compreende um

domínio variável de cadeia pesada (VH) e/ou domínio variável de cadeia leve (VL), preferencialmente um domínio VH e um domínio VL.

[6] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [5], em que a molécula de anticorpo compreende uma cadeia pesada de imunoglobulina e/ou uma cadeia leve de imunoglobulina, preferencialmente uma cadeia pesada de imunoglobulina e uma cadeia leve de imunoglobulina.

[7] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [5] a [6], em que a molécula de anticorpo compreende o domínio VH e/ou domínio VL, preferencialmente o domínio VH e o domínio VL apresentado em:

- (i) SEQ ID NOs **12** e **14**, respectivamente **[E12v2]**;
- (ii) SEQ ID NOs **23** e **25**, respectivamente **[E05v2]**; ou
- (iii) SEQ ID NOs **23** e **30**, respectivamente **[G12v2]**.

[8] A molécula de anticorpo, de acordo com [7], em que a molécula de anticorpo compreende os domínios VH e domínio VL apresentados em (i) ou (ii).

[9] A molécula de anticorpo, de acordo com [8], em que a molécula de anticorpo compreende os domínios VH e domínio VL apresentados em (i).

[10] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [9], em que a primeira sequência está localizada entre as posições 14 e 17 do domínio CH3 da molécula de anticorpo, em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[11] A molécula de anticorpo, de acordo com [10], em que a primeira sequência está localizada nas posições 15, 16, 16.5, 16.4, 16.3, 16.2, e 16.1 do domínio CH3 da molécula de anticorpo, em que a numeração de resíduo de aminoácido está

de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[12] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [11], em que a segunda sequência está localizada nas posições 92 a 98 do domínio CH3 da molécula de anticorpo, em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[13] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [12], em que a molécula de anticorpo compreende adicionalmente uma terceira sequência localizada na alça estrutural de CD do domínio CH3.

[14] A molécula de anticorpo, de acordo com [13], em que a terceira sequência está localizada nas posições 43 a 78 do domínio CH3 da molécula de anticorpo, em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[15] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [13] a [14], em que a terceira sequência tem a sequência apresentada em SEQ ID NO: **73**.

[16] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [15], em que a molécula de anticorpo compreende a sequência de domínio CH3 apresentada em:

(i) SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**; ou

(ii) SEQ ID NO: **81 [FS22-53-008]**.

[17] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [15], em que as primeira e segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114 [FS22-172-003]**, respectivamente.

[18] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [15] e [17], em que a molécula de anticorpo compreende a sequência de domínio CH3 apresentada em SEQ ID NO: **115**

[FS22-172-003].

[19] Uma molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [18], em que a molécula de anticorpo é uma molécula de IgG1 humano.

[20] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [19], em que a molécula de anticorpo compreende as cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo:

- (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **134** e **17**, respectivamente;
- (ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **137** e **28**, respectivamente;
- (iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **140** e **33**, respectivamente;
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **143** e **17**, respectivamente;
- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **146** e **28**, respectivamente; ou
- (vi) **FS22-053-008-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **149** e **33**, respectivamente.

[21] A molécula de anticorpo, de acordo com [20], em que a molécula de anticorpo compreende cadeia leve e cadeia pesada apresentadas em qualquer um dentre (i) - (iv) de [20].

[22] A molécula de anticorpo, de acordo com [20], em que a molécula de anticorpo compreende cadeia leve e cadeia pesada apresentadas em (i) de [20].

[23] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [20] a [22], em que a prolina (P) na posição **114** do domínio CH2 do anticorpo é substituído com alanina (A), e em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[24] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [23], em que a molécula de anticorpo liga PD-L1 humano e CD137 humano.

[25] A molécula de anticorpo, de acordo com [24], em que o PD-L1 consiste em ou compreende a sequência apresentada em SEQ ID NO: **180**.

[26] A molécula de anticorpo, de acordo com [24] ou [25], em que o CD137 humano consiste em ou compreende a sequência apresentada em SEQ ID NO: **186**.

[27] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [26], em que a molécula de anticorpo tem a capacidade para ativar CD137 em uma célula imune na presença de PD-L1 ligado à superfície de célula tumoral.

[28] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [26], em que a ligação da molécula de anticorpo a CD137 em uma célula imune e a PD-L1 ligado à superfície de célula tumoral causa o agrupamento de CD137 na célula imune.

[29] A molécula de anticorpo, de acordo com [27] ou [28], em que a célula imune é uma célula T, célula B, célula exterminadora natural (NK), célula T exterminadora natural (NKT), ou célula dendrítica (DC).

[30] A molécula de anticorpo, de acordo com [29], em que a célula imune é uma célula T.

[31] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [30], em que a molécula de anticorpo foi modificada para reduzir ou anular a ligação do domínio CH2 da molécula de anticorpo a um ou mais receptores Fcγ.

[32] A molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [31], em que a molécula de anticorpo não se liga a um ou mais receptores Fcγ.

[33] A molécula de anticorpo, de acordo com [31] ou [32], em que o receptor Fcγ é selecionado a partir do grupo que consiste em: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb e FcγRIII.

[34] Um conjugado que compreende a molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [33] e uma molécula bioativa.

[35] Um conjugado que compreende a molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [33] e uma identificação detectável.

[36] Uma molécula ou moléculas de ácido nucleico que codificam a molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [33].

[37] A molécula ou moléculas de ácido nucleico que codificam a molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [2], [5] a [7], [10] a [16], [19] a [20] e [23] a [33], em que a molécula (ou moléculas) de ácido nucleico compreende a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada e/ou sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de:

(i) **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentado em SEQ ID NOs **32 e 39**, ou **135 e 136**, respectivamente, preferencialmente, SEQ ID NOs **32 e 39**, respectivamente;

(ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **138 e 139**, respectivamente;

(iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **141 e 142**, respectivamente;

(iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **144 e 145**, respectivamente;

(v) **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **147 e 148**, respectivamente; ou

(vi) **FS22-053-008-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **150 e 151**, respectivamente.

[38] Um vetor ou vetores que compreendem a molécula ou moléculas de ácido nucleico, de acordo com qualquer um de [36] a [37].

[39] Uma célula hospedeira recombinante que compreende a molécula (ou moléculas) de ácido nucleico, de acordo com qualquer um de [36] a [37], ou o vetor (ou vetores), de acordo com [38].

[40] Um método de produção da molécula de anticorpo, de acordo com qualquer um de [1] a [33], que compreende cultivar a célula hospedeira recombinante de [39] sob condições para produção da molécula de anticorpo.

[41] O método, de acordo com [40], que compreende adicionalmente isolar e/ou purificar a molécula de anticorpo.

[42] Uma composição farmacêutica que compreende a molécula de anticorpo ou conjugado, de acordo com qualquer um de [1] a [35], e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

[43] A molécula de anticorpo ou conjugado, de acordo com qualquer um de [1] a [35], para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo.

[44] Um método de tratamento de câncer em um indivíduo que compreende administrar ao indivíduo a quantidade terapeuticamente eficaz da molécula de anticorpo ou conjugado, de acordo com qualquer um de [1] a [35].

[45] O uso da molécula de anticorpo ou conjugado, de acordo com qualquer um de [1] a [35], na preparação de um medicamento para o tratamento de câncer.

[46] A molécula de anticorpo ou o conjugado para uso, o método ou o uso, de acordo com qualquer um de [43] a [45], em que o câncer é selecionado a partir da lista que consiste

em: melanoma, câncer de bexiga, câncer do cérebro, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de fígado, câncer de cabeça e pescoço, câncer do pâncreas, câncer renal, câncer do estômago e Tumores Estromais Gastrointestinais (GISTs).

[47] A molécula de anticorpo ou conjugado para uso, de acordo com [43], em que o tratamento compreende administrar a molécula de anticorpo ou conjugado ao indivíduo em combinação com uma segunda terapia.

[48] O método, de acordo com [44], em que o método compreende adicionalmente administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma segunda terapia ao indivíduo.

Breve Descrição das Figuras

[0037] Figura 1: As Figuras 1A, B e C mostram um alinhamento das sequências dos domínios CH3 de Fcabs FS22-053, FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-014, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053-017, FS22-172, FS22-172-001, FS22-172-002, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005 e FS22-172-006, bem como o Fcab do tipo selvagem (WT). Os números dos resíduos, de acordo com os sistemas de numeração IMGT, éxon IMGT (numeração consecutiva), EU e Kabat são indicados.

[0038] A Figura 2 mostra que o mAb² CD137/PD-L1 FS22-172-003-AA/E12v2 tem a capacidade para se ligar a células T de CD4⁺ (Figura 2A) e CD8⁺ (Figura 2B) ativadas. O mAb² CD137/PD-L1 FS22-172-003-AA/E12v2 anti-humano ligado a células T ativadas com valores de EC₅₀ de 0,8 nM no caso de células T CD4⁺ e 0,9 nM no caso de células T CD8⁺. O anticorpo PD-L1 anti-humano de controle positivo (G1-AA/E12v2) mostrou afinidade muito similar ao mAb² com valores de EC₅₀ de 0,8 nM

para ambos os tipos de célula. O anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo (G1-AA/MOR7480.1) mostrou baixa ligação a células CD4⁺ e CD8⁺, indicando o nível baixo de expressão de CD137 nesses tipos de célula.

[0039] A **Figura 3** mostra que mAb² CD137/PD-L1 FS22-172-003-AA/E12v2 anti-humano não se liga a células de CHO que superexpressam receptor Fcγ. mAb² CD137/PD-L1 FS22-172-003-AA/E12v2 anti-humano, o anticorpo de controle positivo para ligação de receptor Fcγ, G1/4420, e o anticorpo de controle negativo para nenhuma ligação de receptor Fcγ, G1-AA/4420, foram testados em um ensaio de ligação à célula contra cinco linhagens celulares de CHO que superexpressam receptor Fcγ diferentes que expressam (A) FcγRIIA 131H, (B) FcγRIIA 131E, (C) FcγRIIB, (D) FcγRIIIA 158F, (E) FcγRIIIA 158V, bem como (F) uma linhagem celular de WT de CHO usada como um controle negativo. Os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, que continham a mutação LALA na região CH2, não ligaram nenhum dentre os receptores Fcγ testados e nem se ligaram não especificamente às células de WT de CHO (triângulos pretos fechados). O anticorpo de controle positivo se ligou aos receptores Fcγ (círculos pretos fechados) e o anticorpo de controle negativo G1-AA/4420, que conteve a mutação LALA na região CH2, não se ligou a receptores Fcγ (quadrados cinza abertos), como esperado.

[0040] A **Figura 4** mostra a liberação de IL-2 humano (hIL-2) em um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ primário humano na presença de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano ou anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/20H4.9. Todos os mAb² testados acionaram agrupamento e ativação de CD137

de células T CD8+ apenas quando os mAb² foram reticulados por células HEK que superexpressam PD-L1 humano que resultaram na liberação de IL-2 humano. Os valores de EC₅₀ dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foram menores que o valor de EC₅₀ do anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo, G1-AA/20h4.9 quando reticulado com anticorpo secundário de CH2 anti-humano (círculos pretos fechados, linhas pontilhadas), indicando que a ativação de célula T aprimorada foi obtida com o mAb². Todos esses mostraram um aumento na liberação de hIL-2 e houve uma liberação de IL-2 maior (E_{máx}) com o anticorpo de controle positivo que com os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano.

[0041] A **Figura 5** mostra a liberação de IL-2 humano (hIL-2) em um ensaio de ativação de célula T CD8+ primário humano na presença de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano ou anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/20H4.9. Todos os mAb² testados acionaram agrupamento e ativação de CD137 de células T CD8+ apenas quando os mAb² foram reticulados por células de MDA-MD-231 que expressam endogenamente PD-L1 humano que resulta na liberação de IL-2 humano. Os valores de EC₅₀ dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foram menores que o valor de EC₅₀ do anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo, G1-AA/20H4.9 quando reticulado com anticorpo secundário de CH2 anti-humano (círculos pretos fechados, linha pontilhada) indicando que a melhor atividade foi obtida com o mAb². Todos esses mostraram um aumento na liberação de hIL-2 e houve uma liberação de IL-2 maior (E_{máx}) com o anticorpo de controle positivo que com os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano.

[0042] A **Figura 6** mostra liberação de IL-2 humano (hIL-

2) em um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ primário humano na presença de mAb² CD137/PD-L1 FS22-172-003-AA/E12v2 anti-humano ou anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/20H4.9. Todos os mAb² testados acionaram o agrupamento de CD137 e a ativação de células T CD8⁺ apenas quando os mAb² foram reticulados por células HEK.hPD-L1 que compreenderam pelo menos 6,5 % da população de células HEK total que resulta na liberação de IL-2 humano. Os valores de EC₅₀ dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano permaneceram similares quando a modulação da porcentagem de células HEK.hPD-L1 presente no ensaio, mas a ativação máxima (E_{máx}) aumentou em relação a uma porcentagem crescente de células de reticulação HEK.hPD-L1 no ensaio. Isso indicou que a melhor atividade máxima foi obtida com o mAb² geral quando 100 % das células HEK expressaram PD-L1.

[0043] A **Figura 7** mostra que mAb² CD137/PD-L1 anti-humano têm a capacidade para ativar células T. **(A)** e **(B)**: A liberação de IFN- γ em um ensaio de Reação de Linfócito Misturado (MLR) humano primário ensaio foi testada na presença de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, anticorpo de controle positivo PD-L1 anti-humano G1/S70 ou anticorpo de controle positivo CD137 anti-humano G1-AA/20H4.9 (reticulado com um anticorpo CH2 anti-humano). **(A)** mAb² à base de Fcab FS22-053-008 e **(B)** mAb² à base de Fcab FS22-172-003 mostraram atividade maior nesse ensaio que qualquer um dos anticorpos de controle positivo, indicando que o bloqueio de PD-L1 e agonismo de CD137 na mesma molécula suscitam a maior ativação de célula T, provavelmente através de agrupamento com base em PD-L1 e ativação de CD137. **(C)** A liberação de IFN- γ em um ensaio de MLR humano primário foi testado na presença de mAb²

CD137/PD-L1 anti-humano, anticorpo PD-L1 anti-humano G1-AA/E12v2, anticorpo de controle positivo CD137 anti-humano G1-AA/20H4.9 (reticulado com um anticorpo CH2 anti-humano), ou Fcab CD137 anti-humano no formato de mAb² simulado (FS22-172-003-AA/D1.3). mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 mostrou ativação maior de atividade de célula T nesse ensaio que qualquer um dos anticorpos de controle positivo ou seu Fcab componente no formato de mAb² simulado, indicando que o bloqueio de PD-L1 e agonismo de CD137 na mesma molécula suscitam a maior ativação de célula T, provavelmente através de reticulação à base de PD-L1 que resulta em agrupamento e ativação de CD137.

[0044] A **Figura 8** mostra a liberação de IL-2 em um ensaio de ativação de célula T, em que as células T foram geneticamente modificadas para superexpressar CD137 de cinomolgo, na presença de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano e anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/MOR7480.1. Todos os mAb² testados acionaram o agrupamento e a ativação de CD137 apenas quando reticulados com as células HEK que superexpressam PD-L1 de cinomolgo (símbolos preto e cinza abertos e fechados com linhas de conexão contínuas) que resultam em uma liberação de interleucina-2 de camundongo (mIL-2) em um ensaio de ativação de célula T DO11.10. Em concentrações crescentes, o anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo, G1-AA/MOR7480.1 que foi anteriormente mostrado por outros como cinomolgo de reatividade cruzada com CD137 de cinomolgo, mostra um aumento em liberação de mIL-2 (círculos pretos contínuos, linha pontilhada), no entanto, a liberação máxima foi significativamente menor que todos os mAb² CD137/PD-L1 anti-

humano. Todos os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano sem células HEK que superexpressam PD-L1 para reticulação mostram liberação de mIL-2 significativamente menor em comparação com quando reticulados (dados não mostrados).

[0045] A **Figura 9** mostra a liberação de IL-2 no dia 2 (**Figura 9A**) ou liberação de IFN- γ no dia 6 (**Figura 9B**) a partir de células T CD4⁺ de cinomolgo cultivadas com monócitos de cinomolgo alogênicos na presença de uma microtitulação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano FS22-053-008-AA/E12v2 ou 172-003-AA/E12v2 ou anticorpo de controle positivo PD-L1 anti-humano G1-AA/E12v2 ou anticorpo de controle de isotipo G1-AA/He1D1.3.

[0046] A **Figura 10** mostra a liberação de IL-2 de camundongo em um ensaio de ativação de célula T CD137 de camundongo de DO11.10 que testa os Fcabs de CD137 reticulados de camundongo e humano FS22-053-014 e FS22-053-017 em formato de mAb² simulado quando reticulados com Proteína L. Fcab FS22-053-014 e FS22-053-017, e CD137 anticamundongo FS22m-063, todos no formato de mAb² simulado He1D1.3, ativaram CD137 quando reticulados com a Proteína L que resulta em uma liberação de mIL-2. O mAb CD137 anticamundongo de controle positivo, Lob12.3, mostrou um aumento em liberação de mIL-2 como esperado. Todos os Fcabs anti-CD137 em formato de mAb² simulado sem Proteína L para reticulação (linhas pontilhadas) mostraram liberação de mIL-2 amplamente reduzida em comparação com quando foram reticulados. FS22-053-017 teve menor atividade nesse ensaio (EC₅₀ 8 vezes pior em comparação com FS22-053-014) mas ainda mostraram atividade no ensaio.

[0047] A **Figura 11** mostra a liberação de IFN γ de

camundongo que é uma indicação de ativação de célula T CD8+. O mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo mostra a maior potência nesse ensaio acima de qualquer um dos anticorpos de controle positivo contra CD137 e PD-L1 humano, ou a combinação dos dois. Como esperado, o Fcab FS22m-063-AA em formato de mAb² simulado (FS22m-063-AA/HelD1.3) não mostra qualquer atividade.

[0048] A **Figura 12** mostra medições de volume tumoral de modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com G1-AA/4420 (controle de IgG), G1/S70 (controle positivo PD-L1), G1-AA/lob12.3 e G1/lob12.3 (controle positivo CD137 com a mutação LALA e sem), a combinação de G1/S70 mais G1-AA/lob12.3 e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). O volume tumoral médio de mais ou menos 95 % de intervalo de confiança é plotado. FS22m-063-AA/S70 tem a capacidade para significativamente reduzir o crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG e mAb de controle positivo anti-PD-L1. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado. O volume tumoral médio mostrado como média geométrica ou aritmética, como adequado com base no teste de normalizada de dados. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

[0049] A **Figura 13** mostra os resultados de um estudo de resposta à dose de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26. **A:** mostra medições de volume tumoral do modelo de tumor singênico CT26

que cresce subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com 3 doses de G1-AA/4420 (controle de IgG, 10 mg/kg), G1/lob12.3 (controle positivo CD137, 1 mg/kg), e o mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70 em 4 doses diferentes (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg). Cada dose é indicada por uma seta preta vertical no eixo geométrico x. O volume tumoral médio de mais ou menos 95 % de intervalo de confiança é plotado. FS22m-063-AA/S70 tem a capacidade para significativamente reduzir o crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG e mAb de controle positivo anti-PD-L1. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado. O volume tumoral médio mostrado como média geométrica ou aritmética, como adequado com base no teste de normalizada de dados. ** $P \leq 0,01$; *** **** $P \leq 0,0001$. **B:** mostra uma plotagem de Kaplan Meier do modelo de tumor singênico CT26 que cresce subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com 3 doses de G1-AA/4420 (controle de IgG, ~10 mg/kg) e os mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70 em 4 doses diferentes de 2 µg, 6 µg, 20 µg, e 200 µg (equivalente a aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg). FS22m-063-AA/S70 induz um aumento dependente de dose de sobrevivência em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

[0050] A **Figura 14** mostra um aumento dependente de dose em razão em porcentagem de CD8+:CD4+ em tumor e sangue de camundongos administrados com q2dx3 com mAb² CD137/PD-L1

anticamundongo FS22m-063-AA/S70 em quatro níveis de dose diferentes é mostrada nos painéis A e B e a expressão de Ki67 em células T CD8+ é mostrada nos painéis C e D.

[0051] A **Figura 15** mostramedições de volume tumoral do modelo de tumor singênico MC38 que cresceu subcutaneamente em camundongos C57BL/6 tratados com G1-AA/4420 (controle de isotipo), G1-AA/S70 (controle positivo de PD-L1), G1-AA/lob12.3 (controle positivo CD137), a combinação de G1-AA/S70 mais G1-AA/lob12.3, e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). O volume tumoral médio [em mm³] de mais ou menos os 95 % de Intervalo de Confiança é plotado. FS22m-063-AA/S70 tem a capacidade para significativamente reduzir crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico MC38 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG, camundongos tratados com mAb de controle positivo anti-PD-L1, camundongos tratados com controle positivo anti-CD137. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado. **** valor $p \leq 0,0001$.

[0052] A **Figura 16** mostra medições de volume tumoral do modelo de tumor singênico B16.F10 que cresceu subcutaneamente em camundongos C57BL/6 tratados com G1-AA/4420 (controle de isotipo) e os mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70. Ambas as composições foram dosadas em 1 mg/kg. O volume tumoral médio [em mm³] de mais ou menos os 95 % de Intervalo de Confiança é plotado. O tratamento com FS22m-063-AA/S70 reduziu significativamente o crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico B16.F10 em comparação com os camundongos tratados com controle de

IgG. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado. O volume tumoral médio mostrado como média geométrica ou aritmética, como adequado com base no teste de normalizada de dados. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

[0053] A **Figura 17** mostra as plotagens de espaguete para camundongos individuais no modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com (A) G1-AA/4420 (controle de IgG), (C) G1/S70 (controle positivo anti-PD-L1), (B) G1-AA/lob12.3 e (D) G1/lob12.3 (controle positivo anti-CD137 com e sem a mutação LALA), ou (E) uma combinação de G1/S70 mais G1-AA/lob12.3 e (F) FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 induziu a inibição de crescimento tumoral significativa em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

[0054] A **Figura 18** mostra uma plotagem de Kaplan Meier do modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com G1-AA/4420 (controle de IgG), a combinação de G1/S70 mais G1-AA/lob12.3, e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo) todos a 1 mg/kg. FS22m-063-AA/S70 induziu a sobrevivência significativa em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

[0055] A **Figura 19** mostra medições de volume tumoral do modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com G1-AA/HelD1.3 (controle

de IgG), G1/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/lob12.3 (controle positivo anti-CD137), e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). O volume tumoral médio de mais ou menos 95 % de intervalo de confiança é plotado. FS22m-063-AA/S70 teve a capacidade para significativamente reduzir crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG, camundongos tratados com mAb de controle positivo anti-PD-L1 e camundongos tratados com controle positivo anti-CD137. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado. O volume tumoral médio mostrado como média geométrica ou aritmética, como adequado com base no teste de normalizada de dados. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$.

[0056] A **Figura 20** mostra uma plotagem de Kaplan Meier do modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com G1-AA/HelD1.3 (controle de IgG), G1/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/lob12.3 (controle positivo anti-CD137) e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 induz a sobrevivência significativa em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG e camundongos tratados com controle positivo CD137.

[0057] A **Figura 21** mostra as plotagens de espaguete para camundongos individuais no modelo de tumor singênico MC38 que cresceu subcutaneamente em camundongos C57BL/6 tratados com 3 doses de (A) G1-AA/4420 (controle de isotipo), (B) G1-

AA/S70 (controle positivo anti-PD-L1), (C) G1-AA/lob12.3 (controle positivo anti-CD137), (D) a combinação de G1-AA/S70 mais G1-AA/lob12.3, e (E) FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 induz a inibição completa de crescimento tumoral, que resulta em camundongos 100 % livres de tumor, em um modelo de tumor singênico MC38 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

[0058] A **Figura 22** mostra uma plotagem de Kaplan Meier do modelo de tumor singênico MC38 que cresceu subcutaneamente em camundongos C57BL/6 tratados com 3 doses de G1-AA/4420 (controle de isotipo), G1-AA/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/lob12.3 (controle positivo anti-CD137), a combinação de G1-AA/S70 mais G1-AA/lob12.3, e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 induz a sobrevivência completa em um modelo de tumor singênico MC38 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

[0059] A **Figura 23** mostra as plotagens de espaguete para camundongos individuais no modelo de tumor singênico B16.F10 que cresceu subcutaneamente em camundongos C57BL/6 tratados com G1-AA/4420 (controle de isotipo) (**Figura 23A**) e os mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70 (**Figura 23B**). FS22m-063-AA/S70 induziu a inibição parcial de crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico B16.F10 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

[0060] A **Figura 24** mostra dados de ligação de mAb² anti-mCD137/PD-L1 às células T *ex vivo*, determinados por citometria de fluxo. Os valores de Intensidade de Fluorescência Média (MFI) foram medidos a partir de anticorpo

secundário Fc anti-humano conjugado com Alexa Fluor 488 que detectou a região Fc humana dos mAb² anti-mCD137/PD-L1 ligados às células. As células positivas que tiveram um MFI maior que aquele de uma amostra de controle não colorizada foram identificadas como positivas para anti-mCD137/PD-L1 e os dados apresentados mostram a população positiva como uma porcentagem de **(A)** todas as células T CD8⁺ ou **(B)** todas as células T CD4⁺ do sangue, ou **(C)** todas as células T CD8⁺ ou **(D)** as células T CD4⁺ do tumor. Esses resultados mostram que mAb² anti-mCD137/PD-L1 rapidamente se ligou tanto às células T CD8⁺ quanto às células T CD4⁺ presentes tanto no tumor quanto no sangue, e que a porcentagem positiva da população de células T diminuiu ao longo do tempo depende do nível de dose.

[0061] A **Figura 25** mostra os dados de expressão de Ki67 por células T ex vivo, determinados por citometria de fluxo. Os valores de Intensidade de Fluorescência Média (MFI) foram medidos a partir de anticorpo anti-Ki67 conjugado com PE-Cy7 ligado às células. As células positivas que tiveram um MFI maior que aquele de uma amostra de controle não colorizada foram identificadas como positivas para expressão de Ki67 e os dados apresentados mostram a população positiva como uma porcentagem de **(A)** todas as células T CD8⁺ ou **(B)** todas as células T CD4⁺ do sangue, ou **(C)** todas as células T CD8⁺ ou **(D)** as células T CD4⁺ do tumor. Esses resultados mostram que as células T em camundongos dosados com mAb² anti-mCD137/PD-L1 rapidamente expressam Ki67 tanto em células T CD8⁺ quanto células T CD4⁺ no sangue e que uma alta porcentagem de células T positivas de Ki67 já estão presentes em uma amostra do microambiente tumoral. Um aumento na expressão de Ki67 ao

longo do tempo dependente do nível de dose foi observado.

[0062] A **Figura 26** mostra ocupação de receptor PD-L1 com relação a uma amostra compatível com tempo dos camundongos dosados com anticorpo de controle G1-AA/4420 que foi, então, aumentada com 100 nM de mAb² anti-mCD137/PD-L1 *ex vivo* para saturar todos os receptores PD-L1, desse modo, indicando um nível de ocupação de receptor PD-L1 de 100 % (símbolos de triângulo com linhas tracejadas). Os receptores PD-L1 livres foram detectados com o uso dos valores de Intensidade de Fluorescência Média (MFI) de um anticorpo anti-mPD-L1 concorrente conjugado com Bv605. As células positivas que tiveram um MFI maior que aquele de uma amostra de controle não colorizada foram identificadas como positivas para PD-L1 livre. Os resultados mostram a população positiva como uma porcentagem de ocupação de receptor PD-L1 em comparação com a amostra 100 % saturada de **(A)** células T CD8⁺ ou **(B)** células T CD4⁺ do sangue, ou **(C)** células T CD8⁺ ou **(D)** células T CD4⁺ do tumor. Esses resultados demonstram que a ocupação de receptor PD-L1 alcançou 100 % rapidamente no sangue antes de diminuir com o nível de dose ao longo do tempo. A ocupação de receptor PD-L1 em células T foi mantida por mais tempo no microambiente tumoral que no sangue.

[0063] A **Figura 27** mostra o perfil farmacocinético de mAb² anti-CD137/PD-L1 em 25, 10, 3 e 1 mg/kg após uma dose única intravenosa administrada a camundongos naïve C57BL/6. A concentração de mAb² CD137/PD-L1 nos camundongos ao longo do tempo é mostrada. A **Figura 27** demonstra que a taxa de liberação do mAb² anti-CD137/PD-L1 em cada dose é comparável a liberação de um IgG humano padrão em camundongos.

[0064] A **Figura 28** mostra que mAb² CD137/PD-L1 FS22-172-

003-AA/E12v2 anti-humano têm a capacidade para ativar células T em um ensaio de ativação de célula T de PBMC com o uso de (A) PBMCs de macaco cinomolgo ou (B) PBMCs humanas. A liberação de IFN- γ em um ensaio de PBMC foi testada na presença de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, anticorpo de controle positivo CD137 anti-humano G1-AA/MOR7480.1 (reticulado com um anticorpo CH2 anti-humano). Os mAb² mostraram atividade em ambos os ensaios e mostraram níveis de ativação maiores que o anticorpo de controle positivo, que indica que o bloqueio de PD-L1 e o agonismo de CD137 pela mesma molécula suscitam a maior ativação de célula T, provavelmente através do agrupamento com base em PD-L1 e ativação de CD137, tanto em macacos cinomolgo quanto humanos.

Descrição Detalhada

[0065] Aspectos e modalidades da presente invenção serão agora discutidos com referência às figuras anexas. Aspectos e modalidades adicionais serão evidentes àqueles elementos versados na técnica. Todos os documentos mencionados neste texto estão incorporados ao presente documento a título de referência.

[0066] A presente invenção se refere a moléculas de anticorpo que se ligam a PD-L1 e CD137. Especificamente, as moléculas de anticorpo da presente invenção compreendem um sítio de ligação um antígeno baseado em CDR para PD-L1 e um sítio de ligação um antígeno CD137 localizado em um domínio constante da molécula de anticorpo. Os termos "PD-L1" e "CD137" podem se referir a PD-L1 humano e CD137 humano, PD-L1 murino e CD137 murino, e/ou PD-L1 de macaco cinomolgo e CD137 de macaco cinomolgo, a menos que o contexto indique de outro modo. De preferência os termos "PD-L1" e "CD137" se

referem a PD-L1 humano e CD137 humano, a menos que o contexto exija de outro modo.

[0067] O termo "molécula de anticorpo" descreve uma imunoglobulina natural ou produzida parcial ou totalmente de modo sintético. A molécula de anticorpo pode ser humana ou humanizada, preferencialmente, humana. A molécula de anticorpo é, de preferência, uma molécula de anticorpo monoclonal. Exemplos de anticorpos são os isotipos de imunoglobulina, como imunoglobulina G, e suas subclasses isotípicas, como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, bem como fragmentos das mesmas. A molécula de anticorpo pode ser isolada, no sentido de ser livre de contaminantes, como anticorpos com a capacidade para se ligarem a outros polipeptídeos e/ou componentes séricos.

[0068] O termo "molécula de anticorpo", como usado no presente documento, desse modo, inclui fragmentos de anticorpo, contanto que os ditos fragmentos compreendam um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1 e um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio constante. A menos que o contexto exija de outro modo, o termo "molécula de anticorpo", conforme usado no presente documento, é, assim, equivalente a "molécula de anticorpo ou fragmento da mesma".

[0069] É possível considerar anticorpos monoclonais e outros e usar técnicas de tecnologia de DNA recombinante para produzir outros anticorpos ou moléculas quiméricas que retêm a especificidade do anticorpo original. Essas técnicas podem envolver introduzir as CDRs, ou regiões variáveis e/ou as sequências de domínio constante que fornecem o sítio de ligação um antígeno CD137, em uma imunoglobulina diferente.

A introdução das CDRs de uma imunoglobulina em outra imunoglobulina é descrita, por exemplo, no documento EP-A-184187, GB 2188638A ou EP-A-239400. Técnicas semelhantes podem ser empregadas para as sequências de domínio constante relevantes. Alternativamente, um hibridoma ou outra célula que produz uma molécula de anticorpo pode ser submetida a mutação genética ou outras mudanças, que podem ou não alterar a especificidade de ligação dos anticorpos produzidos.

[0070] Visto que os anticorpos podem ser modificados de várias maneiras, o termo "molécula de anticorpo" deve ser interpretado como abrangendo fragmentos de anticorpo, derivados, equivalentes funcionais e homólogos de anticorpos, incluindo qualquer polipeptídeo que compreenda um domínio de ligação de imunoglobulina, natural ou total ou parcialmente sintético. As moléculas quiméricas que compreendem um domínio de ligação de imunoglobulina, ou equivalente, fundidas a outro polipeptídeo estão, portanto, incluídas. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas nos documentos EP-A-0120694 e EP-A-0125023.

[0071] Um exemplo de um fragmento de anticorpo que compreende tanto sequências de CDR quanto domínio CH3 é um minicorpo, que compreende um scFv unido a um domínio CH3 (Hu et al. (1996), Cancer Res., 56(13):3055-61).

[0072] A molécula de anticorpo da presente invenção se liga a PD-L1 e CD137. A ligação nesse contexto pode se referir a uma ligação específica. O termo "específico" pode se referir à situação em que a molécula de anticorpo não mostrará qualquer ligação significativa a moléculas diferentes de sua parceira (ou suas parceiras) de ligação específica, no presente documento, PD-L1 e CD137. O termo

"específico" também é aplicável quando a molécula de anticorpo é específica para epítomos particulares, como epítomos em PD-L1 e CD137, que são portados por vários antígenos, nesse caso, a molécula de anticorpo será capaz de se ligar aos vários antígenos que portam o epítomo.

[0073] Os presentes inventores demonstraram que as moléculas de anticorpo descritas no presente documento mostraram um nível alto de especificidade para PD-L1 humano e não mostrou qualquer ligação significativa a outros PD-L1, CD80, PD-1 ou B7-H3 alvo de células T. Consulte o **Exemplo 9.3**. Desse modo, em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo não se liga, ou não mostra qualquer ligação significativa, a qualquer um, preferencialmente, todos, dentre PD-L2, CD80, PD-1 e B7-H3. Os presentes inventores também demonstraram que o sítio de ligação a antígeno CD137 não mostrou qualquer ligação significativa aos CD40, OX40 e GITR de receptores de TNFRSF humano. Consulte o **Exemplo 3.6**. Desse modo, em uma modalidade mais preferencial, a molécula de anticorpo não se liga, ou mostra qualquer ligação significativa, a qualquer um, preferencialmente, todos, dentre PD-L2, CD80, PD-1, B7-H3, CD40, OX40 e GITR.

[0074] Anticorpos e métodos para suas construções e usos são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Holliger & Hudson (2005). É possível considerar anticorpos monoclonais e outros e usar técnicas de tecnologia de DNA recombinante para produzir outros anticorpos ou moléculas quiméricas que retêm a especificidade do anticorpo original. Tais técnicas podem envolver introduzir CDRs ou regiões variáveis de uma molécula de anticorpo em uma molécula de anticorpo diferente (documentos EP-A-184187, GB 2188638A e

EP-A-239400).

[0075] Um sítio de ligação a antígeno à base de CDR é um sítio de ligação a antígeno em uma região variável de anticorpo. Um sítio de ligação a antígeno à base de CDR, pode ser formado por três CDRs, como as três CDRs de domínio variável de cadeia leve (VL) ou três CDRs de domínio variável de cadeia pesada (VH). Preferencialmente, o sítio de ligação a antígeno à base de CDR é formado por seis CDRs, três CDRs de VL e três CDRs de VH. As contribuições das CDRs diferentes com a ligação do antígeno podem variar em sítios de ligação do antígeno diferentes.

[0076] As três CDRs de domínio VH do sítio de ligação a antígeno podem estar localizadas em um domínio VH de imunoglobulina e as três CDRs de domínio VL podem estar localizadas em um domínio VL de imunoglobulina. Por exemplo, o sítio de ligação a antígeno à base de CDR pode estar localizado em uma região variável de anticorpo.

[0077] A molécula de anticorpo pode ter um ou, preferencialmente, mais que um, por exemplo dois, sítios de ligação do antígeno à base de CDR para o primeiro antígeno. A molécula de anticorpo, desse modo, pode compreender um domínio VH e um domínio VL, mas, preferencialmente, compreende dois domínios VH e dois domínios VL, isto é, dois pares de domínio VH/VL, como é o caso em moléculas de IgG de ocorrência natural, por exemplo.

[0078] O sítio de ligação a antígeno à base de CDR pode compreender as três CDRs de VH ou três CDRs de VL, preferencialmente, as três CDRs de VH e as três CDRs de VL, de anticorpo **E12v2**, **E05v2**, **G12v2** ou **1am-G02v3**, preferencialmente, anticorpo **E12v2**, **E05v2** ou **G12v2**, mais

preferencialmente, **E12v2** ou **E05v2**, com máxima preferência, **E12v2**.

[0079] As sequências de domínio VH e VL desses anticorpos são apresentadas como o seguinte:

- (i) as sequências de domínio VH e VL para anticorpo **E12v2** são mostradas na SEQ ID NOs **12** e **14**, respectivamente;
 - (ii) as sequências de domínio VH e VL para anticorpo **E05v2** são mostradas em SEQ ID NOs **23** e **25**, respectivamente;
 - (iii) as sequências de domínio VH e VL para anticorpo **G12v2** são mostradas em SEQ ID NOs **23** e **30**, respectivamente;
- e

- (iv) as sequências de domínio VH e VL para anticorpo **lam-G02v3** são mostradas em SEQ ID NOs **23** e **41**, respectivamente.

[0080] A pessoa versada na técnica não teria dificuldade em determinar as sequências das CDRs a partir das sequências de domínio VH e VL dos anticorpos apresentados acima. As sequências de CDR podem, por exemplo, ser determinadas de acordo com Kabat (Kabat, E.A et al. (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5º edição, Publicação NIH nº 91-3242. Departamento de Serviços de Saúde e Humanos dos EUA) ou o sistema internacional de informações ImMunoGeneTics (IMGT: Lefranc, M.-P. et al. *Nucleic Acids Res.* 43, D413-22 (2015)).

[0081] As sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de domínio VH da molécula de anticorpo, de acordo com a numeração Kabat, podem ser as sequências localizadas nas posições 31-35, 50-65 e 95-102 do domínio VH, respectivamente.

[0082] As sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de domínio VH da molécula de anticorpo, de acordo com a numeração IMGT, podem ser as sequências localizadas nas posições 27-38, 56-

65 e 105-117, do domínio VH da molécula de anticorpo, respectivamente.

[0083] As sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de domínio VL da molécula de anticorpo, de acordo com a numeração Kabat, podem ser as sequências localizadas nas posições 24-34, 50-56 e 89-97 do domínio VL, respectivamente.

[0084] As sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de domínio VL da molécula de anticorpo, de acordo com a numeração IMGT, podem ser as sequências localizadas nas posições 27-38, 56-65 e 105-117, do domínio VL, respectivamente.

[0085] A molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VH de **SYGIS** (SEQ ID NO: **1**), a CDR2 de domínio VH de **WISAYSGGTNYAQLQG** (SEQ ID NO: **2**), e a CDR3 de domínio VH de **DLFPTIFGVSYYYY** (SEQ ID NO: **3**) em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat.

[0086] Em modalidades preferenciais, a molécula de anticorpo compreende uma prolina na posição 28, de acordo com o esquema de numeração Kabat.

[0087] A molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VH de **GYX₁FTSYG** (SEQ ID NO: **45**), a CDR2 de domínio VH de **ISAYSGGT** (SEQ ID NO: **8**), e a CDR3 de domínio VH de **ARDLFPTIFGVSYYYY** (SEQ ID NO: **9**); em que **X₁** é P ou **T**, preferencialmente, em que **X₁** é P; e em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0088] A molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1, CDR2 e CDR3 de domínio VH de:

- (i) SEQ ID NOs **7**, **8** e **9**, respectivamente **[E12v2]**; ou
- (ii) SEQ ID NOs **21**, **8** e **9**, respectivamente **[E05v2, G12v2 ou**

1am-G02v3],

em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0089] As CDRs do domínio VH podem ser flanqueadas por sequências de estrutura (FW) (HFW1, HFW2, HFW3 e HFW4). O domínio VH pode compreender as sequências de HFW1, HFW2, HFW3 e HFW4 da SEQ ID NO: **51, 52, 53 e 54**, respectivamente, em que as sequências de FW e CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat. Alternativamente, o domínio VH pode compreender as sequências de HFW1, HFW2, HFW3 e HFW4 da SEQ ID NO: **55, 56, 57 e 54**, respectivamente, em que as sequências de FW e CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0090] A molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VL de **TGTSSDVGGYNYVS** (SEQ ID NO: **34**), a CDR2 de VL de **EVTNRPS** (SEQ ID NO: **35**), e a CDR3 de VL de **SSFKRGSTLVV** (SEQ ID NO: **36**); em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat. O domínio VL pode ser derivado de um domínio VL lambda. Por exemplo, cada uma dentre as CDRs de domínio VL pode ser flanqueada pelas sequências de estrutura (FW) (LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4) que são derivadas de um domínio VL lambda. Especificamente, o domínio VL pode compreender as sequências de LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4 da SEQ ID NO: **65, 66, 67 e 68**, respectivamente, em que as sequências de FW são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat.

[0091] A molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VL de **RASQSIX₂X₃RLA** (SEQ ID NO: **46**), a CDR2 de VL de **EASX₄X₅EX₆** (SEQ ID NO: **47**), e a CDR3 de VL de **QQSYSX₇PX₈X₉T** (SEQ ID NO: **48**);

em que **X₂** é **S** ou **G**, **X₃** é **N** ou **G**; **X₄** é **T** ou **N**; **X₅** é **S** ou **L**; **X₆** é **T** ou **S**; **X₇** é **T** ou **W**; **X₈** está ausente ou é **R**; **X₉** é **Y**, **R** ou **V**; e

em que as sequências de CDR e numeração de posição são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat.

[0092] Preferencialmente, a molécula de anticorpo compreende a sequência da CDR1 de domínio VH de **RASQSIGNRLA** (SEQ ID NO: **4**), a CDR2 de VL de **EASTSET** (SEQ ID NO: **5**), e a CDR3 de VL de **QQSYSTPYT** (SEQ ID NO: **6**) em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat. O domínio VL pode ser derivado de um domínio VL kappa. Por exemplo, cada uma dentre as CDRs de domínio VL podem ser flanqueadas pelas sequências de estrutura (FW) (LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4) que são derivadas de um domínio VL kappa. Especificamente, o domínio VL pode compreender as sequências de LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4 da SEQ ID NO: **58**, **59**, **60** e **61**, respectivamente, em que as sequências de FW são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat.

[0093] Por exemplo, a molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VL, CDR2 e CDR3 de:

- (i) SEQ ID NOs **4**, **5** e **6**, respectivamente **[E12v2]**;
 - (ii) SEQ ID NOs **18**, **19** e **20**, respectivamente **[E05v2]**;
 - (iii) SEQ ID NOs **18**, **19** e **29**, respectivamente **[G12v2]**;
- ou
- (iv) SEQ ID NOs **34**, **35** e **36**, respectivamente **[1am-G02v3]**,

em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração Kabat.

[0094] A molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VL de **SSDVGGYNY** (SEQ ID NO:

37), a CDR2 de VL de **EVT** (SEQ ID NO: **38**), e a CDR3 de VL de **SSFKRGSTLVV** (SEQ ID NO: **36**), em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT. O domínio VL pode ser derivado de um domínio VL lambda. Por exemplo, cada uma dentre as CDRs de domínio VL pode ser flanqueada pelas sequências de estrutura (FW) (LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4) que são derivadas de um domínio VL lambda. Especificamente, o domínio VL pode compreender as sequências de LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4 da SEQ ID NO: **69, 70, 71 e 68**, respectivamente, em que as sequências de FW são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0095] Alternativamente, a molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VL de **QSIX₁₀X₁₁R** (SEQ ID NO: **49**), a CDR2 de VL de **EAS** (SEQ ID NO: **11**), e a CDR3 de VL de **QQSYSX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅T** (SEQ ID NO: **50**);

em que **X₁₀** é **G** ou **S**; **X₁₁** é **N** ou **G**; **X₁₂** está ausente ou é **T**; **X₁₃** é **T, W** ou **P**; **X₁₄** é **P** ou **R**; **X₁₅** é **Y** ou **R**; e

em que as sequências de CDR e numeração de posição são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0096] Preferencialmente, a molécula de anticorpo compreende a sequência da CDR1 de domínio VH de **QSIGNR** (SEQ ID NO: **10**), a CDR2 de VL de **EAS** (SEQ ID NO: **11**), e a CDR3 de VL de **QQSYSTPYT** (SEQ ID NO: **6**), em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT. O domínio VL pode ser derivado de um domínio VL kappa. Por exemplo, cada uma dentre as CDRs de domínio VL podem ser flanqueadas pelas sequências de estrutura (FW) (LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4) que são derivadas de um domínio VL kappa. Especificamente, o domínio VL pode compreender as sequências de LFW1, LFW2, LFW3 e LFW4 da SEQ ID NO: **62, 63, 64 e 61**,

respectivamente, em que as sequências de FW são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0097] Por exemplo, a molécula de anticorpo pode compreender a sequência da CDR1 de domínio VL, CDR2 e CDR3 de:

- (i) SEQ ID NOs **10, 11 e 6**, respectivamente **[E12v2]**;
 - (ii) SEQ ID NOs **22, 11 e 20**, respectivamente **[E05v2]**;
 - (iii) SEQ ID NOs **22, 11 e 29**, respectivamente **[G12v2]**;
- ou
- (iv) SEQ ID NOs **37, 38 e 36**, respectivamente **[1am-G02v3]**,

em que as sequências de CDR são definidas de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0098] O sítio de ligação a antígeno à base de CDR pode compreender os domínios VH ou VL, preferencialmente, os domínios VH e VL, de anticorpo **E12v2, E05v2, G12v2** ou **1am-G02v3**, preferencialmente, anticorpo **E12v2, E05v2** ou **G12v2**, mais preferencialmente, **E12v2** ou **E05v2**, com máxima preferência, **E12v2**.

[0099] O domínio VH de anticorpos **E12v2, E05v2, G12v2** e **1am-G02v3** pode ter a sequência apresentada em SEQ ID NOs **12, 23, 23 e 23**, respectivamente. O domínio VL de anticorpos **E12v2, E05v2, G12v2** e **1am-G02v3** pode ter a sequência apresentada em SEQ ID NOs **14, 25, 30 e 41**, respectivamente.

[0100] A molécula de anticorpo da invenção compreende um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio constante da molécula de anticorpo. O domínio constante pode ser um domínio CL, CH1, CH2, CH3 ou CH4, preferencialmente um domínio constante é um domínio CH1, CH2 ou CH3, mais preferencialmente, um domínio CH2 ou CH3, com máxima preferência, um domínio CH3. O sítio de ligação a antígeno

CD137 compreende uma ou mais alças estruturais modificadas em um domínio constante da molécula de anticorpo. A modificação genética de alças estruturais de domínio constante de anticorpo para criar sítios de ligação do antígeno para antígenos-alvo é conhecida na técnica e é descrita, por exemplo, em Wozniak-Knopp G *et al.* (2010); documentos WO2006/072620 e WO2009/132876.

[0101] O sítio de ligação a antígeno CD137 da molécula de anticorpo pode compreender uma primeira e uma segunda sequências, preferencialmente, uma primeira e uma segunda sequências, em que a primeira e a segunda sequências estão localizadas nas alças estruturais de AB e EF de um domínio constante, preferencialmente, o domínio CH3, da molécula de anticorpo, respectivamente.

[0102] Em uma modalidade preferencial, os resíduos nas posições 95 e 96 do domínio CH3 da molécula de anticorpo são do tipo selvagem, isto é, são, preferencialmente, arginina (R) e triptofano (W), respectivamente. Ambos esses resíduos estão localizados na alça estrutural EF. As posições de resíduo de aminoácido são numeradas no presente documento, de acordo com o esquema de numeração ImMunoGeneTics (IMGT), salvo caso indicação contrária. O esquema de numeração IMGT é descrito em Lefranc *et al.*, 2005.

[0103] A primeira sequência compreende preferencialmente a sequência de PPY (SEQ ID NO: **78**).

[0104] A sequência de PPY pode estar localizada entre as posições 10 e 19, preferencialmente, posições 15 e 17 do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Em uma modalidade preferencial, a sequência de PPY está localizada nas posições 16, 16,5 e 16,4 do domínio CH3. Alternativamente, a sequência

de PPY pode estar localizada entre as posições 16 e 17 do domínio CH3. Em uma modalidade alternativa preferencial, a sequência de PPY está localizada nas posições 16,3, 16,2 e 16,1 do domínio CH3. No esquema de numeração IMGT, os resíduos inseridos são numerados de acordo com a direção da alça na qual os mesmos estão localizados. Se a alça for “para cima” os resíduos inseridos assumem o número do resíduo que precede imediatamente a inserção com o número do resíduo inserido na sequência que é indicada por número decimal ascendente, por exemplo, 16, 16,1, 16,2, 16,3, em que há três mutações após o resíduo 16. Se a alça for “para baixo”, os resíduos inseridos assumem o número do resíduo que precede imediatamente a inserção com o número do resíduo inserido na sequência que é indicada por número decimal decrescente, por exemplo, 16, 16,3, 16,2, 16,1, em que novamente há três mutações com resíduo 16 (LeFranc et al., 2005, e LeFranc et al. 2015).

[0105] Em uma modalidade preferencial, a alça estrutural de AB compreende uma inserção de aminoácido. A inserção pode ser de 1 a 10, 2 a 9, 3 a 7, 4 a 6 ou 5 aminoácidos em comprimento. Preferencialmente, a inserção é de 5 aminoácidos em comprimento.

[0106] A inserção pode estar localizada entre as posições 10 e 19, preferencialmente, entre as posições 14 e 17, mais preferencialmente, entre as posições 16 e 17 do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Em uma modalidade preferencial, a inserção está localizada nas posições 16,5 a 16,1 do domínio CH3 da molécula de anticorpo. A **Figura 1** mostra Fcabs que compreendem um domínio CH3 em que a inserção está localizada nas posições 16,5 a 16,1 do domínio CH3.

[0107] A maior parte dos Fcabs identificados após a maturação de afinidade compreendeu um resíduo de leucina (L) na posição 97 do domínio CH3. Muitos desses Fcabs também compreenderam um resíduo de ácido aspártico (D) ou resíduo de ácido glutâmico (E) nas posições 98 do domínio CH3. Ambas essas alterações de aminoácido estão localizadas na alça estrutural EF. Esses resultados sugerem que um ou ambos desses resíduos podem ser importantes para ligação de CD137. Desse modo, a segunda sequência compreende preferencialmente a sequência de LD ou LE, em que a sequência de LD ou LE está, preferencialmente, localizada nas posições 97 e 98 do domínio CH3 da molécula de anticorpo.

[0108] A primeira sequência e a segunda sequência podem ser uma primeira e uma segunda sequências do domínio CH3 de: **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053,** preferencialmente, **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017** ou **FS22-053-014,** mais preferencialmente, **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011** ou **FS22-053-017,** ainda mais preferencialmente, membro de ligação específica **FS22-053-008.**

[0109] A primeira sequência e a segunda sequência podem ser uma primeira e uma segunda sequências do domínio CH3 de: **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006** ou **FS22-172,** preferencialmente, **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-172-003,**

FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005 ou FS22-172-006, mais preferencialmente, **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-172-003, FS22-172-002 ou FS22-172-004**, ainda mais preferencialmente, **FS22-053-008 ou FS22-172-003**, ainda mais preferencialmente, **FS22-172-003**. Em uma modalidade preferencial alternativa, a primeira sequência e a segunda sequência podem ser uma primeira e uma segunda sequências do domínio CH3 de **FS22-053-017**.

[0110] A sequência de domínio CH3 de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006 e FS22-172**, é apresentada em SEQ ID NOs: 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 115, 118, 121, 124, 127, 130 e 132, respectivamente.

[0111] A primeira e a segunda sequências de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006 e FS22-172** pode ser a sequência entre as posições 14 e 17, e posições 91 e 99, do domínio CH3 de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006 e FS22-172**, respectivamente.

[0112] Alternativamente, a primeira e a segunda sequências de **FS22-053-008, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012 e FS22-053-016** podem ser a sequência entre as

posições 14 e 17, e posições 92 e 99, do domínio CH3 de **FS22-053-008, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012 e FS22-053-016**, respectivamente.

[0113] A primeira e a segunda sequências de **FS22-053-015** podem ser alternativamente a sequência entre as posições 14 e 17, e posições 92 e 98, do domínio CH3 de **FS22-053-015**, respectivamente.

[0114] A sequência de alça de CD da molécula de anticorpo é, preferencialmente, não modificada, isto é, do tipo selvagem. A sequência de alça de CD, portanto, tem preferencialmente a sequência apresentada em SEQ ID NO: **73**. A sequência de alça de CD está, preferencialmente, localizada nas posições 43 a 78 do domínio CH3.

[0115] A primeira e a segunda sequências podem ser as sequências de alça estrutural de AB e EF completas, de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006 ou FS22-172**, respectivamente. A determinação da localização das alças estruturais de AB, CD e EF em uma sequência de domínio CH3, por exemplo, de acordo com os sistemas de numeração IMGT, éxon IMGT, EU ou Kabat, está dentro das capacidades do elemento versado na técnica e é descrita em Hasenhindl *et al.* (2013). Em uma modalidade preferencial, as alças estruturais de AB, CD e EF, de acordo com o sistema de numeração IMGT, estão localizadas entre as posições 10 e 19, 42 e 79, e 91 e 102 do domínio CH3, respectivamente. Em uma modalidade preferencial, as primeira, segunda e terceira sequências são, portanto, a sequência entre as posições 10

e 19, 42 e 79, e 91 e 102 do domínio CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-009**, **FS22-053-011**, **FS22-053-017**, **FS22-053-014**, **FS22-053-010**, **FS22-053-012**, **FS22-053-013**, **FS22-053-015**, **FS22-053-016**, **FS22-053**, **FS22-172-003**, **FS22-172-002**, **FS22-172-004**, **FS22-172-001**, **FS22-172-005**, **FS22-172-006** ou **FS22-172**, respectivamente.

[0116] Desse modo, em uma modalidade preferencial, a primeira e a segunda sequências do sítio de ligação a antígeno CD137 compreendem a sequência de alça de AB e EF apresentada em SEQ ID NOs **171** e **172** [**FS22-172-003**], respectivamente, ou a sequência de alça estrutural de AB e EF apresentada em SEQ ID NOs **173** e **174** [**FS22-53-008**], respectivamente. Em uma modalidade mais preferencial, a primeira e a segunda sequências do sítio de ligação a antígeno CD137 compreendem a alça estrutural de AB e EF apresentada em SEQ ID NOs **171** e **172** [**FS22-172-003**], respectivamente.

[0117] Em uma modalidade preferencial alternativa, a primeira e a segunda sequências do sítio de ligação a antígeno CD137 compreendem a sequência de alça estrutural de AB e EF apresentada em SEQ ID NOs **173** e **175** [**FS22-053-017**], respectivamente.

[0118] Em uma modalidade preferencial, o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende uma primeira e/ou uma segunda, preferencialmente a primeira e a segunda sequências apresentadas em:

- (i) SEQ ID NOs 79 e 80, respectivamente [**FS22-053-008**];
- (ii) SEQ ID NOs 79 e 83, respectivamente [**FS22-053-009**];
- (iii) SEQ ID NOs 79 e 86, respectivamente [**FS22-053-**

011];

(iv) SEQ ID NOs 79 e 89, respectivamente [**FS22-053-017];**

(v) SEQ ID NOs 79 e 92, respectivamente [**FS22-053-014];**

(vi) SEQ ID NOs 79 e 95, respectivamente [**FS22-053-010];**

(vii) SEQ ID NOs 79 e 98, respectivamente [**FS22-053-012];**

(viii) SEQ ID NOs 79 e 101, respectivamente [**FS22-053-013];**

(ix) SEQ ID NOs 79 e 104, respectivamente [**FS22-053-015];**

(x) SEQ ID NOs 79 e 107, respectivamente [**FS22-053-016];**

(xi) SEQ ID NOs 79 e 110, respectivamente [**FS22-053];**

(xii) SEQ ID NOs 113 e 114, respectivamente [**FS22-172-003];**

(xiii) SEQ ID NOs 117 e 114, respectivamente [**FS22-172-002];**

(xiv) SEQ ID NOs 120 e 114, respectivamente [**FS22-172-004];**

(xv) SEQ ID NOs 123 e 114, respectivamente [**FS22-172-001];**

(xvi) SEQ ID NOs 126 e 114, respectivamente [**FS22-172-005];**

(xvii) SEQ ID NOs 129 e 114, respectivamente [**FS22-172-006];** ou

(xviii) SEQ ID NOs 129 e 114, respectivamente [**FS22-172];** em que a primeira e a segunda sequências são, preferencialmente, localizadas entre as posições 14 e 17, e

91 e 99 do domínio CH3 da molécula de anticorpo, respectivamente.

[0119] Em uma modalidade ainda mais preferencial, a molécula de anticorpo compreende a primeira e/ou a segunda, preferencialmente, a primeira e a segunda sequências apresentadas em:

- (i) SEQ ID NOs 79 e 80, respectivamente **[FS22-053-008]**;
- (ii) SEQ ID NOs 79 e 83, respectivamente **[FS22-053-009]**;
- (iii) SEQ ID NOs 79 e 86, respectivamente **[FS22-053-011]**;
- (iv) SEQ ID NOs 79 e 89, respectivamente **[FS22-053-017]**;
- (v) SEQ ID NOs 113 e 114, respectivamente **[FS22-172-003]**;
- (vi) SEQ ID NOs 117 e 114, respectivamente **[FS22-172-002]**; ou
- (vii) SEQ ID NOs 120 e 114, respectivamente **[FS22-172-004]**.

[0120] Em uma modalidade ainda mais preferencial, o sítio de ligação a antígeno CD137 da molécula de anticorpo compreende a primeira e a segunda sequências apresentadas em SEQ ID NOs **113** e **114** **[FS22-172-003]**, respectivamente, ou a primeira e a segunda sequências apresentadas em SEQ ID NOs **79** e **80** **[FS22-53-008]**, respectivamente. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o sítio de ligação a antígeno CD137 da molécula de anticorpo compreende a primeira e a segunda sequências apresentadas em SEQ ID NOs **113** e **114** **[FS22-172-003]**, respectivamente. Por exemplo, o sítio de ligação a antígeno CD137 pode compreender as sequências de alça

estrutural de AB e EF apresentadas em SEQ ID NOS **171** e **172** [**FS22-172-003**], respectivamente.

[0121] Em uma modalidade, a molécula de anticorpo, em particular, uma molécula de anticorpo que compreende a primeira e/ou a segunda, preferencialmente, a primeira e a segunda, sequência apresentada em SEQ ID NO: **129** e **114** [**FS22-172-006**], pode compreender uma leucina (L) na posição 19 do domínio CH3 da molécula de anticorpo.

[0122] Como uma alternativa à numeração IMGT, as posições de resíduo de aminoácido, que incluem a posição de sequências de aminoácido, substituições, deleções e inserções, como descrito no presente documento, podem ser numeradas de acordo com numeração éxon IMGT (também denominada numeração consecutiva), numeração EU, ou numeração Kabat. A concordância entre numeração IMGT, numeração éxon IMGT, numeração EU, e numeração Kabat do posições de resíduo do domínio CH3 são mostradas na **Figura 1**. Desse modo, por exemplo, em que o presente pedido se refere à primeira sequência que está localizada entre as posições 14 e 17 do domínio CH3 do clone, respectivamente, em que as posições de resíduo são numeradas de acordo com o esquema de numeração IMGT, a primeira sequência está localizada entre as posições 18 e 21 do domínio CH3, em que as posições de resíduo são numeradas de acordo com o esquema de numeração éxon IMGT, como mostrado na **Figura 1**. Alternativamente, a posição de aminoácido resíduos no domínio CH3, que inclui a posição de sequências de aminoácido, substituições, deleções e inserções no domínio CH3, como descrito no presente documento, pode ser definida por referência a sua posição na sequência do tipo selvagem de domínio CH3 apresentada em **SEQ**

ID NO: 75. A concordância entre numeração IMGT e a sequência do tipo selvagem de domínio CH3 também é mostrada na **Figura 1**.

[0123] Em uma modalidade, a molécula de anticorpo compreende um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência de domínio CH3 de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006** ou **FS22-172**, em que a sequência de domínio CH3 de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006**, e **FS22-172** é apresentada em SEQ ID NOS **81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 115, 118, 121, 124, 127, 130** e **132**, respectivamente.

[0124] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo compreende um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência de domínio CH3 de **FS22-172-003** ou **FS22-053-008** apresentada em SEQ ID NO **115** e **81**, respectivamente. Em uma modalidade mais preferencial, a molécula de anticorpo compreende um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência de domínio CH3 de **FS22-172-003** apresentada em SEQ ID NO **115**.

[0125] Em uma modalidade preferencial alternativa, a molécula de anticorpo compreende um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência de domínio CH3 de **FS22-053-017** apresentada em SEQ ID NO **90**, respectivamente.

[0126] O domínio CH3 da molécula de anticorpo pode opcionalmente compreender um resíduo de lisina adicional (K) na C-terminal imediato da sequência de domínio CH3.

[0127] Além disso, a molécula de anticorpo da invenção pode compreender um domínio CH2 de uma molécula de imunoglobulina G, como um domínio CH2 de uma molécula de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. De preferência a molécula de anticorpo da invenção compreende um domínio CH2 de uma molécula de IgG1. O domínio CH2 pode ter a sequência apresentada em SEQ ID NO: **76**.

[0128] O domínio CH2 é conhecido por se ligar aos receptores Fcγ e complemento. A ligação do domínio CH2 aos receptores Fcγ é exigida por citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), enquanto a ligação ao complemento é exigida por citotoxicidade dependente de complemento (CDC). O domínio CH2 da molécula de anticorpo preferencialmente compreendem uma ou mais mutações que reduzem ou anulam a ligação do domínio CH2 a um ou mais receptores Fcγ, como FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII, e/ou a um complemento. Os inventores postularam que reduzir ou anular a ligação aos receptores Fcγ diminuirá ou eliminará ADCC mediado pela molécula de anticorpo. De modo similar, espera-se que reduzir ou anular a ligação ao complemento reduza ou elimine CDC mediado pela molécula de anticorpo. Sem desejar estar vinculado por teoria, espera-se que esse reduza ou evite a toxicidade de fígado quando a molécula de anticorpo for administrada a um paciente. Além disso, espera-se que reduzir ou anular a ligação aos receptores Fcγ seja útil, em que a molécula de anticorpo compreende um segundo sítio de ligação a antígeno para um antígeno de célula imune,

em que a morte de ADCC e/ou CDC mediado de células imunológicas ligadas pela molécula de anticorpo deve ser evitado. As mutações para diminuir ou anular a ligação do domínio CH2 a um ou mais receptores Fcγ e/ou complemento são conhecidas na técnica (Wang *et al.*, 2018). Essas mutações incluem a "mutação LALA" descrita em Bruhns *et al.*, 2009 e Hezareh *et al.*, 2001, que envolve a substituição dos resíduos de leucina nas posições 1,3 e 1,2 do domínio CH2 com alanina (L1.3A e L1.2A). Alternativamente, a geração de anticorpos de a-glicosila através de mutação do sítio de glicosilação ligado por N conservado mutando-se a asparagina (N) na posição 84,4 do domínio CH2 para alanina, glicina ou glutamina (N84.4A, N84.4G ou N84.4Q) também é conhecida por diminuir a função efector de IgG1 (Wang *et al.*, 2018). Como uma alternativa adicional, a ativação de complemento (ligação de C1q) e ADCC são conhecidos por serem reduzidos através de mutação da prolina na posição 114 do domínio CH2 para alanina ou glicina (P114A ou P114G) (Idusogie *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2016). Essas mutações também podem ser combinadas a fim de gerar moléculas de anticorpo com atividade de ADCC ou CDC adicionalmente reduzida ou nenhuma atividade.

[0129] Desse modo, a molécula de anticorpo pode compreender um domínio CH2, em que o domínio CH2 compreende preferencialmente:

- (i) resíduos de alanina nas posições 1,3 e 1,2; e/ou
 - (ii) uma alanina ou glicina na posição 114; e/ou
 - (iii) uma alanina, glutamina ou glicina na posição 84,4;
- em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0130] Em uma modalidade preferencial, a molécula de

anticorpo compreende um domínio CH2, em que o domínio CH2 compreende:

- (i) um resíduo de alanina na posição 1.3; e
- (ii) um resíduo de alanina na posição 1.2;

em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0131] Por exemplo, o domínio CH2 pode ter a sequência apresentada em SEQ ID NO: **77**.

[0132] Em uma modalidade alternativa preferencial, a molécula de anticorpo compreende um domínio CH2, em que o domínio CH2 compreende:

- (i) um resíduo de alanina na posição 1.3;
- (ii) um resíduo de alanina na posição 1.2; e
- (iii) uma alanina na posição 114;

em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

[0133] Por exemplo, o domínio CH2 pode ter a sequência apresentada em SEQ ID NO: **176**.

[0134] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

(a) um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende as três CDRs de VH e três CDRs de VL (CDRs 1-6) de anticorpo **E12v2**, **E05v2**, ou **G12v2**, preferencialmente **E12v2**; e

em que o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende a primeira sequência e a segunda sequência localizadas nas

alças estruturais de AB e EF do domínio CH3, respectivamente; em que a primeira e a segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114** [**FS22-172-003**], ou **79** e **80** [**FS22-53-008**], respectivamente, preferencialmente, em que a primeira e a segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114** [**FS22-172-003**].

[0135] Como descrito nos Exemplos, uma molécula de anticorpo que tem um sítio de ligação a antígeno CD137 que compreende a primeira sequência e a segunda sequência apresentadas em SEQ ID NOs **79** e **89**, respectivamente [**FS22-053-017**] teve a capacidade para ligar CD137 humano, de cinomolgo e, inesperadamente, de camundongo. Os inventores demonstraram que essa molécula de anticorpo teve atividade nos ensaios de ativação de célula T humana, de cinomolgo e de camundongo quando reticulada.

[0136] Em uma modalidade preferencial alternativa, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

(a) um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende as três CDRs de VH e três CDRs de VL (CDRs 1-6) de anticorpo **E12v2**, **E05v2**, ou **G12v2**, preferencialmente **E12v2**; e

em que o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende a primeira sequência e a segunda sequência localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3, respectivamente, em que a primeira e a segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **79** e **89** [**FS22-053-017**].

[0137] Em algumas modalidades, a molécula de anticorpo compreende

(a) um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende as três CDRs de VH e três CDRs de VL (CDRs 1-6) de anticorpo **E12v2**, **E05v2**, ou **G12v2**, preferencialmente **E12v2**; e

em que o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende a primeira sequência e a segunda sequência localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3, respectivamente, em que a primeira e a segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114 [FS22-172-003]**, ou **79** e **80 [FS22-53-008]**, respectivamente, preferencialmente em que a primeira e a segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113** e **114 [FS22-172-003]**, contanto que a molécula de anticorpo não compreenda as CDRs 1-6 de anticorpo **G12v2** pareadas com o sítio de ligação a antígeno CD137 que tem a primeira e a segunda sequências apresentadas em SEQ ID NOs **79** e **80 [FS22-053-008]**.

[0138] Em uma modalidade adicional preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

(a) um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência apresentada em SEQ ID NOs **115 [FS22-172-003]** ou **81 [FS22-53-008]**, preferencialmente, SEQ ID NO **115 [FS22-172-003]**;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende as três CDRs de VH e três CDRs de VL (CDRs 1-6) de anticorpo **E12v2**, **E05v2**, ou **G12v2**, preferencialmente, **E12v2**.

[0139] Em uma modalidade adicional preferencial alternativa, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

(a) um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência apresentada em SEQ ID NOs **90 [FS22-053-017]**;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende as três CDRs de VH e três CDRs de VL (CDRs 1-6) de anticorpo **E12v2**, **E05v2**, ou **G12v2**, preferencialmente, **E12v2**.

[0140] Em uma modalidade ainda adicional preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

(a) um domínio VH e um domínio VL que compreende o sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência apresentada em SEQ ID NOs **115 [FS22-172-003]** ou **81 [FS22-53-008]**, preferencialmente, SEQ ID NO **115 [FS22-172-003]**;

em que um domínio VH e VL compreende, tem ou consiste no VH e VL de anticorpo **E12v2**, **E05v2** ou **G12v2**, preferencialmente **E12v2**.

[0141] Em uma modalidade ainda adicional preferencial alternativa, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

(a) um domínio VH e um domínio VL que compreende o sítio

de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1; e

(b) um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência apresentada em SEQ ID NOs **90 [FS22-053-017]**;

em que um domínio VH e VL compreende, tem ou consiste no VH e VL de anticorpo **E12v2, E05v2 ou G12v2**, preferencialmente **E12v2**.

[0142] Em uma modalidade ainda adicional preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende -

(a) um domínio VH e um domínio VL que compreende o sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1;

(b) um domínio CH3 que compreende, tem ou consiste na sequência apresentada em SEQ ID NOs **115 [FS22-172-003]** ou **81 [FS22-53-008]**, preferencialmente, SEQ ID NO **115 [FS22-172-003]**;

(c) um domínio CH2 que compreende, tem ou consiste na sequência apresentada em SEQ ID NO: **76**, em que o domínio CH2 compreende:

(i) um resíduo de alanina na posição 1.3;

(ii) um resíduo de alanina na posição 1.2;

em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT; e

em que um domínio VH e VL compreende, tem ou consiste no VH e VL de anticorpo **E12v2, E05v2 ou G12v2**, preferencialmente **E12v2**.

[0143] Em uma modalidade adicional, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende:

(a) um domínio VH e VL que compreende um sítio de ligação a antígeno à base de CDR para PD-L1, em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende CDRs 1-6; e

(b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo, o sítio de ligação a antígeno CD137 que compreende a primeira sequência e a segunda sequência localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3;

em que as CDRs 1-6, a primeira sequência e a segunda sequência têm a sequência apresentada em:

(i) SEQ ID NOS **1, 2, 3, 4, 5, 6, 113 e 114**, respectivamente **[FS22-172-003-AA/E12v2]**;

(ii) SEQ ID NOS **1, 2, 3, 18, 19, 20, 113 e 114**, respectivamente **[FS22-172-003-AA/E05v2]**;

(iii) SEQ ID NOS **1, 2, 3, 18, 19, 29, 113 e 114**, respectivamente **[FS22-172-003-AA/G12v2]**;

(iv) SEQ ID NOS **1, 2, 3, 4, 5, 6, 79 e 80**, respectivamente **[FS22-053-008-AA/E12v2]**; ou

(v) SEQ ID NOS **1, 2, 3, 18, 19, 20, 79 e 80**, respectivamente **[FS22-053-008-AA/E05v2]**,

ou

em que o domínio VH, domínio VL, primeira sequência e segunda sequência têm a sequência apresentada em:

(i) SEQ ID NOS **12, 14, 113 e 114**, respectivamente **[FS22-172-003-AA/E12v2]**;

(ii) SEQ ID NOS **23, 25, 113 e 114**, respectivamente **[FS22-172-003-AA/E05v2]**;

(iii) SEQ ID NOS **23, 30, 113 e 114**, respectivamente **[FS22-172-003-AA/G12v2]**;

(iv) SEQ ID NOS **12, 14, 79 e 80**, respectivamente **[FS22-053-008-AA/E12v2]**; ou

(v) SEQ ID NOS **23, 25, 79 e 80**, respectivamente **[FS22-053-008-AA/E05v2]**; ou

em que o domínio VH, domínio VL e domínio CH3 têm a sequência apresentada em:

- (i) SEQ ID NOS **12, 14, e 115**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E12v2**];
- (ii) SEQ ID NOS **23, 25, e 115**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E05v2**];
- (iii) SEQ ID NOS **23, 30, e 115**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/G12v2**];
- (iv) SEQ ID NOS **12, 14, e 81**, respectivamente [**FS22-053-008-AA/E12v2**]; ou
- (v) SEQ ID NOS **23, 25, e 81**, respectivamente [**FS22-053-008-AA/E05v2**].

[0144] Em uma modalidade ainda adicional preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende uma cadeia pesada que compreende, tem ou consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo:

- (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOS **134 e 17**, respectivamente;
- (ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOS **137 e 28**, respectivamente;
- (iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOS **140 e 33**, respectivamente;
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOS **143 e 17**, respectivamente;
- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOS **146 e 28**, respectivamente; ou
- (vi) **FS22-053-008-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOS **149 e 33**, respectivamente.

[0145] Em uma modalidade ainda mais preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende

uma cadeia pesada que compreende, tem ou consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo:

- (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **134 e 17**, respectivamente;
- (ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **137 e 28**, respectivamente;
- (iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **140 e 33**, respectivamente;
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **143 e 17**, respectivamente; ou
- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **146 e 28**, respectivamente.

[0146] Em uma modalidade ainda mais preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende uma cadeia pesada que compreende, tem ou consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo:

- (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **134 e 17**, respectivamente; ou
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **143 e 17**, respectivamente.

[0147] Em uma modalidade ainda mais preferencial, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende uma cadeia pesada que compreende, tem ou consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **134 e 17**, respectivamente.

[0148] Em uma modalidade ainda adicional preferencial alternativa, a molécula de anticorpo que se liga ao PD-L1 e CD137 compreende uma cadeia pesada que compreende, tem ou consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo:

- (i) **FS22-053-017-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **152 e**

17, respectivamente;

(ii) **FS22-053-017-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **153 e 28**, respectivamente; ou

(iii) **FS22-053-017-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **154 e 33**, respectivamente.

[0149] As moléculas de anticorpo da presente invenção também podem compreender variantes de uma primeira, segunda ou terceira sequência, sequência de alça estrutural de AB, CD ou EF, sequências de domínio CH3, domínio CH2, domínio CH2 e CH3, CDR, FW, domínio VH, domínio VL, cadeia leve e/ou cadeia pesada reveladas no presente documento. Variantes adequadas podem ser obtidas por meio de métodos de alteração de sequência, ou mutação e triagem. Em uma modalidade preferencial, uma molécula de anticorpo que compreende uma ou mais sequências variantes mantém uma ou mais das características funcionais da molécula de anticorpo parental, como especificidade de ligação e/ou afinidade de ligação com PD-L1 e CD137. Por exemplo, uma molécula de anticorpo que compreende uma ou mais sequências variantes de preferência se liga a PD-L1 e/ou CD137 com a mesma afinidade, ou com uma afinidade maior, do que a molécula de anticorpo (parental). A molécula de anticorpo parental é uma molécula de anticorpo que não compreende a inserção (ou inserções), deleção (ou deleções) e/ou substituição (ou substituições) de aminoácido que foram incorporadas na molécula de anticorpo variante.

[0150] Por exemplo, uma molécula de anticorpo da invenção pode compreender uma primeira, segunda ou terceira sequência, sequência de alça estrutural de AB, CD ou EF, sequência de domínio CH3, domínio CH2, domínio CH2 e CH3,

CDR, FW, domínio VH, domínio VL, cadeia leve e/ou cadeia pesada que tem pelo menos 70 %, pelo menos 75 %, pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 %, pelo menos 99,1 %, pelo menos 99,2 %, pelo menos 99,3 %, pelo menos 99,4 %, pelo menos 99,5 %, pelo menos 99,6 %, pelo menos 99,7 %, pelo menos 99,8 %, ou pelo menos 99,9 % de identidade de sequência com uma sequência de alça estrutural, domínio CH3, domínio CH2, domínio CH2 e CH3, CDR, FW, domínio VH, domínio VL, cadeia leve ou cadeia pesada revelada no presente documento.

[0151] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo da invenção compreende uma sequência de domínio CH3 que tem pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 %, pelo menos 99,1 %, pelo menos 99,2 %, pelo menos 99,3 %, pelo menos 99,4 %, pelo menos 99,5 %, pelo menos 99,6 %, pelo menos 99,7 %, pelo menos 99,8 %, ou pelo menos 99,9 % de identidade de sequência com a sequência de domínio CH3 apresentada em SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]** ou **81 [FS22-053-008]**, preferencialmente SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**.

[0152] Em uma modalidade adicional preferencial, a molécula de anticorpo tem ou compreende uma sequência de domínio CH2, que tem pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 %, pelo menos 99,1 %, pelo menos 99,2 %, pelo menos 99,3 %, pelo menos 99,4 %, pelo menos 99,5 %, pelo menos 99,6 %, pelo menos 99,7 %, pelo menos 99.8 %, ou pelo menos 99,9 % de identidade de sequência com a sequência de domínio CH2 apresentada em SEQ ID NO: **76** ou **77**.

[0153] A identidade de sequência é comumente definida com

referência ao algoritmo GAP (pacote GCG Wisconsin, Accelrys Inc, San Diego, EUA). GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch para alinhar duas sequências completas que maximiza o número de correspondências e minimiza o número de intervalos. De modo geral, parâmetros padrão são usados, com uma penalidade de criação de intervalo igual a 12 e uma penalidade de extensão de intervalo igual a 4. O uso de GAP pode ser preferencial, mas outros algoritmos podem ser usados, por exemplo, BLAST (que usa o método de Altschul *et al.*, 1990), FASTA (que usa o método de Pearson e Lipman, 1988), ou o algoritmo de Smith-Waterman (Smith e Waterman, 1981), ou o programa TBLASTN, de Altschul *et al.*, 1990 *supra*, que emprega, de modo geral, os parâmetros padrão. Em particular, o algoritmo psi-Blast (Altschul *et al.*, 1997) pode ser usado.

[0154] Uma molécula de anticorpo da invenção também pode compreender uma primeira, uma segunda ou uma terceira sequência, sequência de alça estrutural de AB, CD ou EF, domínio CH3, domínio CH2, domínio CH2 e CH3, CDR, FW, domínio VH, domínio VL, cadeia leve e/ou cadeia pesada que tem uma ou mais alterações de sequência de aminoácidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido), preferencialmente, 20 alterações ou menos, 15 alterações ou menos, 10 alterações ou menos, 5 alterações ou menos, 4 alterações ou menos, 3 alterações ou menos, 2 alterações ou menos, ou 1 alteração em comparação com uma primeira, uma segunda ou uma terceira sequência, sequência de alça estrutural de AB, CD ou EF, sequência de domínio CH3, domínio CH2, domínio CH2 e CH3, CDR, FW, domínio VH, domínio VL, cadeia leve ou cadeia pesada revelada no presente

documento. Em particular, alterações podem ser feitas em uma ou mais regiões de estrutura da molécula de anticorpo fora das sequências de domínio VH e VL e/ou em uma ou mais regiões de estrutura do domínio CH3. Por exemplo, as alterações podem ser no domínio CH3 fora das sequências descritas no presente documento como uma primeira, uma segunda e uma terceira sequências, ou como sequências de alça estrutural de AB, CD ou EF.

[0155] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo da invenção pode compreender uma sequência de domínio CH3 com uma ou mais alterações de sequência de aminoácidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido), preferencialmente 20 alterações ou menos, 15 alterações ou menos, 10 alterações ou menos, 5 alterações ou menos, 4 alterações ou menos, 3 alterações ou menos, 2 alterações ou menos, ou 1 alteração em comparação com uma sequência de domínio CH3 apresentada em SEQ ID NOs **81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 115, 118, 121, 124, 127, 130** ou **132**. Em uma modalidade mais preferencial, a molécula de anticorpo da invenção pode compreender uma sequência de domínio CH3 com uma ou mais alterações de sequência de aminoácidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido), preferencialmente 20 alterações ou menos, 15 alterações ou menos, 10 alterações ou menos, 5 alterações ou menos, 4 alterações ou menos, 3 alterações ou menos, 2 alterações ou menos, ou 1 alteração em comparação com uma sequência de domínio CH3 apresentada em SEQ ID NOs: **115 [FS22-172-003]** ou **81 [FS22-053-008]**, preferencialmente SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**.

[0156] Em uma modalidade adicional preferencial, a molécula de anticorpo compreende uma sequência de domínio CH2, com uma ou mais alterações de sequência de aminoácidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido), preferencialmente 20 alterações ou menos, 15 alterações ou menos, 10 alterações ou menos, 5 alterações ou menos, 4 alterações ou menos, 3 alterações ou menos, 2 alterações ou menos, ou 1 alteração em comparação com a sequência de domínio CH2 apresentada em SEQ ID NO: **76** ou **77**.

[0157] Em modalidades preferenciais em que um ou mais aminoácidos são substituídos com outro aminoácido, as substituições podem ser substituições conservativas, por exemplo, de acordo com a seguinte Tabela. Em algumas modalidades, aminoácidos na mesma categoria na coluna intermediária são substituídos por outro, isto é, um aminoácido não polar é substituído com outro aminoácido não polar, por exemplo. Em algumas modalidades, os aminoácidos na mesma linha na coluna da direita são substituídos por outros.

ALIFÁTICO	Não polar	G A P
		I L V
	Polar - não carregado	C S T
		M
	Polar - carregado	N Q
		D E
AROMÁTICO		K R
		H F W
		Y

[0158] Em algumas modalidades, substituição (ou

substituições) pode ser funcionalmente conservativa. Isto é, em algumas modalidades a substituição pode não afetar (ou pode não afetar substancialmente) uma ou mais propriedades funcionais (por exemplo, afinidade de ligação) da molécula de anticorpo que compreende a substituição como em comparação com a molécula de anticorpo não substituída equivalente.

[0159] Em que a molécula de anticorpo compreende uma variante de uma primeira sequência, sequência de alça estrutural de AB, domínio CH3, ou sequência de cadeia pesada, como revelado no presente documento, a molécula de anticorpo mantém, preferencialmente, a sequência PPY entre as posições 11 e 19, preferencialmente, posições 15 e 17, do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Além disso, a molécula de anticorpo mantém, preferencialmente, uma inserção, preferencialmente, uma inserção de 5 aminoácidos entre as posições 16 e 17 do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Em uma modalidade adicional preferencial, a molécula de anticorpo mantém, preferencialmente, a sequência nas posições 97 e 98 do domínio CH3 da molécula de anticorpo.

[0160] Além disso, ou alternativamente, em que a molécula de anticorpo compreende uma variante de domínio CH3, domínio CH2 e CH3, sequência de cadeia leve ou cadeia pesada revelada no presente documento, a variante preferencialmente não compreende quaisquer alterações de aminoácido na primeira e na segunda localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Por exemplo, a variante pode não compreender quaisquer alterações de aminoácido nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Adicionalmente, a variante pode não compreender quaisquer alterações de aminoácido na alça estrutural de CD

do domínio CH3 da molécula de anticorpo. Isto é, a variante pode não compreender quaisquer alterações de aminoácido nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3 da molécula de anticorpo.

[0161] Em que a molécula de anticorpo compreende uma variante de uma sequência de domínio VH, domínio VL, cadeia leve ou cadeia pesada revelada no presente documento, em que a molécula de anticorpo preferencialmente não compreende quaisquer alterações de aminoácido nas sequências de CDR. Isto é, quaisquer alterações de aminoácido presentes podem estar nas sequências de FW, por exemplo, HFW1, HFW2, HFW3, HFW4, LFW1, LFW2, LFW3 e/ou LFW4. Por exemplo, a variante pode não compreender quaisquer alterações de aminoácido nas sequências de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 e/ou CDR6.

[0162] A molécula de anticorpo preferencialmente se liga ao PD-L1 humano e CD137 humano. Preferencialmente, a molécula de anticorpo tem a capacidade para se ligar simultaneamente ao PD-L1 humano e a CD137 humano, em que CD137 humano e PD-L1 humano são coexpressos. Como usado no presente documento, coexpressão significa que os dois alvos são expressos na superfície de uma única célula, ou na superfície de duas células separadas. Por exemplo, a molécula de anticorpo pode ter a capacidade para se ligar ao PD-L1 humano e a CD137 humano quando o PD-L1 humano e o CD137 humano forem coexpressos em uma única célula, por exemplo, uma célula imune, bem como ter a capacidade para se ligar ao PD-L1 humano e a CD137 humano quando o PD-L1 humano e o CD137 humano forem coexpressos em duas células separadas, por exemplo, uma célula imune que expressa CD137 e uma célula tumoral separada que expressa PD-L1 no microambiente

tumoral.

[0163] A molécula de anticorpo preferencialmente se liga ao PD-L1 humano com uma afinidade (K_D) de 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, ou 0,3 nM ou com uma afinidade superior. Preferencialmente, a molécula de anticorpo se liga ao PD-L1 humano, com uma afinidade (K_D) de 0,3 nM, ou com uma afinidade superior.

[0164] O PD-L1 humano pode, por exemplo, ter a sequência apresentada em SEQ ID NO: **180**. O PD-L1 humano pode, por exemplo, ser PD-L1 humano recombinante com uma Etiqueta de Avi (hPD-L1-Avi-His), disponibilizada junto à Acro Biosystems (número de catálogo: PD1-H82E5). O PD-L1 humano recombinante pode ser biotinilado.

[0165] A molécula de anticorpo se liga, preferencialmente, a CD137 humano dimérico com uma afinidade (K_D) de 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM ou 2 nM, ou com uma afinidade superior. Preferencialmente, a molécula de anticorpo se liga a CD137 humano dimérico, com uma afinidade (K_D) de 2 nM, ou com uma afinidade superior.

[0166] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo se liga a CD137 dimérico com uma afinidade maior que CD137 monomérico. Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo se liga a CD137 dimérico com uma afinidade que é pelo menos 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, 100 vezes, 110 vezes, 120 vezes, 130 vezes, 140 vezes, 150 vezes, 160 vezes, 170 vezes ou 200 vezes maior que a afinidade da molécula de anticorpo para CD137 monomérico.

[0167] O CD137 humano pode, por exemplo, ter a sequência

apresentada em SEQ ID NO: **186**. Os métodos para produzir antígenos CD137 diméricos e monoméricos são descritos nos exemplos.

[0168] A molécula de anticorpo preferencialmente se liga ao PD-L1 de cinomolgo e CD137 de cinomolgo. Preferencialmente, a molécula de anticorpo tem a capacidade para se ligar simultaneamente ao PD-L1 de cinomolgo e a CD137 de cinomolgo, em que PD-L1 de cinomolgo e CD137 de cinomolgo são expressos na superfície de uma única célula, ou na superfície de duas células separadas.

[0169] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo pode se ligar ao PD-L1 de cinomolgo com uma afinidade (K_D) de 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, ou 0,3 nM ou com uma afinidade superior. Preferencialmente, a molécula de anticorpo se liga ao PD-L1 de cinomolgo, com uma afinidade (K_D) de 1 nM, ou com uma afinidade superior.

[0170] O PD-L1 de cinomolgo pode, por exemplo, ter a sequência apresentada em SEQ ID NO: **184**.

[0171] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo pode se ligar a CD137 dimérico de cinomolgo com uma afinidade (K_D) de 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, ou 2 nM ou com uma afinidade superior. Preferencialmente, a molécula de anticorpo se liga a CD137 dimérico de cinomolgo, com uma afinidade (K_D) de 2 nM, ou com uma afinidade superior.

[0172] A molécula de anticorpo pode se ligar ao PD-L1 humano e ao PD-L1 de cinomolgo com uma afinidade similar, e/ou se ligar a CD137 humano dimérico e CD137 dimérico de cinomolgo com afinidade similar. Acredita-se que isso seja

benéfico por garantir que os estudos de eficácia e toxicidade realizados com a molécula de anticorpo em macacos cinomolgo sejam indicativos da eficácia e da toxicidade da molécula de anticorpo em seres humanos.

[0173] Desse modo, em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo se liga ao PD-L1 de cinomolgo com uma afinidade que é não maior que 10 vezes, preferencialmente, não maior que 5 vezes menor ou maior que a afinidade com a qual a molécula de anticorpo se liga ao PD-L1 humano. Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo se liga a CD137 dimérico de cinomolgo com uma afinidade que é não maior que 10 vezes, preferencialmente, não maior que 5 vezes menor ou maior que a afinidade com a qual a molécula de anticorpo se liga a CD137 humano dimérico.

[0174] A afinidade de ligação de uma molécula de anticorpo a um antígeno cognato, como PD-L1 humano, CD137 humano, PD-L1 de cinomolgo, ou CD137 de cinomolgo pode ser determinada por ressonância de plasmon de superfície (SPR), como Biacore, por exemplo. Detalhes adicionais de métodos adequados são descritos nos Exemplos.

[0175] A habilidade de uma molécula de anticorpo para simultaneamente se ligar a dois antígenos cognatos, por exemplo, PD-L1 humano e CD137 humano, ou PD-L1 de cinomolgo e CD137 de cinomolgo, pode ser determinada por SPR, como Biacore, por exemplo. Detalhes adicionais de métodos adequados são descritos nos Exemplos.

[0176] A molécula de anticorpo pode ter a capacidade para bloquear a interação entre PD-L1 e seu receptor, PD-1, preferencialmente, PD-L1 humano e PD-1 humano.

[0177] A trajetória de sinalização de PD-1/PD-L1 é

conhecida como importante na mediação de supressão imunológica. Desse modo, espera-se que as moléculas de anticorpo que têm a capacidade para bloquear essa trajetória sejam vantajosas na medida em que as mesmas podem reduzir a supressão imunológica e auxiliar a aumentar a resposta antitumoral. A inibição de sinalização de PD-1/PD-L1 e ativação de CD137 podem funcionar em conjunto a fim de aumentar potência antitumoral.

[0178] A habilidade de uma molécula de anticorpo para bloquear a ligação de PD-L1 ao PD-1 pode ser determinada com o uso de um ensaio com base em célula bioluminescente, por exemplo, com o uso de um produto de Bioensaio de Bloqueio de PD-1/PD-L1, por exemplo, da Promega. A habilidade de uma molécula de anticorpo para bloquear a ligação de PD-L1 ao PD-1 pode ser determinada com o uso de ELISA. Detalhes adicionais desses ensaios são descritos nos Exemplos.

[0179] A habilidade de uma molécula de anticorpo para bloquear a ligação de PD-L1 ao PD-1, também é denominada atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 no presente documento, pode ser determinada por referência a uma molécula de anticorpo que compreende ou que consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo **2.14H9OPT** apresentadas no documento WO2011/066389 A1, respectivamente, ou a cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo **G1/280_02_G02** apresentadas em SEQ ID NOs **177** e **178**, respectivamente.

[0180] Por exemplo, a molécula de anticorpo pode ter um nível similar ou superior de atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 que uma molécula de anticorpo que compreende ou que consiste na cadeia pesada e na cadeia leve de anticorpo **2.14H9OPT** apresentadas no documento WO2011/066389 A1, ou a

cadeia pesada e a cadeia leve de anticorpo **G1/280_02_G02** apresentadas SEQ ID NOs **177** e **178**, respectivamente.

[0181] A molécula de anticorpo pode ter uma atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 que é pelo menos 70 %, 80 %, ou 90 % da atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 de uma molécula de anticorpo que compreende ou que consiste na sequência de cadeia pesada e sequência de cadeia leve de anticorpo **2.14H9OPT** apresentadas no documento WO2011/066389 A1, ou a cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo **G1/280_02_G02** apresentadas em SEQ ID NOs **177** e **178**, respectivamente.

[0182] A molécula de anticorpo pode ter uma atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 que está entre 70 % e 130 %, 80 % e 120 %, ou 90 % e 110 % da atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 de uma molécula de anticorpo que compreende ou que consiste na sequência de cadeia pesada e sequência de cadeia leve de anticorpo **2.14H9OPT** apresentadas no documento WO2011/066389 A1, ou a cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo **G1/280_02_G02** apresentadas em SEQ ID NOs **177** e **178**, respectivamente.

[0183] Como descrito acima, as moléculas de anticorpo da invenção têm a capacidade para se ligarem simultaneamente ao PD-L1 e a CD137, que resulta na ativação (agonismo) de CD137. Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo tem a capacidade para se ligar simultaneamente tanto ao PD-L1 humano quanto a CD137 humano, em que tal ligação causa a ativação de CD137 humano. Em uma modalidade adicionalmente preferencial, a molécula de anticorpo tem a capacidade para se ligar simultaneamente tanto ao PD-L1 de cinomolgo quanto a CD137 de cinomolgo, em que tal ligação causa a ativação de CD137 de cinomolgo. Métodos exemplificativos de testar

simultaneamente a ligação e a ativação incluem ensaios de ativação de célula T, como descrito em maiores detalhes abaixo.

[0184] A habilidade de uma molécula de anticorpo para ativar células T pode ser medida com o uso de um ensaio de ativação de célula T. As células T liberam IL-2 na ativação. Um ensaio de ativação de célula T pode, portanto, medir a liberação de IL-2 para determinar o nível de ativação de célula T induzido pela molécula de anticorpo.

[0185] Por exemplo, a habilidade da molécula de anticorpo para ativar células T é determinada medindo-se a concentração da molécula de anticorpo exigida para obter a liberação média máxima de IL-2 pelas células T em um ensaio de ativação de célula T. Isso é denominado EC₅₀ abaixo.

[0186] Em uma modalidade preferencial, a molécula de anticorpo tem um EC₅₀ em um ensaio de ativação de célula T que está dentro de 50 vezes, 40 vezes, 30 vezes, 20 vezes, 10 vezes, 5 vezes, 4 vezes, 3 vezes, ou 2 vezes do EC₅₀ de **FS22-172-003-AA/E12v2** no mesmo ensaio, em que **FS22-172-003-AA/E12v2** consiste na cadeia pesada de SEQ ID NO: **134** e na cadeia leve de SEQ ID NO: **17**.

[0187] Por exemplo, a molécula de anticorpo pode ter um EC₅₀ em um ensaio de ativação de célula T de 30 nM ou menos, 25 nM ou menos, 20 nM ou menos, 14 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 4 nM ou menos, 3 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1,5 nM ou menos, 1 nM ou menos, 0,4 nM ou menos, 0,4 nM ou menos, ou 0,3 nM ou menos, preferencialmente, 1 nM ou menos, mais preferencialmente, 1,5 nM ou menos quando a molécula de anticorpo é reticulada.

[0188] Além disso, ou alternativamente, a habilidade de

uma molécula de anticorpo para ativar células T pode ser determinada medindo-se a concentração máxima de IL-2 liberada pelas células T em um ensaio de ativação de célula T na presença da molécula de anticorpo ($E_{\text{máx}}$).

[0189] A molécula de anticorpo pode ter uma concentração máxima de IL-2 liberada pelas células T em um ensaio de ativação de célula T na presença da molécula de anticorpo de pelo menos 1500 pg/ml, 2000 pg/ml, 2500 pg/ml, 3000 pg/ml, ou 3250 pg/ml ou mais, preferencialmente, 2500 pg/ml ou mais.

[0190] Em uma modalidade preferencial, a concentração máxima de IL-2 liberada pelas células T em um ensaio de ativação de célula T na presença da molécula de anticorpo está dentro de 20 %, ou 10 % da concentração máxima de IL-2 liberada pelas células T na presença de **FS22-172-003-AA/E12v2** no mesmo ensaio, em que **FS22-172-003-AA/E12v2** consiste na cadeia pesada de SEQ ID NO: **134** e na cadeia leve de SEQ ID NO: **17**.

[0191] A ensaio de ativação de célula T compreende, preferencialmente, células T que expressam CD137 e células que expressam PD-L1, por exemplo, células HEK293 que superexpressam PD-L1 humano (HEK.hPD-L1) podem ser preparadas e usadas, como descrito nos Exemplos. Alternativa ou adicionalmente, as células que expressam um nível diferente de PD-L1 podem ser usadas, como a linhagem de células de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) e/ou células SKBR3. Como descrito nos Exemplos, HEK.hPD-L1 expressa um nível alto de PD-L1 humano, as células MDA-MB-231 expressam um nível intermediário de PD-L1 humano e as células SKBR3 expressam um nível baixo de PD-L1.

[0192] Em uma modalidade preferencial, o ensaio de

ativação de célula T não compreende quaisquer agentes com a capacidade para reticular a molécula de anticorpo diferente de CD137 e PD-L1 que expressam células. Exemplos de agentes com a capacidade para reticular a molécula de anticorpo incluem um anticorpo CH2 anti-humano, como descrito nos Exemplos.

[0193] O ensaio de ativação de célula T pode ser um ensaio de célula T como descrito no presente documento, como um ensaio de célula pan-T, como descrito nos presentes Exemplos.

[0194] Por exemplo, um ensaio de ativação de célula T pode ser um ensaio de liberação de IL-2 com base em células T isoladas das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) humanas. Por exemplo, o ensaio de ativação de célula T pode compreender isolar PBMCs humanas dos cones de depleção de leucócito. Métodos para isolar PBMCs são conhecidos na técnica e descritos nos presentes exemplos. As células T podem, então, ser isoladas das PBMCs. Métodos para isolar células T (todas as células T) das PBMCs são conhecidos na técnica e descritos nos presentes Exemplos.

[0195] O ensaio de ativação pode envolver preparar o número exigido de células T, por exemplo, em meios experimentais, como um meio de célula T. O número exigido de células T pode ser preparado em uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células/ml. As células T podem, então, ser estimuladas com o uso de um reagente de ativação de célula T adequado que fornece os sinais exigidos para ativação de célula T. Por exemplo, o reagente de ativação de célula T pode ser um reagente que compreende CD3 e CD28, como microesferas que compreendem CD3 e CD28. As células T isoladas podem ser incubadas durante a noite com o reagente de ativação de

célula T para ativar as células T. Após isso, as células T ativadas podem ser lavadas para separar as células T do reagente de ativação de célula T e serem ressuspensas em meio de célula T em uma concentração adequada, como $2,0 \times 10^6$ células/ml. As células T ativadas podem, então, ser adicionadas às placas revestidas com anticorpo CD3 anti-humano.

[0196] As células (por exemplo, células HEK.hPD-L1) podem ser plaqueadas, por exemplo, a 2×10^5 células por poço em placas de cultura de tecido revestidas com anticorpo anti-CD3 em meio de cultura de célula T. Após, por exemplo, 4 horas de incubação, todos os meios de cultura de célula T podem ser removidos e substituídos com 100 µl de meio de cultura de célula T que contém células T, por exemplo, em uma concentração de $5,0 \times 10^5$ células/ml que resulta em $5,0 \times 10^4$ células/poço.

[0197] Uma diluição adequada de cada molécula de anticorpo de teste pode ser preparada e adicionada aos poços. As células T podem, então, ser incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ por 24 horas com o anticorpo de teste. Os tensoativos podem ser coletados e ensaiados para determinar a concentração de IL-2 no tensoativo. Métodos para determinar a concentração de IL-2 em uma solução são conhecidos na técnica e descritos nos presentes exemplos. A concentração de IL-2 humano pode ser plotada versus a concentração de log da molécula de anticorpo. As curvas resultantes podem ser ajustadas com o uso do log (agonista) versus equação de resposta.

[0198] A molécula de anticorpo pode ser conjugada a uma molécula bioativa ou uma identificação detectável. Nesse caso, a molécula de anticorpo pode ser referida como um

conjugado. Tais conjugados são usados no tratamento de doenças, como descrito no presente documento.

[0199] Por exemplo, a molécula bioativa pode ser um modulador de sistema imunológico, como uma citocina, preferencialmente, uma citocina humana. Por exemplo, a citocina pode ser uma citocina que estimula a ativação e/ou proliferação de célula T. Exemplos de citocinas para conjugação à molécula de anticorpo incluem IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, GM-CSF e IFN- γ .

[0200] Alternativamente, a molécula bioativa pode ser uma armação de ligante, como uma armação de ligante de uma citocina, por exemplo, de TGF-beta ou IL-6.

[0201] Alternativamente, a molécula bioativa pode ser um radioisótopo terapêutico.

[0202] A radioimunoterapia é usada em tratamento de câncer, por exemplo. Radioisótopos terapêuticos adequados para radioimunoterapia são conhecidos na técnica e incluem ítrio-90, iodo-131, bismuto-213, astatina-211, lutétio-177, rênio-188, cobre-67, actínio-225, e iodo-125 e térbio-161.

[0203] As identificações detectáveis adequadas que podem ser conjugadas a moléculas de anticorpo são conhecidas na técnica e incluem radioisótopos como iodo-125, iodo-131, ítrio-90, índio-111 e tecnécio-99; fluorocromos, como fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, vermelho Texas e derivados de corante ciano, por exemplo, Cy7 e Alexa750; corantes cromogênicos, como diaminobenzidina; microesferas de látex; identificações de enzima como rábano peroxidase; corantes de fósforo ou laser com absorção espectralmente isolada ou características de emissão; E frações químicas, como biotina, que podem ser detectadas por meio de ligação

a uma fração detectável de cognato específico, por exemplo, avidina identificada.

[0204] A molécula de anticorpo pode ser conjugada à molécula bioativa ou identificação detectável por meio de qualquer ligação covalente ou não covalente adequada, como uma ligação de dissulfeto ou peptídeo. Em que a molécula bioativa é uma citocina, a citocina pode ser ligada à molécula de anticorpo por meio de um ligante de peptídeo. Os ligantes de peptídeo adequados são conhecidos na técnica e podem ser de 5 a 25, 5 a 20, 5 a 15, 10 a 25, 10 a 20, ou 10 a 15 aminoácidos em comprimento.

[0205] Em algumas modalidades, a molécula bioativa pode ser conjugada à molécula de anticorpo por um ligante clivável. O ligante pode permitir a liberação da molécula bioativa da molécula de anticorpo em um sítio de terapia. Os ligantes podem incluir ligações de amida (por exemplo, ligantes peptídicos), ligações de dissulfeto ou hidrazonas. Os ligantes de peptídeo, por exemplo, podem ser clivados por proteases específicas de sítio, as ligações de dissulfeto podem ser clivadas pelo ambiente de redução do citosol e hidrazonas podem ser clivadas por hidrólise mediada por ácido.

[0206] A invenção também fornece uma molécula ou moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam uma molécula de anticorpo da invenção. A pessoa versada não teria dificuldade em preparar essas moléculas de ácido nucleico com o uso de métodos bem conhecidos na técnica.

[0207] A molécula ou as moléculas de ácido nucleico pode, por exemplo, compreender a sequência apresentada em SEQ ID NO: 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 116,

119, 122, 125, 128, 131, ou 133, que codifica os domínios CH3 de **FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-011, FS22-053-017, FS22-053-014, FS22-053-010, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053, FS22-172-003, FS22-172-002, FS22-172-004, FS22-172-001, FS22-172-005, FS22-172-006**, e **FS22-172**, respectivamente. Preferencialmente, a molécula ou as moléculas de ácido nucleico compreendem a sequência apresentada em SEQ ID NO: **116** ou **82**, que codifica o domínio CH3 de **FS22-172-003** ou **FS22-053-008**, respectivamente. Mais preferencialmente, a molécula ou as moléculas de ácido nucleico compreendem a sequência apresentada em SEQ ID NO: **116**, que codifica o domínio CH3 de **FS22-172-003**.

[0208] A molécula ou moléculas de ácido nucleico pode codificar o domínio VH e/ou domínio VL, preferencialmente, os domínios VH e VL de anticorpo **E12v2, E05v2, G12v2** ou **1am-G02v3**, preferencialmente, anticorpo **E12v2, E05v2** ou **G12v2**, mais preferencialmente, **E12v2** ou **E05v2**, com máxima preferência, **E12v2**. As sequências de domínio VH e VL desses anticorpos são descritas no presente documento.

[0209] Por exemplo, a molécula (ou moléculas) de ácido nucleico pode compreender:

(i) a sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de anticorpo **E12v2** apresentada em SEQ ID NO: **13**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de anticorpo **E12v2** apresentada em SEQ ID NO: **15**; ou

(ii) a sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de anticorpo **E05v2** apresentada em SEQ ID NO: **24**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de anticorpo **E05v2** apresentada em SEQ ID NO: **26**;

(iii) a sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de anticorpo **G12v2** apresentada em SEQ ID NO: **24**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de anticorpo **G12v2** apresentada em SEQ ID NO: **31**; ou

(v) a sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de anticorpo **1am-G02v3** apresentada em SEQ ID NO: **24**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de anticorpo **1am-G02v3** apresentada em SEQ ID NO: **42**.

[0210] A molécula ou moléculas de ácido nucleico pode codificar a cadeia pesada e/ou cadeia leve, preferencialmente, a cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo **FS22-172-003-AA/E12v2**, **FS22-172-003-AA/E05v2**, **FS22-172-003-AA/G12v2**, **FS22-053-008-AA/E12v2**, **FS22-053-008-AA/E05v2** ou **FS22-053-008-AA/G12v2**, preferencialmente, anticorpo **FS22-172-003-AA/E12v2**, **FS22-172-003-AA/E05v2**, **FS22-172-003-AA/G12v2**, **FS22-053-008-AA/E12v2** ou **FS22-053-008-AA/E05v2**, ainda mais preferencialmente, anticorpo **FS22-172-003-AA/E12v2**. As sequências de cadeia pesada e cadeia leve desses anticorpos são descritas no presente documento.

[0211] Por exemplo, a molécula (ou moléculas) de ácido nucleico pode compreender:

(i) a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada de anticorpo **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentada em SEQ ID NO: **32** ou **135**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de anticorpo **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentada em SEQ ID NO: **39** ou **136**; ou

(ii) a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada de anticorpo **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentada em SEQ ID NO: **138**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de anticorpo **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentada em SEQ ID NO:

139;

(iii) a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada de anticorpo **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentada em SEQ ID NO: **141**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de anticorpo **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentada em SEQ ID NO: **142**;

(iv) a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada de anticorpo **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentada em SEQ ID NO: **144**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de anticorpo **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentada em SEQ ID NO: **145**;

(v) a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada de anticorpo **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentada em SEQ ID NO: **147**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de anticorpo **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentada em SEQ ID NO: **148**; ou

(vi) a sequência de ácidos nucleicos de cadeia pesada de anticorpo **FS22-053-008-AA/G12v2** apresentada em SEQ ID NO: **150**, e/ou a sequência de ácidos nucleicos de cadeia leve de anticorpo **FS22-053-008-AA/G12v2** apresentada em SEQ ID NO: **151**.

[0212] Em que um ácido nucleico codifica o domínio VH e VL, ou cadeia pesada e leve, de uma molécula de anticorpo da invenção, em que os dois domínios ou as duas cadeias podem ser codificadas em duas moléculas de ácido nucleico separadas.

[0213] Uma molécula de ácido nucleico isolada pode ser usada para expressar uma molécula de anticorpo da invenção. O ácido nucleico geralmente será fornecido na forma de um vetor recombinante para expressão. Outro aspecto da

invenção, desse modo, fornece um vetor que compreende um ácido nucleico como descrito acima. Os vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, em que contêm sequências regulatórias adequadas, que incluem sequências promotoras, fragmentos terminadores, sequências de poliadenilação, sequências intensificadoras, genes marcadores e outras sequências, como apropriado. Preferencialmente, o vetor contém sequências regulatórias adequadas para acionar a expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira. Os vetores podem ser plasmídeos, virais, por exemplo, fago ou fagemídeo, como adequado.

[0214] Uma molécula de ácido nucleico ou vetor, como descrito no presente documento, pode ser introduzida em uma célula hospedeira. As técnicas para a introdução de ácido nucleico ou vetores em células hospedeiras são bem apresentadas na técnica e qualquer técnica adequada pode ser empregada. Uma faixa de células hospedeiras adequada para a produção de moléculas de anticorpo recombinantes são conhecidas na técnica, e incluem células hospedeiras bacterianas, de levedura, de inseto ou de mamífero. Uma célula hospedeira preferencial é uma célula de mamífero, como uma célula CHO, NS0 ou HEK, por exemplo, uma célula HEK293.

[0215] Outro aspecto da invenção fornece um método de produção de uma molécula de anticorpo da invenção que compreende expressar um ácido nucleico que codifica a molécula de anticorpo em uma célula hospedeira e opcionalmente isolar e/ou purificar a molécula de anticorpo assim produzida. Métodos para cultivar células hospedeiras são bem conhecidos na técnica. O método pode compreender

adicionalmente isolar e/ou purificar a molécula de anticorpo. As técnicas para a purificação de moléculas de anticorpo recombinantes são bem conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, HPLC, FPLC ou cromatografia por afinidade, por exemplo, com o uso de Proteína A ou Proteína L. Em algumas modalidades, a purificação pode ser realizada com o uso de uma etiqueta de afinidade na molécula de anticorpo. O método também pode compreender formular a molécula de anticorpo em uma composição farmacêutica, opcionalmente com um excipiente farmacêuticamente aceitável ou outra substância conforme descrito abaixo.

[0216] PD-L1 é conhecido por ser expresso em diversas células cancerígenas e é expresso em célula do sistema imunológico. CD137 é expresso em células do sistema imunológico, que inclui células T, em particular, células T CD8⁺, células B, células NK e linfócitos de infiltração de tumor (TILs). CD137 é expresso em um nível inferior nas células T CD4⁺ que células T CD8⁺, mas também mostrou-se estar envolvido na indução de proliferação e ativação de alguns subconjuntos de células T CD4⁺.

[0217] Mostrou-se que a ativação de CD137 desempenha um papel de intensificar a proliferação, a sobrevivência e a função efetora de citotoxicidade de células T CD8⁺, bem como diferenciação e manutenção de célula T CD8⁺ de células T CD8⁺ de memória. Também foi demonstrado que a ativação de CD137 intensifica ADCC mediado por célula NK, bem como a proliferação de célula B, sobrevivência e produção de citocina.

[0218] Como descrito em detalhes no presente documento, os presentes inventores demonstraram que as moléculas de

anticorpo da invenção têm a capacidade para se ligarem simultaneamente ao PD-L1 e a CD137 a fim de induzir o agonismo de CD137. Dessa forma, a molécula de anticorpo aciona o agonismo autonomamente, com base na expressão de PD-L1 e de CD137, e sem a necessidade por agentes de reticulação adicionais. Visto que PD-L1 é expresso em diversas células cancerígenas e CD137 é expresso nas células imunológicas, nas quais possui um papel conhecido em intensificar a proliferação e a sobrevivência de células imunológicas, espera-se que as moléculas de anticorpo da invenção tenham a capacidade para intensificar uma resposta imunológica em localizações em que PD-L1 é expresso, por exemplo, no microambiente tumoral. Adicionalmente, os presentes inventores mostraram que o uso de uma molécula de anticorpo que tem essas propriedades, é eficaz em suprimir o crescimento tumoral em modelos de camundongo singênico de câncer, e que tais moléculas de anticorpo são mais eficazes que a administração de duas moléculas de ligação que se ligam ao PD-L1 e a CD137, respectivamente.

[0219] As moléculas de anticorpo como descrito no presente documento podem, desse modo, ser úteis para aplicações terapêuticas, em particular, no tratamento de câncer.

[0220] Uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser usada em um método de tratamento do corpo humano ou animal. Os aspectos relacionados da invenção fornecem;

(i) uma molécula de anticorpo descrita no presente documento para uso como um medicamento,

(ii) uma molécula de anticorpo descrita no presente

documento para uso em um método de tratamento de uma doença ou um transtorno,

(iii) o uso de uma molécula de anticorpo descrita no presente documento na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de uma doença ou um transtorno; e,

(iv) um método de tratamento de uma doença ou um transtorno em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento.

[0221] O indivíduo pode ser um paciente, preferencialmente, um paciente humano.

[0222] O tratamento pode ser qualquer tratamento ou terapia no qual algum efeito terapêutico desejado é obtido, por exemplo, a inibição ou atraso do progresso da condição, e inclui uma redução na taxa de progresso, um impedimento na taxa de progresso, melhoria da condição, cura ou remissão (seja parcial ou total) da condição, prevenção, melhoria, atraso, anulação ou detenção de um ou mais sintomas e/ou sinais da condição ou prolongamento de sobrevivência de um indivíduo ou paciente além do esperado na ausência de tratamento.

[0223] O tratamento como uma medida profiláctica (isto é, profilaxia) também é incluído. Por exemplo, um indivíduo suscetível a ou em risco da ocorrência ou recorrência de uma doença, como câncer pode ser tratado como descrito no presente documento. Tal tratamento pode impedir ou atrasar a ocorrência ou recorrência da doença no indivíduo.

[0224] Um método de tratamento como descrito pode ser compreender administrar pelo menos um tratamento adicional

ao indivíduo em adição à molécula de anticorpo. A molécula de anticorpo descrita no presente documento pode, desse modo, ser administrada a um indivíduo por si só ou em combinação com um ou mais outros tratamentos. Em que a molécula de anticorpo é administrada ao indivíduo em combinação com outro tratamento, o tratamento adicional pode ser administrado ao indivíduo simultaneamente com, sequencialmente a ou separadamente da administração da molécula de anticorpo. Em que o tratamento adicional é administrado simultaneamente com a molécula de anticorpo, a molécula de anticorpo e o tratamento adicional podem ser administrados ao indivíduo como uma preparação combinada. Por exemplo, a terapia adicional pode ser uma terapia ou agente terapêutico conhecido para a doença a ser tratada.

[0225] Embora uma molécula de anticorpo possa ser administrada por si só, as moléculas de anticorpo serão frequentemente administradas na forma de uma composição farmacêutica, que pode compreender pelo menos um componente além da molécula de anticorpo. Outro aspecto da invenção, por tanto, fornece uma composição farmacêutica que compreende uma molécula de anticorpo, como descrito no presente documento. Um método que compreende formular uma molécula de anticorpo em uma composição farmacêutica também é fornecido.

[0226] As composições farmacêuticas podem compreender, além da molécula de anticorpo, um excipiente farmacêuticamente aceitável, carreador, tampão, estabilizante ou outros materiais bem conhecidos pelos elementos versados na técnica. O termo "farmacêuticamente aceitável" como usado no presente documento pertence a

compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo de julgamento médico, adequados para o uso em contato com os tecidos de um indivíduo (por exemplo, ser humano) sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outro problema ou complicação, compatível com uma razão de benefício/risco razoável. Cada carreador, excipiente, etc. também deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação. A natureza precisa do carreador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser por infusão, injeção ou qualquer outra via adequada, como discutido abaixo.

[0227] Para administração parenteral, por exemplo, subcutânea ou intravenosa, por exemplo, por injeção, a composição farmacêutica que compreende a molécula de anticorpo pode estar na forma de soluções aquosa parenteralmente aceitável que é isenta de pirogênio e tem pH adequado, isotonicidade e estabilidade. Aqueles de conhecimento relevante na técnica são bem capazes de preparar soluções adequadas com o uso, por exemplo, de veículos isotônicos como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer com Lactato. Os conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser empregados como exigido, incluindo tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, como ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzila; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; álcool fenílico, butílico ou benzílico; alquil parabenos como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo

peso molecular; proteínas, como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos que incluem glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons de formação de sal como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não iônicos, como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

[0228] Em algumas modalidades, moléculas de anticorpo podem ser fornecidas em uma forma liofilizada para reconstituição antes da administração. Por exemplo, moléculas de anticorpo liofilizadas podem ser reconstituídas em água estéril e misturadas com solução salina antes da administração a um indivíduo.

[0229] A administração pode ser em uma "quantidade terapeuticamente eficaz", que é suficiente para mostrar benefício a um indivíduo. A quantidade real administrada, e taxa e período de tempo de administração, dependerão da natureza e severidade do que está sendo tratado, o indivíduo particular que está sendo tratado, a condição clínica do indivíduo, a causa do distúrbio, o sítio de entrega da composição, o tipo de molécula de anticorpo, o método de administração, a programação de administração e outros fatores conhecidos por profissionais da área médica. A prescrição do tratamento, por exemplo, decisões em dosagem etc., está dentro da responsabilidade dos profissionais em geral e outros profissionais da área médica, e muitos dependem da severidade dos sintomas e/ou progressão de uma

doença que está sendo tratada. Doses apropriadas de molécula de anticorpo são bem conhecidas na técnica (Ledermann et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; e Bagshawe et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Dosagens específicas indicadas no presente documento, ou no Physician's Desk Reference (2003) conforme apropriado para uma molécula de anticorpo que está sendo administrada, podem ser usadas. A quantidade terapeuticamente eficaz ou dose adequada de uma molécula de anticorpo pode ser determinada por comparação com a atividade *in vitro* e atividade *in vivo* em um modelo animal. Métodos para extrapolação de dosagens eficazes em camundongos e outros animais de teste para seres humanos são conhecidos. A dose precisa dependerá de vários fatores, incluindo o tamanho e localização da área a ser tratada, e a natureza precisa da molécula de anticorpo.

[0230] Uma dose de anticorpo típica está na faixa 100 µg a 1 g para aplicações sistêmicas, e 1 µg a 1 mg para aplicações tópicas. Uma dose de carga superior inicial, seguida por uma ou mais doses inferiores, pode ser administrada. Essa é uma dose para um tratamento simples de um indivíduo adulto, que pode ser proporcionalmente ajustado para crianças e jovens, e também ajustado para outros formatos de anticorpo em proporção ao peso molecular.

[0231] Os tratamentos podem ser repetidos em intervalos diários, duas vezes por semana, semanais ou mensais, a critério do médico. A programação de tratamento para um indivíduo pode ser dependente das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da composição de anticorpo, em que a via de administração e a natureza da

condição é tratada.

[0232] O tratamento pode ser periódico, e o período entre administrações pode ser de cerca de duas semanas ou mais, por exemplo, cerca de três semanas ou mais, cerca de quatro semanas ou mais, cerca de uma vez por mês ou mais, cerca de cinco semanas ou mais, ou cerca de seis semanas ou mais. Por exemplo, o tratamento pode ser a cada duas a quatro semanas ou a cada quatro a oito semanas. As formulações e vias adequadas de administração são descritas acima.

[0233] Em uma modalidade preferencial, uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser para uso em um método de tratamento de câncer.

[0234] O câncer pode ser caracterizado pela proliferação anormal de células cancerígenas malignas. Em que um tipo particular de câncer, como câncer de mama, é denominado, se refere a uma proliferação anormal de células malignas do tecido relevante, como tecido de mama. Um câncer secundário que está localizado na mama, mas é o resultado de proliferação anormal de células malignas de outro tecido, como tecido de ovário, não é um câncer de mama, como denominado no presente documento, mas é um câncer de ovário.

[0235] O câncer pode ser um câncer primário ou secundário. Desse modo, uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, em que o câncer é um tumor primário e/ou uma metástase tumoral.

[0236] Um tumor de um câncer a ser tratado com o uso de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode compreender TILs que expressam CD137, por exemplo, em sua superfície celular. Em uma modalidade, o tumor pode ter

sido determinado para compreender TILs que expressam CD137. Métodos para determinar a expressão de um antígeno em uma superfície celular são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, citometria de fluxo.

[0237] Por exemplo, o câncer a ser tratado com o uso de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em leucemias, como leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crônica (CML), leucemia linfoblástica aguda (ALL) e leucemia linfoblástica crônica (CLL); linfomas, como linfoma de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin e mieloma múltiplo; e cânceres sólidos, como sarcomas (por exemplo, sarcomas de tecido mole), câncer de pele (por exemplo, carcinoma de célula Merkel), melanoma, câncer de bexiga (por exemplo, carcinoma urotelial), câncer do cérebro (por exemplo, glioblastoma multiforme), câncer de mama, câncer uterino/endometrial, câncer de ovário (por exemplo, cistadenoma seroso de ovário), câncer de próstata, câncer de pulmão (por exemplo, carcinoma pulmonar de célula não pequena (NSCLC) e câncer de pulmão de célula pequena (SCLC), câncer colorretal (por exemplo, adenocarcinoma colorretal), câncer cervical (por exemplo, câncer de célula escamosa cervical e adenocarcinoma cervical), câncer de fígado (por exemplo, carcinoma hepatocelular), câncer de cabeça e pescoço (por exemplo, carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço), câncer esofágico, câncer do pâncreas, câncer renal (por exemplo, câncer de célula renal), câncer adrenal, câncer do estômago (por exemplo, adenocarcinoma de estômago), câncer testicular, câncer da vesícula biliar e dos tratos biliares (por exemplo, colangiocarcinoma), câncer da tireoide, câncer

do timo, câncer ósseo e câncer cerebral.

[0238] Em uma modalidade preferencial, o câncer a ser tratado com o uso de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento é um câncer sólido.

[0239] Mais preferencialmente, o câncer a ser tratado com o uso de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento é um câncer sólido selecionado a partir do grupo que consiste em melanoma, câncer de bexiga, câncer do cérebro, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer colorretal, câncer cervical, câncer de fígado, câncer de cabeça e pescoço, câncer do pâncreas, câncer renal, câncer do estômago e tumores Estromais Gastrointestinais (GISTs).

[0240] Em uma modalidade adicional preferencial, o câncer a ser tratado com o uso de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser um câncer que é responsivo a tratamento com um ou mais inibidores de ponto de checagem, como um anticorpo que se liga ao PD-1, PD-L1 ou CTLA4. Acredita-se que tais tumores tenham níveis superiores de TIL e/ou carga mutacional de tumor superior que tumores que não são responsivos a terapia de inibidor de ponto de checagem. Tais tumores também são denominados tumores mornos ou quentes.

[0241] Exemplos de tais tumores incluem carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de pulmão (como câncer de pulmão escamoso, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de célula não pequena [NSCLC], ou carcinoma pulmonar de célula pequena [SCLC]), câncer de próstata, câncer cervical (como carcinoma de célula escamosa cervical ou adenocarcinoma endocervical), câncer de bexiga, câncer de mama, câncer da tireoide, câncer renal, câncer

colorretal (MSI ou MSS; por exemplo, adenocarcinoma colorretal), câncer esofágico, linfoma de não Hodgkin (NHL), câncer gástrico, endometrial câncer, câncer do pâncreas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, mesotelioma, câncer urotelial, carcinoma de célula Merkel e adenocarcinoma de estômago. Em uma modalidade preferencial, o câncer é HNSCC. O câncer pode ser, adicionalmente, um câncer que não foi tratado anteriormente com um agente quimioterápico ou radioterápico, isto é, o indivíduo a ser tratado pode ser um paciente com câncer que não recebeu tratamento com um agente quimioterápico ou radioterápico para o câncer em questão.

[0242] Alternativamente, o câncer a ser tratado com o uso de uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser um câncer, como câncer do pâncreas ou câncer de próstata que não é responsivo ao tratamento com um ou mais inibidores de ponto de checagem, como um anticorpo que se liga ao PD-1, PD-L1 ou CTLA4. Um indivíduo tratado com um anticorpo da invenção pode, desse modo, ser um paciente com câncer, como um câncer do pâncreas ou câncer de próstata paciente, com uma resposta anterior inadequada a um ou mais inibidores de ponto de checagem, como um anticorpo anti-PD-L1 ou anti-PD-1.

[0243] Os tumores que não são responsivos ao tratamento com um ou mais inibidores de ponto de checagem também são denominados como tumores frios. Sem desejar se ligar por teoria, acredita-se que o tratamento de um câncer, que não é responsivo ao tratamento com um ou mais inibidores de ponto de checagem por si só, com quimioterapia, radioterapia, um agente imunoterápico, como um agente imunoestimulatório, ou

uma vacina antitumor resultará em morte celular de câncer que, por sua vez, resulta em um aumento em TILs no tumor e a expressão superior de receptores imunossupressivos, que por sua vez tornam o câncer responsivo ao tratamento com inibidores de ponto de checagem, isto é, tornam um tumor frio em um tumor morno. Desse modo, a molécula de anticorpo da invenção pode ser para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, em que o câncer não é responsivo, ou refratário, ao tratamento com um ou mais inibidores de ponto de checagem por si só, e em que o método compreende administrar a molécula de anticorpo ao indivíduo em combinação com um agente quimioterápico, radioterápico ou imunoestimulatório, ou uma vacina anticâncer. Um método de tratamento um câncer em um indivíduo, em que o câncer não é responsivo, ou refratário, ao tratamento com um ou mais inibidores de ponto de checagem por si só, e em que o método compreende administrar a molécula de anticorpo ao indivíduo em combinação com um agente quimioterápico, radioterápico ou imunoestimulatório, ou uma vacina anticâncer também é contemplada.

[0244] No contexto de câncer, tratamento pode incluir inibir crescimento de câncer, incluir remissão completa de câncer e/ou inibir a metástase de câncer, bem como inibir a recorrência de câncer. O crescimento de câncer se refere, de modo geral, a qualquer um dentre um número de índices que indicam a alteração no câncer para uma forma mais desenvolvida. Desse modo, índices para medir uma inibição de crescimento de câncer incluem uma diminuição em sobrevivência de célula cancerígena, uma diminuição em volume de tumor ou morfologia (por exemplo, como determinado

com o uso de tomografia computadorizada (CT), sonografia ou outro método de imageamento), um crescimento tumoral atrasado, uma destruição de vasculatura de tumor, desempenho aprimorado em teste de pele com hipersensitividade atrasada, um aumento na atividade de células anti-cancerígenas imunológicas ou outras respostas imunológicas anticâncer, e uma diminuição em níveis de antígenos específicos de tumor. As respostas imunológicas de ativação e intensificação para tumores cancerígenos em um indivíduo pode aprimorar a capacidade do indivíduo para resistir ao crescimento de câncer, em particular, o crescimento de um câncer já presente no indivíduo e/ou para diminuir a propensão para crescimento de câncer no indivíduo.

[0245] No contexto de tratamento de câncer, uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser administrado a um indivíduo em combinação com outra terapia anticâncer ou agente terapêutico, como uma terapia anticâncer ou agente terapêutico que mostrou ser adequado, ou potencialmente adequados, para o tratamento do câncer em questão. Por exemplo, a molécula de anticorpo pode ser administrada ao indivíduo em combinação com a agente quimioterápico, radioterapia, um radionuclídeo, um agente imunoterápico, uma vacina antitumor, um vírus oncolítico, uma terapia de transferência celular adotiva (ACT), como terapia de célula NK adotiva ou terapia com células T de receptor de antígeno quimérico (CAR), TILs autólogos ou células T gama/delta, ou um agente para terapia hormonal.

[0246] Sem desejar se ligar por teoria, acredita-se que a molécula de anticorpo descrita no presente documento pode atuar como um adjuvante em terapia anticâncer.

Especificamente, acredita-se que a administração da molécula de anticorpo a um indivíduo em combinação com quimioterapia ou radioterapia, por exemplo, acionará uma resposta imunológica maior contra o câncer que é obtido com quimioterapia ou radioterapia por si só.

[0247] Um ou mais agentes quimioterápicos para administração em combinação com uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento podem ser selecionados a partir do grupo que consiste em: taxanos, antibióticos citotóxicos, inibidores de tirosina quinase, inibidores de PARP, inibidores de enzima de B-Raf, inibidores de MEK, inibidores de c-MET, inibidores de VEGFR, inibidores de PDGFR, agentes alquilantes, análogos de platina, análogos de nucleosídeo, antifolatos, derivados de talidomídeo, agentes quimioterápicos antineoplásicos e outros. Taxanos incluem docetaxel, paclitaxel e nab-paclitaxel; antibióticos citotóxicos incluem actinomicina, bleomicina, e antraciclinas como doxorubicina, mitoxantrona e valrubicina; inibidores de tirosina quinase incluem erlotinibe, gefitinibe, axitinibe, PLX3397, imatinibe, cobemitinibe e trametinibe; inibidores de PARP incluem piraparibe; inibidores da enzima B-Raf incluem vemurafenibe e dabrafenibe; agentes alquilantes incluem dacarbazina, ciclofosfamida e temozolomida; análogos de platina incluem carboplatina, cisplatina e oxaliplatina; análogos de nucleosídeo incluem azacitidina, capecitabina, fludarabina, fluorouracil e gemcitabina e; antifolatos incluem metotrexato e pemetrexede. Outros agentes quimioterápicos adequados para uso na presente invenção incluem defactinibe, entinostate, eribulina, irinotecano e vinblastina.

[0248] Os agentes terapêuticos preferenciais para administração com uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento são doxorubicina, mitoxantrona, ciclofosfamida, cisplatina e oxaliplatina.

[0249] A radioterapia para administração em combinação com uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser radioterapia ou braquiterapia de feixe externo.

[0250] Radionuclídeos para administração com uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em: ítrio-90, iodo-131, bismuto-213, astatina-211, lutétio 177, rênio-188, cobre-67, actínio-225, iodo-125 e térbio-161.

[0251] Um agente imunoterápico para administração em combinação com uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser uma molécula de anticorpo terapêutica, nucleotídeo, citocina ou terapia à base de citocina. Por exemplo, a molécula de anticorpo terapêutica pode se ligar a uma molécula regulatória imunológica, por exemplo, uma molécula de ponto de checagem inibitório ou uma molécula coestimulatória imunológica, um receptor do sistema imunológico inato, ou um antígeno de tumor, por exemplo, um antígeno de tumor de superfície de célula ou um antígeno de tumor solúvel. Exemplos de moléculas regulatórias imunológicas às quais a molécula de anticorpo terapêutica pode se ligar incluem CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, PD-L1, PD-1, CD47, CD73, CSF-1R, KIR, CD40, HVEM, IL-10 e CSF-1. Exemplos de receptores do sistema imunológico inato aos quais a molécula de anticorpo terapêutica pode se ligar incluem receptores de TLR4, TLR7, TLR9, similar a RIG-I (por

exemplo, RIG-I e MDA-5), e STING. Exemplos de antígenos de tumor aos quais a molécula de anticorpo terapêutica pode se ligar incluem HER2, EGFW, CD20 e TGF-beta.

[0252] O nucleotídeo para administração em combinação com uma molécula de anticorpo como descrito no presente documento pode ser um siRNA.

[0253] As citocinas ou terapia à base de citocina podem ser selecionadas a partir do grupo que consiste em: IL-2, pró-fármaco de IL-2, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-9, IL-15, IL-18, IL-21 conjugados, e interferon tipo I.

[0254] Vacinas antitumorais para o tratamento de câncer foram ambas implantadas na clínica e discutidas em detalhes na literatura científica (como Rosenberg, S. 2000 Development of Cancer Vaccines). Isso envolve principalmente estratégias para estimular o sistema imunológico a responder a vários marcadores celulares expressos por células cancerosas autólogas ou alogênicas com o uso daquelas células como um método de vacinação, com ou sem fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). O GM-CSF provoca uma forte resposta na apresentação de antígenos e trabalha particularmente bem quando empregado com as ditas estratégias.

[0255] Os recursos revelados na descrição anterior, ou nas seguintes reivindicações, ou nos desenhos anexos, expressos em suas formas específicas ou em termos de um meio para realizar a função revelada, ou um método ou processo para obter os resultados revelados, como adequado, pode, separadamente, ou em qualquer combinação de tais recursos, ser usados para realizar a invenção de diversas formas da mesma.

[0256] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com as modalidades exemplificativas descritas acima, diversas modificações e variações equivalentes serão evidentes àqueles elementos versados na técnica dada essa revelação. Consequentemente, as modalidades exemplificativas da invenção apresentadas acima são consideradas como ilustrativas e não são limitantes. Várias alterações às modalidades descritas podem ser feitas sem se afastar do espírito e do escopo da invenção.

[0257] Para evitar qualquer dúvida, quaisquer explicações teóricas fornecidas no presente documento são fornecidas para fins de aprimorar o entendimento de um leitor. Os inventores não desejam se ligar a qualquer uma dessas explicações teóricas.

[0258] Quaisquer dentre os cabeçalhos de seção usados no presente documento são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito.

[0259] Ao longo deste relatório descritivo, que inclui as reivindicações que seguem, salvo caso o contexto exija o contrário, a palavra "compreende" e "inclui", e variações como "compreendem", "que compreende", e "que inclui" será entendida como implicando a inclusão de um número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas declarados, porém não implicando a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

[0260] Deve ser observado que, como usado no relatório específico e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o" incluem referentes no plural, exceto se o contexto claramente ditar de outro modo. As faixas podem ser

expressas no presente documento como a partir de "cerca de" um valor particular, e/ou a "cerca de" outro valor particular. Quando tal faixa for expressa, será incluído outra modalidade a partir do um valor particular e/ou ao outro valor particular. De modo similar, quando os valores são expressos como aproximações, pelo uso do antecedente "cerca de," ficará entendido que o valor em particular forma uma outra modalidade. O termo "cerca de" em relação a um valor numérico é opcional e significa, por exemplo, +/- 10 %.

Exemplos

Exemplo 1: Seleção e caracterização de antígeno

[0261] Os métodos de seleção e triagem usados para identificar mAb² que têm a capacidade para se ligarem ao PD-L1 e a CD137 e CD137 agonista exigido para o uso de vários antígenos PD-L1 e CD137. A produção desses antígenos é descrita em maiores detalhes abaixo.

1.1 Antígenos CD137 recombinantes

[0262] Os membros da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral (TNFRSF), como CD137, são conhecidos por suas tendências para formar multímeros que se agrupam quando ligados aos seus ligantes cognatos (Croft, M. 2003). Essa propensão para agregarem suas funcionalidades torna desafiador produzir proteínas recombinantes solúveis que não agregam em solução para uso em seleções *in vitro*, como exibição de fago e levedura e para caracterização de proteínas selecionadas.

[0263] Diversos antígenos recombinantes comercialmente disponíveis foram testados e a maior parte se mostrou inadequada para uso nessas seleções devido aos níveis de agregados presentes. Dentre esses testados, apenas a

proteína de fusão de hFc CDR137 secretado humano e biotinilada (BPS Biosciences, número de catálogo 71171), designada “hCD137-hFc-Avi-BPS” doravante no presente documento, teve agregação baixa o suficiente para ser adequada e foi usada nas seleções, embora com sucesso limitado (consultar o **Exemplo 2**).

[0264] Visto que a maior parte dos antígenos comercialmente disponíveis foi considerada como inadequada, os seguintes antígenos recombinantes CD137 diméricos e monoméricos (consultar a **Tabela 1**), foram produzidos internamente para uso nas seleções:

Tabela 1: Antígenos CD137

Tipo	Designação	Espécie	Solúvel ou célula	Biotinilado	Formato de Antígeno
Recombinante	mCD137-mFc-Avi	Camundongo	Solúvel	Sim	Dímero
Recombinante	mCD137-Avi-His	Camundongo	Solúvel	Sim	Monômero
Recombinante	hCD137-mFc-Avi	Humano	Solúvel	Sim	Dímero
Recombinante	hCD137-Avi-His	Humano	Solúvel	Sim	Monômero
Recombinante	cCD137-mFc-Avi	Cino	Solúvel	Sim	Dímero

[0265] Os antígenos monoméricos foram produzidos por clonagem de DNA que codifica um domínio extracelular do CD137 humano (SEQ ID NO: 186) ou de camundongo (SEQ ID NO: 188) em conjunto com uma sequência de Avi e seis resíduos de histidina C-terminal em vetores de pFUSE modificados (Invivogen número de catálogo pfuse-mg2afc2) com o uso de enzimas de restrição de EcoRI-HF e BamHI-HF. Os vetores foram transfectados em células HEK293-6E (National Research Council of Canada [Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá]), e CD137 expresso foi purificado com o uso de coluna de níquel

de excel HisTrap™ (GE LifeSciences 29048586) e cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para garantir que o antígeno fosse uma espécie única e não tivesse agregados.

[0266] Para produzir os antígenos diméricos, os construtos de DNA que codificam um domínio extracelular de CD137 humano, de camundongo ou cinomolgo fusionado com o domínio Fc de mIgG2a em conjunto com uma sequência de Avi foram clonados em vetores de pFUSE modificados e transfectados em células HEK293-6E. CD137 recombinante foi purificado com o uso de coluna de proteína A MabSelect SuRe™ (GE Healthcare, 11003494) e cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para garantir que o antígeno fosse uma espécie única e não tivesse agregados.

[0267] Cada um dentre os antígenos diméricos e monoméricos foi biotinilado com o uso de um kit de reação de proteína ligase de biotina-biotina de BirA (Avidity LLC, BirA500) para produzir antígenos monoméricos CD137 identificados como uma molécula de biotina simples e antígenos diméricos CD137 etiquetados com duas moléculas de biotina, uma para cada um dos dois monômeros. 3 mg de antígeno foram misturados com 7,8 µl de mistura de enzima BirA a uma razão molar de enzima para substrato de 1:50. Os aditivos foram, então, adicionados de acordo com as recomendações do fabricante (142 µl de Biomix A, 142 µl de Biomix B, 142 µ de Biotina) e a mistura de reação foi incubada por duas horas à temperatura ambiente. Para manter a integridade da proteína biotinilada, a mistura de reação teve tampão imediatamente trocado por DPBS (Life Technologies 14190-169) com o uso de filtros de 30 µm Amicon (Merck Millipore UFC503096).

[0268] As proteínas foram adicionalmente purificadas por SEC para garantir a remoção da enzima BirA e a produção de uma preparação de proteína monodispersada de alta qualidade final sem agregados de alto peso molecular. Em maiores detalhes, os materiais do mesmo lote de produção foram misturados e analisados quanto a estabilidade e pureza por cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (SE-HPLC), eletroforese em gel de poliacrilamida de SDS (SDS-PAGE), e cromatografia por exclusão de tamanho com dispersão de luz em múltiplos ângulos (SEC-MALS). A biotinylation completa das proteínas foi confirmada em um gela de SDS-PAGE de troca de estreptavidina. Confirmou-se que os antígenos humano e de camundongo recombinantes se ligam aos anticorpos de controle positivo de anti-CD137 (20H4.9 (Patente nº US7288638)) e Lob12.3 (Universidade de Southampton), respectivamente) *in vitro* por ressonância de plasmon de superfície (SPR) e às células DO11.10 que expressam ligante CD137 humano e de camundongo por citometria de fluxo. As células foram incubadas com os antígenos CD137 por 1 hora, e, então, um anticorpo de fragmento Fc anticamundongo identificado de modo fluorescente foi usado para detectar a ligação de célula. Confirmou-se que o antígeno cino recombinante se ligou às células DO11.10 (National Jewish Health [Saúde Judaica Nacional]) que expressam ligante CD137 cino por citometria de fluxo como descrito acima. Para garantir a maior pureza possível para os materiais usados nos protocolos de seleção, através de caracterização de proteína dos antígenos foi realizada para garantir que a presença de agregados de proteína não excedeu 2 %.

1.2 Antígenos de CD137 expressos em célula

[0269] As células DO11.10 (National Jewish Health [Saúde Judaica Nacional]) que expressam CD137 de camundongo (SEQ ID NO: 187) ou CD137 humano de comprimento completo (SEQ ID NO: 185), designadas "DO11.10.mCD137" e "DO11.10.hCD137" respectivamente, foram produzidas a fim de apresentar o antígeno em uma confirmação de ligação à membrana, mais similar a sua forma natural, para seleções e caracterização adicional de Fcabs selecionados, como listado na **Tabela 2**.

[0270] A transdução lentiviral foi usada para gerar essas células DO11.10 que sobrepreexpressam receptores CD137 humano ou camundongo com o uso do Sistema de Embalagem Lenti-X HTX (Clontech, número de catálogo 631249). O vetor de expressão Lenti-X (pLVX) (Clontech, número de catálogo 631253) que contém cDNA que codifica o CD137 humano (SEQ ID NO: 185) ou que codifica o CD137 de camundongo (SEQ ID NO: 187), foi co-transfectado com uma Mistura de Embalagem HTX Lenti-X na Linhagem de Células 293T de Lenti-X (Clontech, nº de catálogo 632180) para gerar vírus. A linhagem de células DO11.10 foi, então, transduzida com esses vetores lentivirais.

[0271] A expressão de CD137 humano ou CD137 de camundongo nessas células foi confirmada pela ligação de anticorpos de controle positivo anti-CD137 20H4.9 e Lob12.3, respectivamente, às células por citometria de fluxo. As células foram incubadas com os anticorpos de controle positivo humanos ou de camundongo por 1 hora e, então, um anticorpo de detecção Fc anti-humano etiquetado de modo fluorescente (Stratech Scientific Ltd, número de catálogo 109-546-098-JIR) foi usado para detectar a ligação

de célula.

[0272] As células DO11.10 que expressam CD137 de cinomolgo (SEQ ID NO: 189), designadas "DO11.10.cCD137", também foram geradas com o uso da mesma metodologia de transdução lentiviral e usadas para testar a reatividade cruzada de Fcabs de CD137 anti-humano com CD137 de cinomolgo. A expressão de CD137 de cinomolgo foi confirmada por ligação de um anticorpo de controle positivo anti-CD137 (MOR7480.1, documento US2012/0237498 A1) às células pela citometria de fluxo como descrito anteriormente.

Tabela 2: CD137 expresso em célula

Tipo	Designação	Espécie	Apresentação
Célula	DO11.10.hCD13 7	Humano	Expresso em célula
Célula	DO11.10.mCD13 7	Camundongo	Expresso em célula
Célula	DO11.10.cCD13 7	Cino	Expresso em célula

1.3 PD-L1 de camundongo e humano etiquetado com CD4⁺ e Fc

[0273] Antígenos PD-L1 humano e de camundongo com proteínas de fusão foram gerados para uso em seleções e triagem de anticorpo. Os antígenos foram expressos com uma etiqueta de His C-terminal bem como um CD4⁺ de rato monomérico, etiqueta de domínios 3 e 4 (rCD4) (Brown e Barclay, 1994), um domínio Fc de IgG1 humano dimérico ou, para PD-L1 humano apenas, uma etiqueta de Avi (que resulta em hPD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 195), hPD-L1-Fc-His (SEQ ID NO: 196), mPD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 197), mPD-L1-Fc-His

(SEQ ID NO: 198) e hPD-L1-His-Avi (SEQ ID NO: 199). A produção de antígenos em formatos diferentes permitiu a eliminação de ligantes de etiqueta durante ciclos sequenciais de fago de anticorpo que exibe movimentação. Os plasmídeos de expressão que codificam os antígenos foram transfectados em células HEK293, como descrito por Chapple et al., 2006. Os tensoativos foram colhidos 5 dias após a transfecção e os antígenos secretados foram purificados por cromatografia por afinidade Ni-NTA sefarose (Schofield et al., 2007). Os antígenos PD-L1 que contêm rCD4 e Fc foram biotinilados com o uso de reagente de Sulfo-NHS-Biotina EZ-link (Thermo Fisher Scientific, código de produto 21326) seguindo as recomendações do fabricante. O produto de reação de biotinilação foi filtrado em gel e a fração monomérica foi coletada. A fração monomérica foi usada para todas as seleções que exibem fago de fase de solução. O número médio de biotinas por molécula foi de 1 a 3 biotinas por monômero de PD-L1, como determinado com o uso de Kit de Quantificação de Biotina por Fluorescência (Thermo Fisher Scientific, código de produto 46610).

Exemplo 2: Seleção e caracterização de Fcabs de CD137 anti-humano

2.1 Seleção de naïve de Fcabs de CD137 anti-humano

[0274] A fim de selecionar Fcabs que se ligam a CD137 humano, as campanhas de seleção de exibição de levedura e fago foram empregadas, para maximizar a diversidade de Fcabs identificados. Tanto CD137 humano quanto CD137 humano dimérico recombinante exibiram superfície celular e foram usados para fornecer uma variedade de formatos de antígeno, a fim de exercer pressão de seleção acionada por avides

contra proteínas CD137 dimérico ou multimérico. Obter um Fcab que se ligou avidamente aos complexos de CD137 em vez de com alta afinidade a CD137 monomérico foi considerado benéfico devido a tal Fcab alvejar preferencialmente células T ativadas e iniciadas apenas, em que a regulação ascendente de CD137 ocorre após o estímulo de célula T. Sem desejar se ligar por teoria, hipotetizou-se que as células T com níveis muito baixos ou dispensáveis de expressão de membrana de CD137 seriam mais propensos a ter CD137 no estado monomérico, diferente de células T ativadas com CD137 altamente regulado de modo ascendente em que a maior parte das proteínas estaria em estados dimérico, trimérico ou multimérico superior. Como resultado das seleções acionadas por avides, o Fcab preferencialmente se ligaria às células T ativadas e não se ligaria bem às células T naíve que exibem apenas CD137 monomérico. Selecionando-se um Fcab CD137 ávido a ativação de célula T sem alvo potencial seria reduzida, com toxicidade reduzida associada.

[0275] Seis bibliotecas de fagos naíve que exibem o domínio CH3 de IgG1 humano foram usadas para seleções por exibição de fago. Todas as seis bibliotecas compreenderam laços de AB aleatorizados (que compreendem resíduos nas posições 14-18 de acordo com numeração IMGT) e laços de EF aleatorizados (que compreendem resíduos nas posições 92-101, de acordo com numeração IMGT). Uma dentre as bibliotecas compreendeu clones com uma inserção de dois ou quatro aminoácidos (codificados por dois ou quatro códon de NNK) na posição 101 na alça de EF (os resíduos inseridos estão nas posições 101,4 - 101,1, de acordo com numeração IMGT).

[0276] 3230 clones de fago foram triados por ELISA de fago

quanto à ligação ao antígeno hCD137 recombinante dimérico e o Fc recombinante foi usado como um controle negativo. 1140 clones de fago foram triados por FACS de fago quanto a ligação às células DO11.10.hCD137. Manifestações individuais foram, então, sequenciadas e as 76 sequências únicas resultantes foram atribuídas com um identificador de clone de Fcab e subclonadas um vetor de expressão pTT5 (National Research Council of Canada [Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá]) que contém um cassete de expressão de cadeia pesada de HelD1.3 IgG1 para propósitos de expressar os clones de Fcab em formato de mAb² (consultar o **Exemplo 3.2**).

[0277] Quatro bibliotecas de levedura naïve que exibem CH1 aos domínios CH3 de IgG1 humano foram usadas para seleção por exibição de levedura. Todas as quatro bibliotecas compreenderam laços de AB aleatorizados (que compreendem resíduos nas posições 14 a 18 de acordo com numeração IMGT) e laços de EF aleatorizados (que compreendem resíduos nas posições 92 a 101, de acordo com numeração IMGT) no domínio CH3. Duas dentre as bibliotecas compreenderam adicionalmente uma inserção de cinco resíduos de aminoácido na posição 16 na alça de AB do domínio CH3 (resíduos nas posições 16,5 a 16,1, de acordo com numeração IMGT).

[0278] 2784 clones simples de levedura identificados a partir de seleções de biblioteca foram triados quanto à ligação de antígeno com o uso de um ensaio de ligação de antígeno por citometria de fluxo que envolveu incubar as células com antígeno humano dimérico recombinante biotinilado ou fragmento Fc de camundongo para discriminar contra ligações de clones de levedura à porção Fc do antígeno hCD137 recombinante. As seleções foram repetidas com

concentrações e condições de antígeno variantes, como temperatura de indução crescente, diminuição da estringência de seleção ou redução de número de ciclos a fim de aumentar o número de manifestações. O sequenciamento de manifestação revelou diversidade de saída consideravelmente baixa, em que apenas 9 clones de Fcab têm sequências únicas identificadas: FS22-053, FS22-172, FS22-173, FS22-174, FS22-175, FS22-176, FS22-177, FS22-178 e FS22-179.

2.2 Preparação de Fcabs de CD137 anti-humano em formato de mAb² "simulado"

[0279] Os anticorpos mAb² "simulados" que consistem em moléculas de IgG1 que compreendem os 76 clones de Fcab CD137 anti-humano isolados de fago e 9 clones isolados de seleções de levedura foram produzidos para permitir a caracterização dos Fcabs em um formato de mAb². Os mAb² simulados foram preparadas substituindo-se parte dos Fcabs de domínio CH3 que compreende os laços de AB, CD e EF, para a região correspondente do domínio CH3 do anticorpo de lisozima de ovo anti-hen HelD1.3. A geração do anticorpo HelD1.3 é descrita em Tello *et al.* 1993. As sequências de cadeia pesada e leve de anticorpo HelD1.3 são conhecidas em SEQ ID **191** e **159**, respectivamente. As moléculas de mAb² simulados foram produzidas por expressão transiente em células HEK293-6E. Para avaliar a quantidade de proteína produzida, o teor de proteína de IgG foi quantificado por Interferometria BioLayer com o uso da plataforma Octet QKe com biossensores de quantificação de Proteína A da PALL (18-5021). As proteínas foram purificadas por cromatografia por afinidade de proteína A com o uso de colunas de mAb SelectSure. 53 proteínas de mAb² CD137 derivadas por fago apresentaram

medições abaixo do limite de detecção e, portanto, foram determinadas como inadequadas para análise adicional. 32 mAb² foram purificados com o uso de colunas de proteína A de mAb Select SuRe (GE Healthcare, 11003494).

[0280] Uma seleção desses mAb² foi, então, testada quanto a ligação ao antígeno recombinante humano (hCD137-mFc-Avi biotinilado) com o uso de Interferometria BioLayer (BLI) com o uso da plataforma Octet QKe. 12 mAb² não se ligaram e 19 se ligaram a sensores revestidos com CD137 (FS22-007, FS22-033, FS22-042, FS22-049, FS22-050, FS22-052, FS22-053, FS22-054, FS22-169, FS22-172, FS22-173, FS22-174, FS22-179, FS22-180, FS22-181, FS22-183, FS22-187, FS22-194, FS22-195).

2.3 Atividade de mAb² simulados anti-CD137 selecionados em um ensaio de repórter NF-κB humano

[0281] A multimerização e o agrupamento são exigidos para sinalização de TNFR (Bitra et al., 2017). CD137 agrupa e ativa a trajetória de sinalização de NF-κB quando o mesmo interage com seu ligante cognato, CD137L. As moléculas agonistas imitam o ligante no acionamento do agrupamento e da ativação de CD137, portanto, ativando a trajetória de sinalização de NF-κB. Sabe-se que alguns anticorpos agonísticos podem causar, inerentemente, o agrupamento de CD137 mediante a ligação, por exemplo, urelumabe, enquanto que outros exigem reticulação adicional do próprio anticorpo para induzir o agrupamento de CD137, como utomilumabe (Fisher et al, 2012). Os receptores Fc gama em células efetoras são conhecidos por induzir tal reticulação *in vivo*, embora isso seja ineficiente e possa ocorrer distante do sítio de interesse terapêutico. Visto que as toxicidades dose-limitantes foram associadas ao urelumabe, mas não ao

utolimumabe, decidiu-se selecionar por Fcabs de ligação ao anti-CD137 que não tiveram a habilidade para agonizar inerentemente, mas selecionar apenas aqueles que exigem a reticulação adicional a fim de induzir o agrupamento de CD137. Portanto, foi desenvolvido um ensaio que pode detectar a ativação da trajetória de sinalização de NF- κ B em uma célula mediante o agrupamento de CD137 expresso na superfície celular por anticorpos reticulados, mas que mostraram pouca atividade quando os anticorpos foram reticulados. Esse ensaio foi, então, usado para testar a atividade funcional agonística de 27 clones de Fcab anti-CD137 em formato de mAb² simulados, e 6 clones de Fcab anti-CD137 em formato de mAb² anti-CD20, independentemente da possibilidade de se constatar que os Fcabs se ligam ao antígeno recombinante por BLI ou não.

[0282] Isso pode ser medido pela ativação da trajetória de sinalização de NF- κ B no ensaio. A proteína L foi usada como um agente de reticulação para acionar a reticulação dos mAb² simulados por meio das porções de Fab no ensaio e a ativação de NF- κ B foi medida.

[0283] cDNA que codifica CD137 humano (SEQ ID NO: 185) foi subclonado em vetor de pMSCV-neomicina (Takara Clontech, Cat. 634401) com o uso de enzimas de restrição de EcoRI-HF e XhoI. A linhagem celular RetroPack PT67 (Clontech, Cat. 631510) foi usada para produzir partículas retrovirais seguindo os protocolos do fabricante. Esse retro vírus foi subsequentemente usado para transduzir células HEK.FRT.luc que foram anteriormente geradas transduzindo-se uma linhagem de células Flp-In T-REx 293 HEK (Life Technologies, R780-07) com lentivírus de Repórter de NF κ B Qiagen Signal Lenti (luc)

(Qiagen, nº de catálogo 336851) que contém um promotor sensível a NF- κ B que controla a expressão de luciferase. Essas células HEK.FRT.luc.hCD137 foram usadas para triar os mAb² simulados que contêm os ligantes CD137 identificados nas seleções.

[0284] Uma diluição de 2 μ M de cada um dos mAb² simulados foi preparada em DPBS (Life Technologies, 14190169) e adicionalmente diluída 1:3 em meio celular repórter (DMEM (Gibco, Cat. 61965-026); 10 % de FCS (Gibco, Cat. 10270-106); 1x PennStrep (Gibco, Cat. 15140-122); Blasticidina de 15 μ g/ml (Melford Laboratories Ltd. Cat. B1105); Puromicina de 5 μ g/ml (Life technologies, Cat. A11113803); Zeocina de 100 μ g/ml (InvivoGen, Cat. 11006-33-0); Geneticina de 500 μ g/ml (Life Technologies, Cat. 10131-027). Proteína L (Life Technologies, 21189), foi usada como um agente de reticulação artificial e foi misturada com as moléculas de mAb² em uma razão molar de 1:4. Após uma incubação de 24 horas, as células foram tratadas com 100 μ l de reagente de ensaio de luciferase Promega Bio-Glo™ (Promega número de catálogo G7941) de acordo com as instruções do fabricante e a luminescência foi medida com um tempo de integração de 0,5 segundos em um leitor de placa com o Software Gen5, BioTek. Os valores de luminescência são uma medição da luciferase produzida em resposta à ativação da trajetória de sinalização de NF- κ B pelo agrupamento de CD137 induzido por Fcabs reticulados. Os valores de luminescência foram plotados versus a concentração de log de Fcab e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0285] As manifestações foram identificadas por ter pelo

menos um aumento de 10 vezes em sinal de luciferase quando reticuladas com proteína L como em comparação com quando não foram reticuladas. Esses clones foram determinados como com a capacidade para induzir o agrupamento de CD137 e a ativação subsequente de trajetórias de sinalização a jusante. Dentre todos os clones testados, dois tiveram a capacidade para induzir esse aumento de 10 vezes em luciferase na reticulação, FS22-053 e FS22-172, embora um EC₅₀ não possa ser determinado para qualquer um desses. Ambos foram selecionados para caracterização adicional em um ensaio de ativação de célula T DO11.10. Surpreendentemente, a atividade não foi observada para os clones restantes em condições reticuladas independentemente da ligação a CD137 alvejada por BLI, em que indica, talvez, que os mesmos se ligaram a um epítipo irrelevante em CD137, ou que a afinidade de tais clones não foi suficiente para se ligar a CD137 forte o suficiente para iniciar a cascata de sinalização de NF-κB.

[0286] De modo geral, embora mais que 30 Fcabs fossem testados, apenas dois Fcabs (FS22-053 e FS22-172) foram identificados a partir das seleções de naïve que exibiram a função desejada no ensaio de repórter de NF-κB quando reticulados e tiveram pouca atividade quando não foram reticulados.

2.4 Atividade dos mAb² simulados anti-CD137 selecionados em um ensaio de ativação de célula T DO11.10

[0287] O agrupamento de CD137 por meio de moléculas agonistas em células T ativadas sucinta a ativação de célula T e sinalização a jusante que resulta em, porém sem limitação, produção de IL-2. Visto que FS22-053 e FS22-172 foram identificados como tendo atividade no ensaio de

repórter de NF- κ B, suas habilidades para ativar CD137 foram testadas em um ensaio de ativação de célula T. Um ensaio de ativação de célula T DO11.10 com o uso de células T DO11.10 geneticamente modificadas para superexpressar CD137 humano foi desenvolvido e a ativação de célula T foi avaliada medindo-se a liberação de IL-2.

[0288] As células T DO11.10 (National Jewish Health [Saúde Judaica Nacional]) foram transduzidas com um vetor lentiviral projetado para superexpressar CD137 de camundongo ou humano como descrito anteriormente. Bem como FS22-053 e FS22-172, os seguintes clones foram testados nesse ensaio de ativação de célula T DO11.10: FS22-007, FS22-033, FS22-042, FS22-049, FS22-050, FS22-052, FS22-054, (todos em formato de mAb² HelD1.3 "simulado"). As diluições de mAb² ou mAb de controle positivo 20H4.9 com ou sem reticulador de Proteína L recombinante (Life Technologies, 21189) foram preparadas e adicionadas às células DO11.10.hCD137 em uma placa de fundo redondo de 96 poços que foi revestida durante a noite com 0,1 µg/ml de anticorpo anti-CD3 (clone 17A2, BioLegend, 100208). Após uma incubação de 18 horas, os tensoativos foram coletados e ensaiados com kit ELISA de IL-2 de camundongo (eBioscience, 88-7024-86) seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com Software Gens, BioTek. Os valores de absorbância de 570 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gens, BioTek). A concentração de mL-2 foi plotada vs a concentração de log de mAb² ou mAb de referência e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso

do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0289] Os clones FS22-053 e FS22-172 mostraram atividade significativamente intensificada quando reticulados com Proteína L nesse ensaio. FS22-053 teve uma atividade de 126 nM quando não reticulado e uma atividade de 21 nM quando reticulado (um aprimoramento de 6 vezes), enquanto FS22-172 teve uma atividade de 950 nM quando não reticulado e uma atividade de 44 nM quando reticulado (um aprimoramento de 22 vezes). Como resultado, ambos os clones foram selecionados para maturação de afinidade.

[0290] O **Exemplo 2.4** mostra que FS22-053 e FS22-172 podem acionar o agrupamento e a ativação de CD137 na superfície de células T DO11.10 quando reticulados pela Proteína L nos formatos de mAb² testados.

Exemplo 3: Maturação de afinidade de Fcabs de CD137 anti-humano e caracterização subsequente

[0291] Como discutido anteriormente, dois clones foram selecionados para maturação de afinidade com base em suas características funcionais no ensaio de repórter de NF- κ B, os ensaios de ativação de célula T DO11.10 FS22-053 e FS22-172).

3.1 Maturação de afinidade de FS22-053 e FS22-172

[0292] Quatro bibliotecas exibiram levedura foram construídas a partir dos clones de Fcab FS22-053 e FS22-172. Sete resíduos (nas posições 15-16,1 de acordo com IMGT) foram aleatorizados com o uso de iniciadores ELLA na alça de AB do domínio CH3 de cada clone para compor as bibliotecas FS22-053 AB e FS22-172 AB. Cinco resíduos (nas posições 92-94 e 97-98 de acordo com IMGT) foram aleatorizados com o uso de iniciadores ELLA na alça de EF do domínio CH3 que resulta em

bibliotecas FS22-053 EF e FS22-172 EF.

[0293] Para as bibliotecas de AB FS22-053 e EF FS22-053, e AB FS22-172 e EF FS22-172, três ou quatro ciclos de seleção foram realizados nas bibliotecas de levedura para selecionar quanto aos clones amadurecidos por afinidade com o uso de antígeno hCD137-mFc-Avi dimérico ou antígeno hCD137-Avi-His monomérico. O antígeno monomérico foi usado na alteração com antígenos diméricos para garantir que os clones mantivessem a afinidade ao antígeno e não se ligassem exclusivamente através de avides. O uso de antígeno monomérico ou dimérico, bem como a concentração usada, foi determinado empiricamente durante cada ciclo por citometria de fluxo, determinado pela possibilidade de enriquecimento contra o antígeno monomérico ou dimérico ter sido observada no ciclo anterior. Sempre que possível, uma porta de ordenação acima da parental foi usada para isolar os clones amadurecidos por afinidade em comparação com a molécula parental. A pressão de seleção foi aumentada até 1 nM de antígeno dimérico. Durante cada ciclo de seleção, clones individuais foram localizados em placas de ágar para avaliar o progresso da seleção. Cada clone foi cultivado e induzido individualmente e em seguida seus parâmetros de ligação e estruturais foram determinados por citometria de fluxo com o uso de antígeno dimérico biotinilado bem como marcadores estruturais anti-CH2, como descrito anteriormente. Essa cascata de triagem foi seguida para permitir a determinação de sucesso de seleção com base em uma amostra de clones do resultado de seleção e para permitir a triagem precoce de clones individuais que podem ser subsequentemente produzidos como proteínas solúveis.

[0294] 1152 clones simples de levedura no total foram

triados quanto a ligação ao antígeno recombinante biotinilado em uma citometria de fluxo de ligação de antígeno, como descrito anteriormente. As seleções na biblioteca de EF FS22-053 resultaram em enriquecimento de 138 sequências de alça único. De modo semelhante, 30 sequências de alça único foram isoladas da biblioteca de AB FS22-172. As bibliotecas de AB FS22-053 e EF FS22-172 não contiveram quaisquer clones que mostraram qualquer aprimoramento de ligação ao longo dos clones parentais. A análise de sequência ao longo dos clones de melhor ligação das bibliotecas de EF FS22-053 e AB FS22-172 revelaram uma sequência de PPY conservada padrão nos laços de AB.

[0295] A presença de um motivo PPY conservado pode promover a formação de uma região de ligação estendida pela introdução de uma alça mais rígida ou exposta com base mediante na flexibilidade limitada de resíduos de prolina. Alternativamente, demonstrou-se que a sequência de PPY pode representar um motivo conservado específico envolvido na ligação para esses clones como sequências ricas em prolina se liga às sequências aromáticas em proteínas de domínio SH3. Ademais, visto que a sequência de PPY conservado foi selecionada para, independentemente, em duas linhagens separadas de Fcabs, pode ser importante para o epítopo se ligar a CD137. Adicionalmente, um padrão de sequência de LE ou LD conservado nos laços de EF do domínio CH3 dos clones tanto da linhagem FS22-053 quanto da linhagem FS22-172, que sugere que esse motivo de aminoácido na alça de EF é exigido para ligação aprimorada.

[0296] A fim de avaliar o progresso das seleções e a possibilidade de ser necessário recombinar laços de AB e EF

mutados entre clones amadurecidos por afinidade, os cinco clones únicos principais da biblioteca de EF FS22-053 (FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012) classificados por apresentar ligação específica ao antígeno humano dimérico de 10 nM (maior que 30 % de células positivas de APC em um ensaio de ligação de citometria de fluxo), e os seis clones únicos principais da biblioteca de AB FS22-172 (FS22-172-001, FS22-172-002, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005, FS22-172-006, em que todos mostram células positivas de APC de acima 10 % quando triados com antígeno humano dimérico de 10 nM no mesmo ensaio) foram produzidos como mAb² simulados (HelD1.3) e mAb² modelo (PD-L1) para avaliar o aprimoramento funcional e cinético dos laços aleatorizados.

3.2 Construção de Fcabs de CD137 anti-humano em formato de mAb² "simulados" e "modelo"

[0297] 16 clones amadurecidos por afinidade derivados do clone FS22-053 parental (FS22-053-001 a FS22-053-016), e 6 clones amadurecidos por afinidade derivados dos clones FS22-172 parentais (FS22-172-001 a FS22-172-006) foram preparados em formato de mAb² "simulados" e "modelo". Os clones FS22-053-001 a FS22-053-007 não foram adicionalmente considerados visto que os mesmos não se expressam em formato de mAb² em um nível que permitiu a purificação a jusante para teste e caracterização adicional.

[0298] Os anticorpos mAb² "simulados" que compreendem os Fcabs de CD137 anti-humano em HelD1.3 foram preparados para caracterização adicional dos Fcabs amadurecidos por afinidade em formato de mAb². Esses mAb² foram preparados como descrito no **Exemplo 2.2**.

[0299] Os mAb² “modelo” também foram produzidos compreendendo os Fcabs de CD137 anti-humano e também uma região de Fab de ligação ao PD-L1 (clone YW243.55.S70 do documento US 8.217.149 B2). Esses foram preparados de maneira similar ao método descrito no **Exemplo 2.2** por substituição de parte do CH3 do anticorpo de ligação ao anti-PD-L1 que contém os laços de AB, CD e EF com a região correspondente do Fcab. Esses mAb² modelo de PD-L1 compreenderam uma mutação LALA no domínio CH2 (AA). A introdução da mutação LALA no domínio CH2 de IgG1 humano é conhecida por reduzir a ligação de receptor Fc γ (Bruhns, P., et al. (2009) e Hezareh M., et al. (2001)).

[0300] Os mAb² “simulados” CD137/HelD1.3 e “modelo” CD137-AA/PD-L1 foram produzidos por expressão transiente em células HEK293-6E e purificados com o uso de colunas de proteína A de mAb Select SuRe.

3.3 Atividade de Fcabs humanos em formato de mAb² simulados em Ensaio de Célula Repórter de NF- κ B humano

[0301] A atividade funcional dos Fcabs de CD137 anti-humano amadurecidos por afinidade em formato de mAb² simulados (HelD1.3) listados foi testada no mesmo ensaio de NF- κ B luciferase descrito no **Exemplo 2.3**. A luminescência foi medida com um tempo de integração de 0,5 segundo em um leitor de placa com Software Gen5, BioTek. Como esperado, nenhum dentre os Fcabs mostrou atividade sem reticulação de Proteína L (-XL). Todos os Fcabs de CD137 amadurecidos por afinidade mostraram um amplo aprimoramento ao longo de Fcabs de CD137 parenterais para os quais, embora fosse positivo nesse ensaio, o cálculo de um valor de EC₅₀ não foi possível (consultar o **Exemplo 2.3**). FS22-053-008 e FS22-172-003

mostraram a melhor atividade de cada família com o menor EC₅₀ (26,34 nM e 32,64 nM, respectivamente) quando reticulado com Proteína L (+XL).

3.4 Atividade de Fcabs humanos amadurecidos por afinidade em formato de mAb² modelo em ensaio de ativação de célula T DO11.10 humana

[0302] A atividade funcional dos Fcabs humanos amadurecidos por afinidade em formato de mAb² modelo (LALA de PD-L1) foi testada em um ensaio de ativação de célula T DO11.10, similar ao ensaio como descrito no **Exemplo 2.4**.

[0303] As células HEK.mPD-L1 foram produzidos por subclonagem de cDNA que codifica PD-L1 de camundongo (SEQ ID NO: 187) em vetor pcDNA5FRT (Life Technologies) com o uso de sítios de restrição KpnI e NotI e que transforma os vetores na linhagem de células Flp-In T-REx 293 (Life Technologies, R780-07) com o uso de Lipofectamine 2000 (Life Technologies, 11668-019). As células foram cultivadas em DMEM que contém 10 % de FBS, 100 µg/ml de Higromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475) e 15 µg/ml de Blastomicina (Melford Laboratories Ltd, B1105) por 3-4 semanas até que as colônias de células estavelmente transformadas tenham se formado. Essas colônias foram amplificadas na presença de 1 µg/ml de Doxomicina (Sigma Aldrich, D9891) e testadas quanto a expressão de PD-L1 com o uso de PE conjugado de anticorpo PD-L1 de anticamundongo (MIH5) (BD Biosciences, 558091).

[0304] As células foram desafixadas com o uso de tampão de dissociação de célula, lavadas com PBS e 2x10⁵ células foram plaqueadas em poços de uma placa de 96 poços e, então, incubadas com anticorpo diluído 1:20 em PBS por 1 hora em 4 °C. As células foram lavadas uma vez em PBS e, então,

medidas em um citômetro Accuri C6 (BD Biosciences) e os dados foram analisados com o uso de FlowJoX. A expressão de PD-L1 de camundongo foi novamente confirmada.

[0305] Os 15 clones produzidos no **Exemplo 3.2** nos mAb² CD137/PD-L1 foram testados nesse ensaio de ativação de célula T DO11.10. As diluições de mAb² ou mAb de controle positivo foram preparadas e adicionadas a células DO11.10.hCD137 ($7,5 \times 10^3$ células por poço) e HEK.mPD-L1 (2×10^4 células por poço) ou a células DO11.10.hCD137 ($7,5 \times 10^3$ células por poço) e HEK que não foram transduzidas para expressar mPD-L1 (2×10^4 células por poço) em uma placa de fundo plano de 96 poços que foram revestidas durante a noite com 0,1 µg/ml de anticorpo anti-CD3 (clone 17A2, BioLegend, 100208). Após uma incubação de 18 horas, os tensoativos foram coletados e ensaiados com kit ELISA de IL-2 de camundongo (eBioscience, 88-7024-86) seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com Software Gens, BioTek. Os valores de absorbância de 570 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gens, BioTek). A concentração de mIL-2 foi plotada vs a concentração de log de mAb² ou mAb de referência e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism. A ativação de célula T foi detectada medindo-se a liberação de mIL-2.

[0306] Nenhuma atividade de célula T foi observada sem reticulação por ligação às células que expressam PD-L1. Mediante a reticulação, todos os mAb² tiveram atividade de célula T potente como observado pela liberação de altos

níveis de mIL-2 e valores de EC_{50} sub-nanomolares. Todos os clones diferentes de FS22-053-009 e FS22-172-005, tiveram um EC_{50} menor que 0,3 nM, desse modo, foram tão bons quanto, se não melhores que, o controle positivo (mAb CD137 anti-humano, G1-AA/20H4.9). O menor $E_{máx}$, que é uma medição de ativação de célula T máxima, e pode ser relevante para atividade antitumoral de célula T maior *in vivo*, observado foi de 7758 pg/ml que foi maior que o controle positivo (mAb CD137 anti-humano, G1-AA/20H4.9).

3.5 Ensaio de ativação de célula T CD8⁺ humana primária

[0307] A habilidade dos Fcabs para ativar CD137 em células T que superexpressam CD137 foi mostrada no **Exemplo 3.3**. Para testar a atividade dos Fcabs nas células que não foram geneticamente modificadas para superexpressar CD137, foi necessário um ensaio de célula T humana primária. As células T CD8⁺ citotóxicas ativadas são responsáveis por matar diretamente células cancerígenas e expressar CD137 em suas superfícies celulares (Ye et al, 2014). O agrupamento de CD137 é conhecido por ser essencial para induzir a sinalização a jusante e a ativação de célula T CD8⁺ adicional. Um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ foi, portanto, usado para avaliar a habilidade de Fcabs (em formato de mAb², como detalhado abaixo) para acionar o agrupamento e sinalização a jusante subsequente de CD137. A ativação de célula T CD8⁺ foi determinada pela liberação de hIL-2.

[0308] Para isolar células T, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram coletadas a partir de cones de depleção de leucócito, um subproduto de doações de plaqueta. Resumidamente, teores de cone de leucócito foram

lavados com PBS e revestidos em um gradiente Ficoll (Sigma-Aldrich, 1440-02). PBMCs foram coletadas por centrifugação e as células que não cruzaram o gradiente Ficoll foram recuperadas. PBMCs foram adicionalmente lavadas com PBS e as hemácias restantes foram lisadas através da adição de 10 ml de 1X tampão de lise de hemácia (eBioscience, 00-4300-54), de acordo com as instruções do fabricante. As células T CD8⁺ foram isoladas das PBMCs presentes no eluante com o uso do kit de isolamento de célula T CD8⁺ II (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-495), de acordo com as instruções do fabricante.

[0309] A incubação com um anticorpo anti-CD3 foi usada como um primeiro sinal para acionar ativação inicial das células T. As placas de cultura de tecido de fundo plano de 96 poços foram revestidas com 8 µg/ml anticorpo anti-CD3 (Clone UCHT1, R&D Systems, MAB100-SP) em PBS durante a noite em 4 °C. As placas foram, então, lavadas 3 vezes com 200 µl de PBS.

[0310] Para reticulação com base em célula de Fcabs de CD137 humano amadurecidos por afinidade em formato de mAb² modelo de PD-L1, as células HEK293 que superexpressam PD-L1 humano (HEK.hPD-L1) foram produzidas essencialmente como descrito no **Exemplo 5.3**, mas por subclonagem de cDNA que codifica a sequência de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 185) em vez de PD-L1 de camundongo. As células HEK.hPD-L1 foram plaqueadas a 2×10^5 células por poço nas placas de fundo plano de 96 poços revestidas com anticorpo anti-CD3 (8 µg/ml) em meio de cultura de célula T de 100 µl (meio de RPMI (Life Technologies, 61870-044) com 10 % de FBS (Life Technologies), 1X de Estreptomicina de Penicilina (Life Technologies, 15140122), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco,

11360-070), 10 mM de Hepes (Sigma-Aldrich, H0887), 2 mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, G7513) e 50 µM de 2-mercaptoetanol (Gibco, M6250)). Uma vez que as células HEK.hPD-L1 ou células HEK que não foram transduzidas para expressar hPD-L1 tenham se aderido após 4 horas de incubação, todo o meio de cultura de célula T foi removido e substituído com meio de cultura de célula T de 100 µl que contém células T em uma concentração de $5,0 \times 10^5$ células/ml que resulta em $5,0 \times 10^4$ células/poço.

[0311] Os mAb² foram diluídos em meio de célula T em concentração final de 2X que começa a 500 nM e um 1:3 de microtitulação foi realizado. 100 µl de microtitulação de mAb² foram adicionados às células por um volume de ensaio total de 200 µl e 1X de concentração de anticorpo.

[0312] O anticorpo anti-CD137 de controle positivo (G1-AA/20H4.9) e o anticorpo de IgG isotipo de controle negativo (G1-AA/He1D1.3) foram, cada um, diluídos em meio de célula T a uma concentração final de 2X que começa a 500 nM que contém 500 nM de agente de reticulação (anti-humano CH2, produzido internamente (Jefferis *et al.*, 1985 e Jefferis *et al.*, 1992) (mG1/MK1A6)) e uma microtitulação de 1:3 foi realizada. 100 µl de mistura de anticorpos/reticuladores de controle positivo ou mistura de IgG/reticulador de controle negativo diluídas foram adicionadas às células para um total de 200 µl de volume de ensaio e concentração de 1X de anticorpo.

[0313] O ensaio foi incubado a 37 °C, 5 % de CO₂ por 72 horas. Os tensoativos foram coletados e ensaiados com kit de ELISA de IL-2 humano Ready-SET-Go! (eBioscience, Cat. 88-7025-88) seguindo as instruções do fabricante. As placas

foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com o Software Gen5, BioTek. Os valores de absorbância de 630 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gen5, BioTek). A concentração de IL-2 humano (hIL-2) foi plotada vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0314] O mAb CD137 anti-humano de controle positivo, 20H4.9, mostra um aumento em liberação de hIL-2 com um EC₅₀ de 0,5 nM quando reticulado com o anticorpo anti-hCH2 (mG1/MK1A6). Todos os clones tiveram atividade no ensaio, em que a maioria exibiu boa potência com EC₅₀s submolares. Os mAb² que contêm Fcabs FS22-053-007, FS22-053-008, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005 elicitaram a maior resposta de célula T com o menor EC₅₀s na faixa de 0,19 - a 0,49 nM. Um subconjunto dos mAb² (que contém Fcabs FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-173-003 e FS22-172-004) também foi testado sem reticulação por PD-L1 expressa em células HEK e mostrou nenhuma atividade nesse ensaio, como esperado. Isso confirma a atividade observada no ensaio de NF-κB e ensaio de ativação de célula T D011.10.

3.6 Determinação de especificidade de Fcabs de CD137 anti-humano por Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR)

[0315] A especificidade dos Fcabs de CD137 anti-humano para CD137 humano em comparação com outros membros da família TNFSFR relacionados foi testada. 8 dos Fcabs foram testados em formato de mAb² simulados (HelD1.3) e medidos por SPR em

um Biacore T200 (GE Healthcare) por teste quanto a ligação a outros receptores de TNFRSF humanos: CD40, OX40 e GITR. O acoplamento de amina (kit de acoplamento de amina, GE Healthcare, BR-1000-50) foi usado para revestir CD40 humano, GITR e OX40 a aproximadamente 1000 RU em chips CM5 Biacore (GE Healthcare, nº de catálogo 29149603). As diluições de Fcabs de CD137 anti-humano em formato de mAb² simulados (FS22-053-008/HelD1.3, FS22-053-009/HelD1.3, FS22-053-010/HelD1.3, FS22-053-011/HelD1.3, FS22-053-012/HelD1.3, FS22-053-014/HelD1.3, FS22-172-003/HelD1.3, FS22-172-004/HelD1.3) que começam em 1 µM foram preparados em tampão de HBS-EP+ (BR100669) e injetados por 3 min a 30 µl/min e, então, foi permitido que o mesmo se dissociasse em tampão por 4 min. O chip foi regenerado por injeção de 10 mM de glicina, pH 2,5 por 12 s a 30 µl/min. Anticorpos específicos para os membros de TNFRSF diferentes foram usados como controles positivos para verificar revestimento de chip Biacore. Os dados foram substituídos por dupla referência e analisados com o uso de software BIAevaluation 3.2. Os Fcabs não se ligaram a qualquer um dos receptores de TNFRSF testados, demonstrando sua especificidade para CD137. Como resultado, não se espera que os Fcabs, ou mAb² que compreendem os sítios de ligação do antígeno desses Fcabs, elicitarão ligação sem alvo a qualquer outro além de CD137.

3.7 Afinidade de ligação de Fcabs de CD137 anti-humano em formato de mAb² simulados para CD137 humano, de cinomolgo e de camundongo por SPR e geração de FS22-053-017

[0316] A afinidade dos Fcabs de CD137 anti-humano (FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-172-004, FS22-172-004) em um formato de mAb² simulados (consultar **Exemplo 3.2**)

para CD137 humano, de cinomolgo (cino) e de camundongo foi medida por SPR, para determinar a possibilidade de os Fcabs poderem ser úteis para teste em estudos de animal. Um anticorpo de captura de Fab humano foi imobilizado em todas as quatro células de fluxo de um chip série S CM5 (GE Healthcare #BR-1005-30) a uma densidade de superfície média de 6000 RU seguindo as recomendações do fabricante (GE Healthcare, Kit de captura de Fab humano, n° 28958325). A imobilização a 25 °C e 10 µl/min de taxa de fluxo obteve uma resposta final média de 6000 RUs. Cada mAb² foi capturado a aproximadamente 150 RU injetando-se uma solução de mAb² de 3 µg/ml diluída em tampão de HBS-EP+ (GE Healthcare n° BR1006-69) por 60 segundos a 30 µl/min. Então, concentrações diferentes de antígeno CD137 humano, cino ou de camundongo (CD137-mFc-Avi humano, cino ou de camundongo não biotinilado ou CD137-Avi-His humano) em tampão de HBS-EP+ foram fluídas através do chip por 3 min a 60 µl/min e, então, foi permitido que as mesmas se dissociassem por 10 minutos. Após cada concentração de antígeno o chip foi regenerado infectando-se 10 mM de glicina de pH 2,1 a uma taxa de fluxo de 30 µl/min por 30 segundos. Tampão HBS-EP+ foi injetado antes da maior concentração de antígeno e após a menor concentração de antígeno para subtração de referência, e uma das concentrações escolhida aleatoriamente foi repetida duas vezes. A cinética de ligação foi ajustada com um modelo de 1:1 Langmuir para gerar constantes de ligação de equilíbrio (K_D) para cada amostra. A análise de dados foi realizada com o software BiaEvaluation versão 3.2. Os resultados são mostrados na **Tabela 3**.

[0317] A análise dos resultados revelou uma ligação

aprimorada tanto para CD137 humano quanto CD137 de cinomolgo por todos os clones amadurecidos por afinidade, em comparação com as respectivas moléculas parentais. A afinidade de ligação para os antígenos CD137 monomérico humano foi mais fraca (em pelo menos 100 vezes) que para os antígenos de fusão de Fc humano e cino diméricos. Como discutido no **Exemplo 2.1**, os Fcabs foram selecionados para preferencialmente se ligarem às formas diméricas em vez das monoméricas de CD137 e esses dados confirma que a estratégia de seleção foi bem sucedida. Esse comportamento cinético torna essas menos propensas a se ligarem a CD137 monomérico expresso em níveis mínimos em células T não estimuladas para resultar em risco reduzido de toxicidades de fígado ou sistêmicas associadas a algumas terapias de anticorpo monoclonal anti-CD137.

[0318] Os dados também mostram que os Fcabs de CD137 anti-humano se ligam a CD137 dimérico de cinomolgo com afinidade comparável a CD137 dimérico humano.

Tabela 3

Fcab	CD137 dimérico humano K_D (nM)	CD137 dimérico de cinomolgo K_D (nM)	CD137 monomérico humano K_D vezes de diferença relativa a K_D dimérico humano	CD137 dimérico de camundongo K_D (nM)
FS22-053	38	34	N/A	N/A
FS22-053-	4,2	0,9	170 vezes	N/A

Fcab	CD137 dimérico humano K_D (nM)	CD137 dimérico de cinomolgo K_D (nM)	CD137 monomérico humano K_D vezes de diferença relativa a K_D dimérico humano	CD137 dimérico de camundongo K_D (nM)
008				
FS22-053-011	5,5	1,3	>200 vezes	N/A
FS22-053-014	3,2	0,9	100 vezes	24
FS22-172	52	203	N/A	N/A
FS22-172-003	1,5	1,3	>200 vezes	N/A
FS22-172-004	4,3	3,5	>200 vezes	N/A

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação de K_D

[0319] A habilidade dos Fcabs em um formato de mAb² simulados para se ligarem a CD137 de camundongo dimérico também foi testada. Nenhum dos clones mostrou ligação forte ao antígeno de camundongo (como mostrado na tabela em que N/A indica que nenhum K_D pode ser calculado) exceto para clone FS22-053-014 que foi constatado surpreendentemente que tem um K_D de 24 nM para o antígeno de camundongo. Isso foi inesperado visto que CD137 de camundongo e CD137 humano compartilha menos que 57 % de homologia de sequência.

[0320] A análise de sequência de FS22-053-014 revelou um risco de sequência potencial que pode resultar em isomerização de aspartato pós-traducional na posição 98 na alça de EF de seu domínio CH3. O aspartato (D) na posição 98 foi mutado em glutamato (E) por mutagênese direcionada por sítio com o uso do kit de mutagênese de QuickChange II (Agilent, número de catálogo 200523), de acordo com as recomendações do fabricante, que renderam clone FS22-053-017.

[0321] Os experimentos foram, então, realizados para confirmar que essa mutação não afetou negativamente a afinidade de ligação ou a atividade funcional do clone FS22-053-017 como em comparação com o clone FS22-053-014.

[0322] A constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de clone de Fcab FS22-053-017 foi comparada àquela de clone FS22-053-014 por SPR em um sistema Biacore T200 com o uso do antígeno CD137-mFc-Avi humano e PD-L1-mFc-Avi de camundongo, respectivamente. Os resultados mostraram perfis cinéticos muito similares ao antígeno humano para ambos os clones de Fcab, dessa forma, evidenciando que a mutação do aspartato na posição 98 para um glutamato não teve um efeito negativo sobre a ligação ao antígeno humano. Os resultados também mostraram que FS22-053-017 mostrou uma diminuição de 2 vezes em força de ligação ao antígeno CD137 de camundongo.

[0323] O clone de Fcab FS22-053-017 foi subclonado e expresso como mAb² "simulados" HelD1.3 (consultar **Exemplo 2.2**) e, então, comparado ao clone FS22-053-014, também em formato de mAb² HelD1.3, em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 CD137 humano como descrito no **Exemplo 2.4**. G1-AA/20H4.9 foi usado como um controle positivo de anti-CD137

e G1-AA/HeLD1.3 como um controle de IgG. Os mAb² foram testados sem reticulação de Proteína L ou foram reticulados em uma razão de 1:4 com Proteína L.

[0324] Os resultados mostraram que tanto Fcab FS22-053-17 em formato de mAb² simulados quanto Fcab FS22-053-014 em formato de mAb² simulados teve atividade comparável quando reticulado por Proteína L no mesmo ensaio de ativação de célula T DO11.10. Portanto, a mutagênese realizada não impactou negativamente a atividade funcional. Ambos os clones em formato de mAb² simulados não tiveram atividade sem reticulação.

3.8 Resumo de maturação e caracterização de afinidade de Fcabs de CD137 anti-humano

[0325] Em resumo, Fcabs anti-CD137 amadurecidos por afinidade foram gerados e preparados em um formato de mAb², que foram, então, caracterizados. mAb² que contêm esses domínios de ligação do antígeno CD137 no domínio CH3 mostraram altos níveis de atividade em um Ensaio de Célula Repórter de NF-κB humano e essa atividade foi mostrada como dependente de reticulação. mAb² que contêm o domínio de ligação do antígeno dos Fcabs FS22-053-008 e FS22-172-003 mostraram a melhor atividade nesse ensaio.

[0326] Adicionalmente, mostra-se que quando os mAb² foram preparados a partir desses Fcabs, de modo que os mesmos contivessem o domínio de ligação do antígeno CD137 e uma região de Fab de ligação ao PD-L1, bem como a mutação LALA em seu domínio CH2 para reduzir ou anular a ligação aos receptores Fcγ, então, os mAb² tiveram atividade de célula T potente em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 humana e essa atividade foi mostrada como dependente da reticulação

por ligação às células que expressam PD-L1. Mostrou-se também que os mAb² têm atividade dependente de reticulação em um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ humano primário, que fornece evidência adicional de que os mAb² que contêm esses domínios de ligação do antígeno CD137 amadurecidos por afinidade têm a capacidade para induzir de modo eficaz o agonismo de CD137 e que essa atividade agonística é uma condicional na reticulação.

[0327] Mostrou-se também que os mAb² que contêm o domínio de ligação do antígeno CD137 anti-humano são específicos para CD137 e não se ligam a outros membros de TNFRSF. Mostrou-se que os mAb², preferencialmente, se ligam ao antígeno CD137 dimérico humano através do antígeno CD137 monomérico humano. Finalmente, mostrou-se que esses mAb² se ligam a CD137 dimérico de cinomolgo com afinidade comparável a CD137 humano dimérico.

[0328] Constatou-se surpreendentemente que um clone de Fcab, FS22-053-014, também tem a capacidade para se ligar a CD137 de camundongo. A análise de sequência do FS22-053-014 revelou um risco de sequência potencial, que foi corrigido por mutagênese direcionada para a lateral para produzir o clone FS22-053-017. A caracterização do FS22-053-017 revelou que o mesmo tinha propriedades de ligação similares e mostrou atividade funcional similar em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 CD137 humano como FS22-053-014.

[0329] Tendo demonstrado que mAb² que contêm o domínio de ligação do antígeno CD137 anti-humano exigem a reticulação a fim de agrupar e ativar CD137, o próximo alvo foi preparar um mAb² que se liga ao PD-L1 humano além de a CD137. Presume-se que a ligação dos mAb² ao PD-L1 humano por meio dos braços

de Fab causaria a reticulação das moléculas de anticorpo, que, por sua vez, resultaria no agrupamento e na ativação de CD137 e que essa ativação dependeria da presença de expressão de PD-L1 humano.

[0330] A fim de preparar mAb² que se ligam ao PD-L1 humano além de a CD137, primeiro é necessário gerar mAbs que tenham a capacidade para se ligarem ao PD-L1. A geração desses mAbs é descrita abaixo.

Exemplo 4: Isolamento de mAb anti-PD-L1 naíve 280 02 G02

4.1 Seleções

[0331] A biblioteca que exhibe fago de anticorpo humano "IONTAS 1" (IONTAS Ltd.) foi empregada para selecionar quanto a clones de anti-PD-L1. Os genes de anticorpo usados para construir a biblioteca IONTAS 1 foram derivados de linfócitos humanos (42 doações de revestimento de tampão) e uma amostra de tecido de tonsila. Tanto os revestimentos de tampão quanto o tecido de tonsila foram obtidos sob aprovação da Comissão de Ética de Pesquisa Local.

[0332] Três ciclos de seleções de fase sólida foram realizados com a biblioteca de exibição de fago de anticorpo IONTAS 1 com o uso de antígeno que foi diretamente revestido em tubos Nunc de poliestireno, como descrito por Schofield *et al*, 2007. Os primeiro, segundo e terceiro ciclos de seleção empregaram PD-L1-Fc-His humano, PD-L1-rCD4-His de camundongo e PD-L1-Fc-His humano, respectivamente (consultar **Exemplo 1.3** para detalhes de antígeno).

[0333] A população de anticorpo anti-PD-L1 variável pesada (VH) selecionada foi misturada com uma população de anticorpo variável leve (VL) naíve, como descrito por Dyson *et al.*, 2011, e essa população que exige fago de anticorpo

misturada e resgatada foi empregada em seleções de fase de solução. Resumidamente, a movimentação foi realizada com PD-L1-rCD4-His humano (10 nM), PD-L1-rCD4-His humano (200 pM) e PD-L1-rCD4-His de camundongo (10 nM) em ciclos 1, 2 e 3, respectivamente, e isso resultou em uma população de anti-PD-L1 scFv de saída chamada "Seleção 280". Essa população de scFv conteve scFvs de ligação ao anti-PD-L1 humano e camundongo, como determinado por um ELISA policlonal de fago realizado como descrito por Dyson *et al.*, 2011, e exibiu reatividade cruzada mínima com PD-1 humano ou com etiquetas rCD4 ou Fc.

4.2 *Triagem: ELISA, ensaio de bloqueio recombinante, ensaio de bloqueio com base em célula*

4.2.1 *ELISA de scFv monoclonal*

[0334] A população de scFv Seleção 280 do **Exemplo 4.1** foi triada por ELISA para identificar os clones que melhor se ligam ao PD-L1 humano. A população de scFv foi subclonada no vetor de scFv solúvel pSANG10 e culturas de *E.coli* que contêm scFvs solúveis foram preparadas como descrito (Martin *et al.*, 2006; Studier, 2005). scFv solúveis foram, então, usados em um ELISA monoclonal com PD-L1-rCD4-His humano imobilizado, como descrito por Schofield *et al.*, 2007. Placas de Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, 437111) foram revestidas com PD-L1-rCD4-His humano (5 µg/ml, PBS) durante a noite, bloqueadas com 2 % de MPBS por 1 hora e o tensoativo de cultura de *E. coli* (1:2 de diluição com 2x 2 % de MPBS) foi adicionado e permitiu-se que scFv se ligasse por 1 hora à temperatura ambiente. scFv ligados foram detectados com anticorpo M2 anti-FLAG (Sigma, F1804) identificado com európio. Um total de 470 clones foi triado e isso resultou

na identificação de 346 clones de anti-PD-L1 com um sinal de ligação para PD-L1 pelo menos 10 vezes acima do antecedente em comparação com poços bloqueados "vazios" que não contêm antígenos. Os 192 melhores clones de anti-PD-L1 humano avaliados pelo sinal de ELISA primário foram selecionados para análise adicional.

4.2.2 *Triagem de scFv em ensaio de bloqueio de PD-L1/PD-1 com base em ELISA*

[0335] Para identificar clones que bloquearam a interação entre PD-L1 e PD-1, um ELISA foi realizado para triar quanto aos scFvs de bloqueio. Resumidamente, as placas nunc maxisorp (437111, Thermo Fisher Scientific) foram revestidas com anticorpo anti-rCD4 (domínios 3 e 4) (MCA1022, OX-68, Bio-Rad) durante a noite, bloqueadas com 3 % de MPBS e incubadas com PD-1-rCD4-His humano (5 µg/ml em 3 % de MPBS) por 1 hora à temperatura ambiente. PD-L1-Fc-His Humano (50 µl, 0,2 nM), foi pré-misturado com tensoativo de cultura de *E. coli* que contém scFv. As Nunc placas de 96 poços foram lavadas 3 vezes com PBS, 0,1 % de Tween™-20 (PBS-T) e 3 vezes com PBS, então, a mistura de PD-L1-Fc-His humano/scFv foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e PD-L1-Fc-His humano ligado foi detectado com o uso de cabra-anti-Fc-biotina (Jackson ImmunoResearch, 109-065-098, Laboratories, 0,1 µg/ml, 3 % de MPBS) e Estreptavidina-Európio (Perkin Elmer, 1244-360) seguido por solução de intensificação DELFIA (Perkin Elmer, 4001-0010). Dos 192 clones triados, 183 exibiram pelo menos 90 % de atividade de bloqueio em comparação com o controle de meio. Os 183 clones de scFv anti-PD-L1 identificados foram triados adicionalmente quanto a reatividade cruzada de PD-L1 de

camundongo em um ELISA primário, como descrito no **Exemplo 4.2.1** acima, mas com o uso de PD-L1-rCD4-His de camundongo imobilizado em vez de PD-L1 humano. Isso identificou 50 clones de anti-PD-L1 de reatividade cruzada de camundongo, que foram candidatos para conversão em formato de IgG1.

4.2.3 Conversão de clones de scFv anti-PD-L1 de bloqueio em formato de IgG1

[0336] Os clones de scFv anti-PD-L1 que bloquearam a interação entre PD-L1 e PD-1 foram convertidos em formato de IgG1 por subclonagem dos genes VL e VH no pINT3-IgG1 de plasmídeo de expressão de IgG1 e expresso em HEK293 em 4 ml de escala, como descrito por Chapple *et al.*, 2006. Os anticorpos foram purificados por afinidade em batelada com microesferas de Proteína A sefarose (PC-A100) e colunas de meio giro de "batelada de 1 etapa" Proteus (Generon, GEN-1SB08), de acordo com as instruções do fabricante. A diálise dos anticorpos purificados foi realizada com maxi tubos de GeBAflex, com um corte de 8 kDa (Generon, D045). Se necessário, os anticorpos foram concentrados a 2 µM por ultrafiltração.

4.2.4 Triagem quanto atividade de bloqueio de PD-L1-PD-1 em ensaio de cocultura de repórter Jurkat-NFAT

[0337] A atividade funcional dos mAbs anti-PD-L1 purificados foi, então, avaliada em uma triagem de ensaio de repórter de cocultura. Essa triagem foi realizada com o uso da linhagem celular Jurkat estável de NFAT-luc2/PD-1 GloResponse (Promega, CS187102) e das células PD-L1 de Degelo-e-Uso (Promega, CS178103) de acordo com as instruções do fabricante. As células PD-L1 foram plaqueadas em meio HAM'S-F12 que contém 10 % de FBS. Os meios do dia seguinte

foram e em paralelo as células repórter Jurkat células PD-1 (Promega, CS187102) foram ressuspensas em meio de ensaio (90 % de RPMI1640, 1 % de FBS). Adicionou-se à placa que contém células PD-L1 aderidas 40 µl de ensaio meios que contém anticorpos diferentes a uma concentração de 2x (200 nM) seguido por 40 µl da mistura de célula PD-1. A placa foi incubada por 6 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. O reagente de BioGlo (Promega, G7940, 80 µl) foi adicionado a cada poço e a saída de luciferase foi lida com o uso de um leitor de placa BMG pherastar. Esse anticorpo identificado G1/280_02_G02 tem a capacidade para bloquear a interação de PD-L1 com PD-1 em um ensaio de cocultura, como determinado por atividade de luciferase aumentada em comparação com os controles sem anticorpo. Essa atividade foi confirmada em um ensaio de cocultura de resposta de dose (faixa de concentração dupla: 200 a 1,56 nM) que resulta em uma concentração eficaz máxima média calculada (EC₅₀) de 4,2 nM.

4.3 Otimização de Sequência

[0338] A análise preliminar da sequência do anticorpo G1/280_02_G02 resultou na identificação de um sítio de desaminação potencial na CDR2 VH, especificamente, um motivo NG nas posições Kabat 54 a 55. Como a desaminação nesse sítio poderia afetar potencialmente a ligação, clones variantes foram produzidos, nos quais o motivo NG foi alterado para NA, NS, SG ou GG. Essas modificações não resultaram em qualquer redução significativa em afinidade por PD-L1 recombinante ou potência em atividade de bloqueio de PD-L1, e o clone variante que contém a modificação de NS, designado G1/280_02_G02_NS, foi escolhido para uso em um embaralhamento de cadeia leve.

4.4 *Resumo de seleções de naïve*

[0339] As estratégias de seleções de fago identificaram mais que 50 clones de ligação ao anti-PD-L1 humano com atividade de bloqueio de PD-1/PD-L1 *in vitro* potente, bem como reatividade cruzada de PD-L1 de camundongo. Em particular, G1/280_02_G02 mostrou ativação potente em um ensaio de repórter PD-L1 com base em célula e foi, portanto, selecionado para otimização adicional.

Exemplo 5: Geração e caracterização de clones de anti-PD-L1 que contém cadeia leve kappa

[0340] O anticorpo G1/280_02_G02_NS possui uma cadeia leve lambda. Como a maior parte dos anticorpos monoclonais usados em um contexto clínico têm cadeias leve kappa (Jain *et al.*, 2017), buscou-se, pelo uso de uma campanha de embaralhamento de cadeia, para gerar clones que compreendem a cadeia pesada do anticorpo G1/280_02_G02_NS, mas pareada com cadeias leve kappa, que retêm afinidade para reatividade cruzada de PD-L1 humano e camundongo. A biblioteca de cadeia leve kappa IONTAS™ na pIONTAS-1 de plasmídeo de exibição de fago (biblioteca kappa) foi usada para preparar uma biblioteca embaralhada de cadeia leve de clones de scFv que compreendem a cadeia pesada do anticorpo G1/280_02_G02_NS acoplado com cadeia leve variantes.

5.1 *Seleções de fago e estratégia de triagem*

[0341] Uma variedade de seleções de solução de exibição de fago foi realizada em três ciclos com o uso de antígenos PD-L1-rCD4-His humano e PD-L1-rCD4-His de camundongo biotinilados (consultar **Exemplo 1.3** para detalhes de antígeno). As seleções foram realizadas diminuindo-se as concentrações de antígeno em todos os ciclos (variando de

100 a 0,02 nM) e para cada ciclo de seleção um controle de “não antígeno” foi usado.

[0342] Seis saídas de seleção foram selecionadas para triagem, dois do ciclo 2 (n° 871 e 872) e quatro do ciclo 3 (n° 887, 890, 891 e 894) com o uso do sistema de expressão de scFv solúvel como descrito na seção 1.3.1. Um total de 1692 clones de scFv solúveis foram triados quanto a ligação a antígeno imobilizado em ELISA (antígeno hu-PD-L1-rCD4-His revestido a 3 µg/ml em Dulbecco PBS, 50 µl, em placas Maxisorb) com o uso do ensaio descrito no **Exemplo 4.2.1** acima, que emprega a solução de intensificação DELFIA.

[0343] Dos 1692 clones triados, 1029 clones renderam um sinal de mais que 2000 RFU no ensaio DELFIA, que gera uma taxa de sucesso de cerca de 61 %. Os 736 clones principais foram, então, selecionados e analisados com o uso de um ensaio secundário (classificação de afinidade) que emprega três concentrações de antígeno hPD-L1-rCD4-His (1,0 nM, 0,2 nM e 0,04 nM). Dos 736 clones triados, os 48 clones que mostraram o maior sinal foram selecionados para clonagem e expressão em formato de IgG1. Os clones foram expressos em células Expi293F™ (Fisher Scientific n° de catálogo 13479756) a 800 µl de escala, e os tensoativos de cultura foram colhidos no 5° dia após a transfecção para triagem adicional em formato de IgG1.

5.2 Triagem de SPR

[0344] Todos os 48 anticorpos foram classificados por afinidade com o uso de SPR (instrumento Biacore T200). Para classificação, os tensoativos diluídos (1:10 em tampão de execução feita de 1X de PBS e 0,002 % de Tween™-20) foram imobilizados em um chip de Proteína-A (GE healthcare, código

de produto: 29127556) e PD-L1-rCD4-His humano fluíram através da superfície preparada a 50 nM de concentração. As constantes de taxa de associação (k_a) e dissociação (k_d) com o uso dessa injeção única foram usadas para determinar a constante de dissociação (K_D). Os valores de K_D dos clones foram comparados àqueles de clone G1/280_02_G02_NS em formato de Ig1 (G1/280_02_G02_NS). Dez clones de sequência única foram identificados, os quais mostraram afinidade maior para PD-L1 humano que o clone G1/280_02_G02_NS e foram, portanto, submetidos à análise cinética completa em conjunto com o clone G1/280_02_G02_NS.

[0345] Resumidamente, os experimentos de SPR foram realizados com o uso de um instrumento BIAcore T200. Os anticorpos do tensoativo de cultura diluída foram capturados em um chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) através de FC2 em uma taxa de fluxo de 10 μ l/min, com 60 segundos de tempo de contato. Tipicamente, isso resultou em 500-800 RU de anticorpo capturado. As diluições duplas de PD-L1-rCD4-His foram injetadas a partir de 50 nM em uma taxa de fluxo de 30 μ l/min, (Faixa de concentração: 50 nM-0,05 nM) através de FC1 e FC2. A associação foi medida ao longo de 180 segundos, e a dissociação foi medida ao longo de 300 segundos. Todas as medições foram realizados a 25 °C em PBS, pH 7,4, 0,05 % de Tween™-20. Os parâmetros cinéticos foram determinados por subtração de célula de referência e ajustando-se os dados experimentais de sensograma presumindo uma interação de 1:1 com o uso do software BIAevaluation (GE, BR-1005-97). Os dados resultantes foram ajustados com o uso de software BIAevaluation e os valores k_a , k_d e K_D correspondentes foram calculados. Dentre os dez clones

testados, quatro anticorpos, designados "G1/887_04_E12", "894_08_A05", "G1/894_08_E05" e "G1/887_04_G12", exibiram valores de K_D sub-nanomolar, que foram menores que K_D para G1/280_02_G02_NS. Os dados de afinidade obtidos sob as condições de triagem descritas mostraram que o embaralhamento de cadeia leve kappa descrito no **Exemplo 5.1** permitiu que a cadeia pesada do anticorpo G1/280_02_G02_NS fosse pareada não apenas com a cadeia leve lambda, mas também com cadeias leve kappa para produzir anticorpos com boa afinidade, e, de fato, aprimorada, para PD-L1 humano recombinante.

5.3 Caracterização de clones kappa em formato de IgG1

5.3.1 Ensaio de bloqueio de PD-1/PD-L1 com base em célula

[0346] A habilidade dos clones de anti-PD-L1 que contém a cadeia leve kappa, G1/887_04_E12, G1/894_08_E05 e G1/887_04_G12, para bloquear a interação entre PD-1 e PD-L1 foi avaliada em um ensaio com base em célula bioluminescente com o uso de um produto de Bioensaio de Bloqueio de PD-1/PD-L1 (Promega, J1250/J1255) de acordo com as recomendações do fabricante. A atividade de bloqueio foi comparada ao clone G1/280_02_G02_NS.

[0347] Resumidamente, todos os anticorpos foram purificados, como descrito no **Exemplo 4.2.3**, e testados a diluições em 3 vezes de 100 nM a 35 pM (oito concentrações) em duplicatas. Todos os clones testados se mostraram inibidores potentes da interação de PD-1/PD-L1, com os três clones que contêm cadeia leve kappa G1/887_04_E12, G1/894_08_E05 e G1/884_04_G12 que exibem valores de IC_{50} ainda melhores que o clone que contém cadeia leve lambda G1/280_02_G02_NS.

5.3.2 Afinidades

[0348] A ligação dos mAbs anti-PD-L1 G1/887_04_E12, G1/887_04_G12 e G1/894_08_E05 ao PD-L1 humano recombinante (hPD-L1-Avi-His biotinilado, Acro Biosystems, PD1-H82E5), de cinomolgo (cPD-L1-His, Acro Biosystems, PD1-C52H4) e de camundongo (mPD-L1-His, Acro Biosystems, PD1-M5220) foi, então, medida por SPR com o uso de uma unidade de processamento de Biacore T200 (GE Healthcare). As afinidades foram comparadas ao clone 280_02_G02_NS em formato de IgG1 (G1-AA/280_02_G02_NS; O "AA" nesse nome de clone denota que esse clone também contém mutação "LALA" no domínio CH2).

[0349] Resumidamente, os mAbs anti-PD-L1, diluídos em tampão de HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2 µg/ml, foram injetados individualmente em célula de fluxo 2, 3 e 4 de um chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) a 30 µl/min para obter uma resposta final de aproximadamente 110 RU. Os antígenos PD-L1-His recombinantes humano, de cinomolgo e de camundongo, diluídos em tampão de HBS-EP, foram injetados em célula de fluxo 1, 2, 3 ou 4 como adequado em uma concentração faixa de 81 nM a 0,037 nM com diluições em 3 vezes para 4 min a 75 µl/min e, então, foi permitido que os mesmos se dissociassem em tampão por 10 min. A regeneração foi obtida por injeção de 10 mM de glicina-HCL de pH 1,5 (GE Healthcare, Kit de Captura de Anticorpo Humano, BR00356) por 30 segundos em uma taxa de 30 µl/min. Dados subtraídos (célula de fluxo 2 - célula de fluxo 1, célula de fluxo 3 - célula de fluxo 1, ou célula de fluxo 4 - célula de fluxo 1) foram analisados com o uso de Software BIAevaluation 3.2 (GE Healthcare) para identificar a ligação com o uso do modelo de ligação de 1:1 com transferência de massa, com constante 0 de índice

refratário (RI). Para determinar as afinidades das curvas de ligação de PD-L1 de camundongo, o $R_{\text{máx}}$ dos perfis de ligação humanos correspondentes foi usado.

[0350] Os dados de ligação demonstraram que o clone G1-AA/280_02_G02_NS e os clones G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 e G1/887_04_G12 ligados a PD-L1 humano e de cinomolgo com afinidades nanomolares ou sub-nanomolares de único dígito baixas e foram completamente de reatividade cruzada humana/de cinomolgo. Em comparação com o clone G1-AA/280_02_G02_NS, as afinidades de ligação dos clones G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 e G1/887_04_G12 foram de cerca de 1,8 a 4,8 vezes superior para humano e 2,7 a 4,7 vezes superior para PD-L1 de cinomolgo. As afinidades dos clones para PD-L1 de camundongo recombinante foram menores, com valores de K_D em uma faixa de 38 a 225 nM, em que a maior afinidade é observada para o clone G1/887_04_E12. Esses dados mostram que a cadeia pesada do anticorpo G1-AA/280_02_G02_NS podem ser pareados tanto com cadeias leve lambda quando kappa para produzir anticorpos com boas afinidades (e no caso de pareamento de cadeia leve kappa, sub-nanomolar) para PD-L1 humano e de cinomolgo recombinante, bem como outros, embora inferior, para PD-L1 de camundongo recombinante.

5.3.3 *Ligação de mAbs anti-PD-L1 a PD-L1 expresso em célula*

[0351] Os mAbs PD-L1 anti-humano, G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 e G1/887_04_G12 foram, então, testados quanto a ligação às células HEK293 que expressam PD-L1 humano (células HEK.hPD-L1) com o uso de citometria de fluxo. A ligação não específica também foi avaliada testando-se a ligação às células parentais HEK293 que carecem de PD-L1

humano (linhagem de células Flp-In T-Rex 293, Life Technologies, R780-07).

[0352] cNDA que codifica PD-L1 humano (SEQ ID NO: 185) foi subclonado em vetor pcDNA™5/FRT (ThermoFisher Scientific nº de catálogo V601020) com o uso de sítios de restrição KpnI e NotI e o vetor foi, então, transformado em linhagem de células Flp-In T-REx 293 (Life Technologies, R780-07) com o uso de Lipofectamine 2000 (Life Technologies, 11668-019). As células foram cultivadas em DMEM que contém 10 % de FBS, 100 µg/ml de Higromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475) e 15 µg/ml de Blastomicina (Melford Laboratories Ltd, B1105) por 3-4 semanas até que as colônias de células estavelmente transformadas tenham se formado. Essas colônias foram amplificadas na presença de 1 µg/ml de Doxíciclina (Sigma Aldrich, D9891) e testadas quanto a expressão de PD-L1 com o uso de PE conjugado de anticorpo PD-L1 anti-humano (MIH1) (BD Biosciences, 557924). As células foram desafixadas com o uso de tampão de dissociação de célula, lavadas uma vez com PBS, plaqueadas a 2×10^5 células em poços de uma placa de 96 poços e, então, incubadas com anticorpo diluído 1:20 em PBS por 1 hora em 4 °C, antes de serem lavadas novamente em PBS e medidas com o uso de um citômetro Accuri C6 (BD Biosciences). Os dados foram analisados com o uso de software FlowJoX. A expressão de PD-L1 humano foi detectada na linhagem celular.

[0353] Constatou-se que os clones G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 e G1/887_04_G12 se ligam ao PD-L1 humano de superfície celular com valores de EC_{50} na faixa de 0,26 - 0,29 nM. Nenhuma ligação às células HEK293 parentais foi observada, mostrando a especificidade da ligação. Portanto,

todos os clones de mAb testados se ligaram especificamente ao PD-L1, sem ligação não específica observada.

5.3.4 *Atividade de mAbs anti-PD-L1 em ensaio de Reação de Linfócito Misturado*

[0354] A atividade dos mAbs anti-PD-L1 foi testada em um ensaio de Reação de Linfócito Misturado (MLR). Um ensaio de MLR mede a resposta imunológica celular que ocorre entre duas populações de linfócitos alogênicos (mesma espécie, mas geneticamente distintas). O ensaio usa células T CD4⁺ de um doador e células dendríticas derivadas de monócitos (iDCs) de outro doador. Visto que as células imunológicas contêm níveis fisiológicos de reguladores de ponto de checagem imunológicos, o ensaio de MLR pode ser usado para confirmar que a ativação de célula T é intensificada pelo mAb em um sistema humano.

Geração de células T CD4⁺ expandidas

[0355] PBMCs foram isoladas de cones de leucócitos por separação de gradiente Ficoll. As células T CD4⁺ foram isoladas com o uso de um Kit de Isolamento de Célula T CD4⁺ Humana (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-533), de acordo com as instruções do fabricante. Visto que as Dynabeads CD3/CD28 de Ativador T Humano (Life Technologies, 11131D) foram ressuspensas por meio de vortexação. As microesferas foram transferidas para um tubo estéril de 15 ml e 10 ml de RPMI (Life Technologies, 61870044) com 10 % de FBS (Life Technologies, 10270106) e 1x Penicilina Estreptomicina (Life Technologies, 15140122) foi adicionada para lavar as Dynabeads. O sobrenadante foi descartado. A quantidade necessária de células T CD4⁺ a 1,0 x10⁶ células/ml em RPMI com 10 % de FBS e 1x Solução de Penicilina Estreptomicina e

50 IU/ml de IL-2 humana recombinante (Peprotech, 200-02-50 µg) com uma razão entre microesfera e célula a 3:1 foi transferida para o frasco T75 (Greiner Bio-one, 690195) e incubadas a 37 °C + 5 % de CO₂. Após 3 dias, as células foram gentilmente ressuspensas e contadas. A densidade celular foi mantida entre 0,8-1 x 10⁶ células/ml adicionando-se meios frescos (RPMI-10 % de FBS + Solução Penicilina Estreptomicina 1X + 50 U/ml rhuIL-2) conforme necessário. No dia 7 ou 8, as microesferas CD3/28 foram removidas e as células T CD4⁺ foram colocadas em repouso de um dia para o outro a 1 x 10⁶ células/ml de meios frescos RPMI-10 % de FBS + Solução de Penicilina Estreptomicina 1X com 10 IU/ml rhuIL-2 reduzido. As células foram armazenadas congeladas até que necessárias.

Diferenciação de iDCs

[0356] Os monócitos intocados foram isolados dos PBMCs humanas com o uso de Pan Monocyte Isolation Kit Humano, (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-537) após as instruções do fabricante. Os monócitos foram diferenciados de iDCs com o uso de Meio de Diferenciação Mo-DC Humano (Miltenyi Biotec Ltd, 130-094-812) após as instruções do fabricante.

[0357] As células T expandidas foram descongeladas um dia antes do experimento, lavadas com Meio AIM V (Gibco, 12055-091) e incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ em Meio AIM V durante a noite. Os mAbs PD-L1 anti-humano, G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 e G1/887_04_G12 foram diluídos a 4x a concentração final em triplicata em 50 µl de Meio AIM V em placas de fundo redondo de 96 poços (VWR, 734-1797). Um anticorpo anti-FITC, designado 4420 (Bedzyk et al., 1989 e Bedzyk et al., 1990), que contém a mutação LALA foi incluída como controle negativo. Uma série de diluição de 3 vezes que

começa a partir de 30 nM a 0,002 nM foi testada. Tanto 1×10^4 de células iDC suspensas em 50 μ l de Meio AIM V quanto 1×10^5 de células T CD4⁺ expandidas suspensas em 100 μ l de Meio AIM V foram adicionadas às diluições de anticorpo e incubadas por 5 dias a 37 °C + 5 % de CO₂. Os seguintes controles foram incluídos: Células T CD4⁺ por si só, iDC por si só, células T CD4⁺ + iDCs e apenas Meio AIM V. Os tensoativos foram colhidos, as amostras foram diluídas (1:25) e as concentrações de interferon-gama (IFN- γ) medidas com o uso de Kit ELISA de IFN gama Humano Ready-SET-Go! (Life Technologies, 88-7316-77). As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com o Software Gen5, BioTek. Os valores de absorvância de 630 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gen5, BioTek). A concentração de IFN- γ humano foi plotada vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0358] Os mAbs PD-L1 anti-humano, G1/894_8_E05, G1/887_4_E12 e G1/887_4_G12, mostraram atividade potente no ensaio de MLR com valores de EC₅₀ menor que 0,030 nM e um nível máximo de IFN- γ (E_{máx}) maior que 10000 pg/ml. O EC₅₀ indica a concentração de mAb na qual metade da resposta é obtida, enquanto o E_{máx} é um valor absoluto que indica a concentração máxima de IFN- γ obtida no ensaio. Nenhuma atividade foi observada com o mAb G1-AA/4420 de controle negativo como esperado.

5.4 Atividade de mAbs anti-PD-L1 em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 de camundongo

[0359] Visto que foi mostrado que os mAbs PD-L1 anti-humano G1/887_04_E12, G1/887_4_G12 e G1/894_08_E05 são fracos em reatividade cruzada ao PD-L1 de camundongo (consultar **Exemplo 5.3.2**), sua atividade funcional em direção ao PD-L1 de camundongo foi examinada em um ensaio de liberação de interleucina-2 (IL-2) com base nas linhagens celulares de linfócito T OVA DO11.10 e hibridoma de linfócito-B LK35.2. A liberação de IL-2 é um marcador de ativação de célula T. As células T que expressam PD-1 murino endógeno foram transfectadas com vetor vazio (pLVX). As células B foram transfectadas com um construto PD-L1 de camundongo.

5.4.1 Produção de linhagens de célula T com um vetor vazio

[0360] A metodologia de transdução lentiviral foi usada para gerar células DO11.10 (National Jewish Health [Saúde Judaica Nacional]) que contêm o vetor lentiviral vazio pLVX com o uso do Sistema de Embalagem Lenti-X HTX (Clontech, 631249). Vetor de expressão Lenti-X (pLVX) (nº de Cat. 631253), foi cotransfectado com uma Mistura de Embalagem HTX Lenti-X na Linhagem de Células 293T de Lenti-X (nº de Cat. 632180) para gerar vírus. A linhagem de células DO11.10 foi transduzida com o uso das partículas lentivirais produzidas com o Sistema de Embalagem HTX Lenti-X.

5.4.2 Produção de antígeno que apresenta células que superexpressam PD-L1

[0361] A metodologia de transdução lentiviral foi usada para gerar células de linfoma de célula B LK35.2 (ATCC, HB-

98) que superexpressam PD-L1 de camundongo com o uso do Sistema de Embalagem Lenti-X HTX (nº de Catálogo 631249). O vetor de expressão Lenti-X (pLVX) (nº de catálogo 631253) que contém, cDNA que codificam PD-L1 de camundongo (SEQ ID NO: 187), foi cotransfectado com uma Mistura de Embalagem HTX Lenti-X na Linhagem de Células 293T de Lenti-X (nº de Cat. 632180) para gerar vírus. A linhagem de células LK35.2 foi transduzida com o uso dos vetores lentivirais produzidos com o Sistema de Embalagem HTX Lenti-X.

5.4.3 *Ensaio de ativação de célula T DO11.10 de camundongo*

[0362] As diluições dos mAbs anti-PD-L1 G1/887_04_E12, G1/887_4_G12 e G1/894_08_E05 ou o mAb de controle negativo anti-FITC (G1-AA/4420) foram preparados em meios experimentais (DMEM (Gibco, 61965-026), 10 % de FBS (Gibco, 10270-106), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco, 11360-070)). Os mAbs foram misturados 1:1 com 4×10^5 /ml de células LK35.2 mPD-L1 em meios experimentais na presença de 2,46 μ M de peptídeo OVA (H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH (SEQ ID NO: 192) (Pepscan)) (100 μ l de células LK35.2 mPD-L1 (hibridoma de célula B transduzido com um vetor lentiviral que contém mPD-L1 para superexpressar PD-L1 de camundongo)/mistura de mAb por poço em placa de fundo redondo de 96) e incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ por 1 hora. 2×10^5 de células pLVX DO11.10 (hibridoma de célula T DO11.10 transduzido com um vetor lentiviral vazio)/ml em 100 μ l de volume meios experimentais foram adicionados a 100 μ l da mistura de LK35.2 mPD-L1/(mAbs). As células foram, então, misturadas antes de serem incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados e ensaiados com kit ELISA de IL-2 de

camundongo (eBioscience, 88-7024-88 ou R&D Systems, SM2000) seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com o Software Gen5, BioTek. Os valores de absorbância de 570 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gen5, BioTek). A concentração de IL-2 de camundongo foi plotada vs a concentração de log de mAb e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0363] Os mAbs PD-L1 anti-humano mostraram atividade significativa no ensaio de ativação de célula T de camundongo com potências (EC_{50}) na faixa de 1-4,4 nM. Nenhuma atividade foi observada com o mAb de controle negativo como esperado. Dos três clones testados, G1/887_04_E12, que mostrou a afinidade mais para PD-L1 de camundongo recombinante, também foi o clone mais potente no ensaio de ativação de célula T. As diferenças em potência foram menores que as afinidades medidas que é provavelmente devido à alta superexpressão de PD-L1 de camundongo nas células LK35.2 nesse ensaio.

5.5 Resumo para caracterização de clones kappa em formato de IgG1

[0364] Os mAbs anti-PD-L1 G1/894_08_E05, G1/887_04_E12, e G1/887_04_G12, que contêm as cadeias leve kappa selecionadas demonstraram reatividade cruzada de PD-L1 de cinomolgo e de camundongo, mostrou ligação específica ao PD-L1 que expressou superfície celular, e mostraram até mesmo afinidade superior para PD-L1 humano e de cinomolgo recombinante que o clone que contém cadeia leve lambda

G1/280_02_G02. Mostrou-se que os mAbs anti-PD-L1 G1/894_08_E05, G1/887_04_E12, e G1/887_04_G12 são ativadores potentes de células T humanas *in vitro* e tem reatividade cruzada de camundongo funcional.

Exemplo 6: Otimização de Sequência dos mAbs PD-L1

6.1 Identificação e remoção de sítios de desaminação de proteína potencial

[0365] A análise da sequência do clone G1/280_02_G02_NS resultou na identificação da sequência de NSNT na alça de H-CDR2 (nas posições Kabat 54-57) como um sítio de desaminação potencial, que se desaminada pode afetar a ligação. A cadeia pesada desse clone foi mantida em todos os clones que contêm cadeia leve kappa obtidos pela campanha de embaralhamento de cadeia, descrita no **Exemplo 5**, assim, esse sítio de desaminação potencial também estava presente em clones G1/887_04_E12, G1/894_08_A05, G1/894_08_E05 e G1/887_4_G12. Com o uso de iniciadores específicos mais próximos de sequência de linhagem germinal, a sequência de NSNT foi carregada nos quatro clones que contêm cadeia leve kappa por mutagênese direcionada por sítio em GGST, SGGT ou SGNA para produzir os clones variantes identificados. No mesmo momento da remoção desse sítio de desaminação potencial, o papel do resíduo de prolina na posição Kabat 28 na região VH do clone G1/887_04_E12, que foi introduzido indesejavelmente na sequência desse anticorpo durante o embaralhamento de cadeia leve kappa, também foi investigado revertendo-se de volta para um resíduo de treonina como contido no clone G1/280_02_G02_NS. Os clones variantes parentais e resultantes (todos em formato de IgG1) foram transfectados a 0,8 ml de escala, e tensoativos de cultura colhidos cinco

dias após a transfecções foram usados para determinar as afinidades dos clones para PD-L1-rCD4-His humano e de cinomolgo por SPR. PD-L1-rCD4-His cino foi gerado como descrito no **Exemplo 1.3**. Com a exceção dos clones variantes derivados do clone G1/887_04_E12, todos os clones variantes mantiveram suas afinidades sub-nanomolar para PD-L1 humano e de cinomolgo, como em comparação com seu respectivo clone parental.

[0366] Os derivados de clones modificados dos clones parentais G1/894_08_A05, G1/894_08_E05 e G1/887_04_G12 mostraram, todos, afinidades sub-nanomolares para PD-L1 humano e de cinomolgo comparáveis àquelas de seu respectivo clone parental, indicando que as substituições de GGST, SGGT e SGNA foram bem toleradas. As afinidades muito reduzidas dos clones G1/929_01_A01, G1/929_01_A02 e G1/929_01_A03 em comparação com seus parentes (G1/887_04_E12) foram consideradas prováveis devido à remoção da prolina na região VH na posição Kabat 28 em vez da presença das substituições de GGST, SGGT e SGNA em H-CDR2. Foi surpreendente que esse resíduo de prolina no clone G1/887_04_E12 parecesse ser importante por sua finidade para PD-L1. As variantes derivadas dos três clones parentais G1/887_04_E12, G1/894_08_E05 e G1/887_04_G12 que contiveram a substituição de SGGT em seus H-CDR2 (posições 54-57), a saber, clones G1/929_01_A02, G1/929_01_A08 e G1/929_01_A11, foram selecionados para caracterização adicional com base no fato de que essa substituição de SGGT foi a mais próxima da sequência de linhagem germinal.

[0367] Com o uso de mutagênese direcionada por sítio, o sítio de desaminação potencial (NSNT na posição Kabat 54 a

57) na alça de H-CDR2 do clone G1/280_02_G02_NS também foi mudado para SGGT. Adicionalmente, um sítio de desaminação potencial adicional (motivo NS) identificado nas posições Kabat 31 a 32 na CDR1 da cadeia leve lambda desse clone foi modificado para NY por serina 32 mutante (numeração Kabat) em uma tirosina, visto que a tirosina é encontrada nessa posição em diversas sequências de linhagem germinal, como IGLV2-8-01, IGLV2-8-02, IGLV2-8-03, IGLV2-11-01, IGLV2-11-02, IGLV2-11-03 e IGLV2-14-01, IGLV2-14-02, IGLV2-14-03, IGLV2-14-04. A combinação dessas modificações rendeu o clone que contém cadeia leve lambda G1/lam-G02v3, que também foi selecionado para caracterização adicional.

Exemplo 7: Caracterização de mAbs

7.1 Clonagem e produção de clones em formato de mAb

[0368] O resíduo de treonina na posição Kabat 28 na região VH do clone variante "SGGT" G1/929_01_A02 identificado no **Exemplo 6** foi mutado em uma prolina, visto que é apresentado na mesma posição em seu clone parental G1/887_04_E12, com vista para aprimorar sua afinidade para PD-L1 humano e de cinomolgo. A expressão transiente em células HEK293-6E e a purificação com o uso de colunas de proteína A de mAb Select SuRe foi usada para produzir esse clone variante modificado e os outros três clones variantes "SGGT" (G1/929_01_A08, G1/929_01_A11 e G1/lam-G02v3) identificados no **Exemplo 6** em formato de IgG1 e com a mutação LALA para permitir o teste de suas atividades funcionais na ausência de função efetora. Os mAbs resultantes foram designados G1-AA/E12v2, G1-AA/E05v2, G1-AA/G12v2 e G1-AA/lamG02v3 (chamados de G1-AA/lamG02v3 ou G1-AA/lambdav3). As sequências de cadeia pesada e leve respectivamente são mostradas em SEQ ID NO: 16

e SEQ ID NO: 17 para G1-AA/E12v2, SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 28 para G1-AA/E05v2, SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 33 para G1-AA/G12v2 e SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 44 para G1-AA/lam-G02v3.

7.2 Afinidades de mAb para PD-L1 humano e de cinomolgo

[0369] Para determinar a possibilidade de as modificações de sequência adicionais presentes em G1-AA/lam-G02v3 (a saber, NSNT em SGGT na CDR2 VH, NS em NY na CDR1 VL, e a mutação LALA) e o mAb que contém cadeia leve kappa G1-AA/E12v2, G1-AA/E05v2, e G1-AA/G12v2 (a saber, a mutação LALA e, na G1-AA/E12v2 apenas, treonina em prolina na posição Kabat 28 na região VH) afetaram a cinética de ligação, em que as afinidades desses mAb anti-PD-L1 para PD-L1 humano e de cinomolgo foram determinadas como descrito no **Exemplo 5.3.2**. Os mAbs G1-AA/lam-G02v3, G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G12v2 exibiram afinidades para PD-L1 humano e de cinomolgo similar àqueles observados no **Exemplo 5.3** para mAbs G1-AA/280_02_G02_NS, G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 e G1/887_04_G12, demonstrando que as afinidades de ligação dos mAbs e mAb² testados não foram afetadas pela modificação dos sítios de desaminação potencial ou pela introdução da mutação LALA. O mAb G1-AA/E12v2 mostrou o menor valor de K_D de todos os quatro mAbs testados (0,21 nM para PD-L1 humano, e 0,37 nM para PD-L1 de cinomolgo). Os resultados são mostrados na **Tabela 4**.

[0370] O VH de mAb G1-AA/E12v2 difere da região de G1/929_01_A02 (**Exemplo 6**) em um resíduo, em que E12v2 tem uma prolina na posição Kabat 28, enquanto G1/929_01_A02 tem uma treonina nessa posição. G1/929_01_A02 teve uma afinidade inferior maior que 10 vezes tanto para PD-L1 humano quanto

para cinomolgo quando comparado a G1-AA/E12v2, esses dados demonstra a importância do resíduo de prolina na posição 28 no VH de clone E12v2 (nomenclatura Kabat) para sua afinidade para PD-L1 humano e de cinomolgo.

Tabela 4

Clone	PD-L1-His humano K _D (M)	PD-L1-His cino K _D (M)
G1-AA/lam-G02v3	1,34	2,45
G1-AA/E05v2	0,50	0,89
G1-AA/E12v2	0,21	0,37
G1-AA/G12v2	0,44	0,75

7.3 Atividade de mAbs PD-L1 anti-humano em MLR

[0371] Os mAbs anti-PD-L1, G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G05v2 foram testados em um ensaio de Reação de Linfócito Misturado (MLR), como descrito no **Exemplo 5.3.4**. G1-AA/4420 foi usado como um controle negativo. Os dados resultantes são mostrados na **Tabela 5**. Os mAbs G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G12v2 mostraram atividade potente no ensaio de MLR com valores de EC₅₀ menores que 0,054 nM e um nível máximo de IFN- γ (E_{máx}) maior que 600 pg/ml (**Tabela 5**). O EC₅₀ e especificamente os valores de E_{máx} foram significativamente diferentes daqueles descritos no **Exemplo 5.3.4**. Acredita-se que essa diferença seja devido à variabilidade de doador, visto que a resposta depende da reação alogênica entre células T de um doador e as células dendríticas derivadas de monócitos de outro doador. A potência dos mAbs PD-L1 anti-humano foi consistente com os dados descritos no **Exemplo**

5.3.4, bem como a classificação dos clones por ordem de potência. Nenhuma atividade foi observada para o mAb G1-AA/4420 de controle negativo como esperado.

Tabela 5

Clone	Atividade funcional em Ensaio de MLR	
	EC ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
G1-AA/E05v2	0,047	632
G1-AA/E12v2	0,054	666
G1-AA/G12v2	0,040	686
Controle negativo de G1-AA/4420	Nenhuma atividade	

7.4 Expressão, purificação e caracterização analítica de mAbs anti-PD-L1

[0372] Os mAbs G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G12v2 foram produzidos em escala de laboratório e caracterizados pelos métodos analíticos padrão de SEC e Calorimetria por Varredura Diferencial (DSC).

7.4.1 Expressão e purificação em escala laboratorial de mAbs anti-PD-L1

[0373] As sequências de DNA que codificam os mAbs G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G12v2 foram transfectadas em células HEK293 6E (National Research Council of Canada [Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá]) com o uso de PEIpro (Polyplus, França). Após 5 dias, fluidos de cultura celular foram colhidos, e purificados em colunas pré-embaladas de Proteína A MabSelect com o uso de instrumento AKTExpress (tanto GE Healthcare quanto Uppsala, Suécia). O

equilíbrio das colunas foi realizado em 50 mM de Tris, 250 mM de NaCl a pH 7,0 seguido pelo carregamento com fluido de cultura celular colhido. A resina foi lavada com o uso de 50 mM de Tris, 250 mM de NaCl a pH 7,0 e isso foi seguido por eluição do mAb com o uso de tampão a pH menor que 3,5.

7.4.2 *Análise por SE-UPLC*

[0374] A pós-purificação por SE-UPLC foi realizada dentro de 24 horas de purificação (o material foi armazenado a 4 °C) com o uso de um UPLC Bio Classe H Acquity (Waters Corp. GB) para medir a porcentagem de monômero. Uma coluna de 1,7 mm Acquity UPLC BEH200 SEC (4,6 x 150 mm) foi usada, em que a fase móvel consistiu em 250 mM de fosfato de sódio, 100 mM de L-Arginina a pH 6,8. A quantificação de monômero de espécies de baixo peso molecular e alto peso molecular foi realizada com o uso de software Empower (Waters Corp. GB).

7.4.3 *Termoestabilidade*

[0375] A temperatura de fusão (T_m) de G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G12v2 foi medida com o uso de uma calorimetria por varredura diferencial capilar Microcal VP (DSC). G1-AA/lam-G02v3 foi incluído para avaliar a diferença entre os mAbs que contêm cadeia leve kappa e lambda. As amostras foram medidas em tampão de amostra em uma concentração de 0,2 mg/ml. A taxa de varredura foi apresentada a 60 °C/h e os dados foram coletados entre 35 °C e 100 °C. A análise de dados foi realizada com software Origin 7.0. Visto que os picos de DSC do Fab e do CH3 foram sobrepostos, um valor foi relatado.

Tabela 6

mAb	Pureza de monômero após Proteína A em %	T_m de Fab/CH3
G1-AA/E05v2	99,48 ± 0,01 %	80,4-82,8 °C
G1-AA/E12v2	98,85 ± 0,07 %	81,4-84,1 °C
G1-AA/G12v2	99,83 ± 0,11 %	78,1-81,3 °C
G1-AA/lam-G02v3	99,75 ± 0,25 %	68,1 °C

[0376] Um resumo dos resultados é mostrado na **Tabela 6**. Os três mAbs: G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 e G1-AA/G12v2 mostraram parâmetros de caracterização analítica favoráveis; a pureza de monômero após Proteína A foi maior que 98 % e a constatou-se que a estabilidade térmica da transição de Fab (T_m) estava na maior extremidade de transições, tipicamente reportada para IgG1, em que G1-AA/E12v2 parece ser o mais termicamente estável (Fab/CH3 T_M= 81.484.1 °C). O mAb de cadeia leve lambda, G1-AA/lamG02v3, teve uma T_m menor que os três mAbs que contêm cadeia leve kappa.

Exemplo 8: Produção e caracterização de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano

8.1 Produção de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano

[0377] Os anticorpos mAb² CD137/PD-L1 que consistem nas

moléculas de IgG1 que compreendem os 3 clones de Fcab CD137 anti-humano FS22-053-008, FS22-053-017 e FS22-172-003 (consultar **Exemplo 3**) foram produzidos para permitir a caracterização dos Fcabs em um formato de mAb². Os mAb² CD137/PD-L1 foram preparados substituindo-se parte do Fcabs de domínio CH3 que compreende os laços de AB, CD e EF, para a região correspondente do domínio CH3 de um dos três anticorpos de ligação ao anti-PD-L1 (G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2, G1-AA/G12v2; consultar **Exemplo 7.1**). Todos os mAb² resultantes contiveram mutação LALA. Os mAb² CD137/PD-L1 foram expressos transientemente com o uso de PEIpro (Polyplus, França) em células HEK293 6E (NRCC, Canadá). Após 5 dias, fluidos de cultura celular foram colhidos, e purificados em colunas pré-embaladas de Proteína A MabSelect com o uso de instrumento AKTApur (tanto GE Healthcare quanto Uppsala, Suécia). O equilíbrio das colunas foi realizado em 50 mM de Tris-HCl, 250 mM de NaCl, pH 7,0 seguido pelo carregamento com fluido de cultura celular colhido. A resina foi, então, submetida a lavagem em 50 mM de Tris-HCl, 250 mM de NaCl, pH 7,0 seguido por eluição dos mAb² com o uso de tampão a pH <3,5.

[0378] Para avaliar a quantidade de proteína produzida, o teor de proteína de IgG foi quantificado por Interferometria BioLayer com o uso da plataforma Octet QKe (ForteBio) com biossensores de quantificação de Proteína A da PALL (18-5021). As proteínas foram purificadas por cromatografia por afinidade de proteína A com o uso de colunas de mAb SelectSure. Nove mAb² foram purificados com o uso de colunas de Proteína A de mAb Select SuRe (GE Healthcare, 11003494). Os resultados são mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7

mAb² CD137/PD-L1				
Fcab CD137	Fab PD-L1	mAb²	Titulação em expressão transiente de HEK (mg/l)	Rendimento (Proteína A)
FS22-053-008-AA	E05v2	FS22-053-008-AA/E05v2	88	69 %
FS22-053-008-AA	E12v2	FS22-053-008-AA/E12v2	113	74 %
FS22-053-008-AA	G12v2	FS22-053-008-AA/G12v2	108	88 %
FS22-053-017-AA	E05v2	FS22-053-017-AA/E05v2	61	88 %
FS22-053-017-AA	E12v2	FS22-053-017-AA/E12v2	198	65 %
FS22-053-017-AA	G12v2	FS22-053-017-AA/G12v2	89	81 %
FS22-172-003-AA	E05v2	FS22-172-003-AA/E05v2	127	82 %
FS22-172-003-AA	E12v2	FS22-172-003-AA/E12v2	260	76 %
FS22-172-003-AA	G12v2	FS22-172-003-AA/G12v2	229	69 %

[0379] Todos os 9 anticorpos mAb² CD137/PD-L1 foram

produzidos por expressão transiente em HEK 293 6E e obtiveram titulações e a purificação de proteína A foi rendida em uma faixa típica esperada na escala laboratorial. FS22-172-003-AA-Iam/G02v3 também foi expresso e purificado por teste adicional.

8.2 Caracterização biofísica de mAb² por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) e SDS-PAGE

8.2.1 Análise por SE-HPLC

[0380] A pós-purificação por SE-HPLC foi realizada em um HPLC série 1100 Agilent (Agilent, GB), ajustado com uma coluna de 4,6 mm de ID x 30,0 cm TSK-GEL SUPERSW3000 (Tosoh Bioscience) com o uso de 20 mM de fosfato de sódio, 200 mM de cloreto de sódio, pH 6,8 como uma fase móvel. A quantificação de % de monômero foi realizada com o uso de software Chemstation (Agilent, GB).

8.2.2 Análise por CE-SDS

[0381] A análise por CE-SDS foi realizada em um Sistema de Eletroforese Capilar de Bioanalisador 2100 (Agilent, GB), de acordo com as instruções do fabricante. Para reduzir as condições, DTT foi adicionado e as amostras foram desnaturadas a 70 °C por 5 minutos.

Tabela 8

mAb ²	CE-SDS Reduzido Soma de % de cadeia pesada + % de cadeia leve	SEC-HPLC % de monômero
FS22-053-008-AA/E05v2	99,7 %	99,6 %
FS22-053-008-	99,6 %	98,9 %

mAb²	CE-SDS Reduzido Soma de % de cadeia pesada + % de cadeia leve	SEC-HPLC % de monômero
AA/E12v2		
FS22-053-008-AA/G12v2	Não testado	62,6 %
FS22-053-017-AA/E05v2	99,8 %	99,5 %
FS22-053-017-AA/E12v2	99,7 %	99,6 %
FS22-053-017-AA/G12v2	99,0 %	99,6 %
FS22-172-003-AA/E05v2	99,2 %	99,1 %
FS22-172-003-AA/E12v2	99,7 %	97,9 %
FS22-172-003-AA/G12v2	99,6 %	99,3 %

[0382] Um resumo dos resultados é mostrado na **Tabela 8**. Todos os mAb², exceto FS22-053-008-AA/G12v2, mostraram alta pureza após a purificação com o uso de Proteína A; O nível baixo de agregação e fragmentação solúveis, como mostrado pela % de monômero após a proteína A > 95 % e uma alta pureza por CE-SDS reduzido (> 95 %, soma de % de cadeia pesada e % cadeia leve). FS22-053-008-AA/G12v2 exibiu agregação após a purificação de Proteína A e, como resultado, essa não progrediu adicionalmente.

Exemplo 9: Caracterização de ligação de mAb²

9.1 Afinidade de ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano para PD-L1 humano e de cinomolgo por SPR

[0383] A ligação dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E05v2, FS22-053-008-AA/E05v2, FS22-172-003-AA/E12v2, FS22-053-008-AA/E12v2 e FS22-172-003-AA/G12v2 aos antígenos PD-L1 humano e de cinomolgo recombinantes foi, então, medida por SPR com o uso de uma unidade de processamento de Biacore T200 (GE Healthcare).

[0384] Resumidamente, os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, diluídos em tampão de HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2 µg/ml, foram injetados individualmente em célula de fluxo 2, 3 e 4 de um chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) a 30 µl/min para obter uma resposta final de aproximadamente 110 RU. Dois antígenos PD-L1 humano recombinante diferentes foram usados, isto é, hPD-L1-His-Avi (consultar **Exemplo 1.3** para detalhes de antígeno) e hPD-L1-Avi-His biotinilados (Acrobiosystems, PD-1-H82E5). Os antígenos PD-L1-His humano e de cinomolgo (Acrobiosystems, PD-1-C52H4), diluídos em tampão de HBS-EP, foram injetados em célula de fluxo 1, 2, 3 ou 4 como adequado em uma concentração faixa de 81 nM a 0,037 nM com diluições em 3 vezes para 4 min a 75 µl/min e, então, foi permitido que os mesmos se dissociassem em tampão por 10 min. A regeneração foi obtida por injeção de 10 mM de glicina-HCL de pH 1,5 (GE Healthcare, Kit de Captura de Anticorpo Humano, BR00356) por 30 segundos em uma taxa de 30 µl/min. Dados subtraídos (célula de fluxo 2 - célula de fluxo 1, célula de fluxo 3 - célula de fluxo 1, ou célula de fluxo 4 - célula de fluxo 1) foram analisados com o uso de

Software BIAevaluation 3.2 (GE Healthcare) para identificar a ligação com o uso do modelo de ligação de 1:1 com transferência de massa, com constante 0 de índice refratário (RI).

Tabela 9

Clone	PD-L1-His humano K _D (M)	PD-L1-His de cinomolgo K _D (M)
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1,54	1,91
FS22-172-003-AA/E05v2	0,50	0,59
FS22-172-003-AA/E12v2	0,19	0,36
FS22-172-003-AA/G12v2	0,49	0,53
FS22-053-008-AA/E05v2	0,47	0,58
FS22-053-008-AA/E12v2	0,19	0,25

[0385] Os dados de ligação demonstraram que cada um dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano ligado ao PD-L1 humano e de cinomolgo com afinidades baixas a sub-nanomolares e, assim, tiveram reatividade cruzada humano/cinomolgo (**Tabela 9**). Todos os clones de mAb² ligados ao PD-L1 humano e de cinomolgo, igualmente com valores de KD equivalentes para cada antígeno.

9.2 Afinidade de ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano para CD137 humano e de cinomolgo por SPR

[0386] A ligação dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano aos antígenos CD137 humano e de cinomolgo diméricos recombinantes também foi medida por SPR com o uso de uma unidade de processamento de Biacore T200 (GE Healthcare).

[0387] Resumidamente, 20 µg/ml de anticorpo Fab anti-humano (GE Healthcare, kit de Captura de Fab Humano 28958325) foram revestidos em células de fluxo 1, 2, 3 e 4 de um chip de sensor S CM5 Biacore (GE Healthcare, BR100530) que obtém uma resposta final de aproximadamente 5000 RU. Os clones de mAb², diluídos em tampão de HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2-5 µg/ml, foram injetados individualmente em célula de fluxo 2, 3 e 4 a 30 µl/min para obter uma resposta de aproximadamente 70 RU (200 RU para FS22-172-003-AA/E12v2). Os antígenos recombinantes diméricos, CD137-mFc-Avi humano ou CD137-mFc-Avi de cinomolgo (consultar **Exemplo 1.1** para detalhes de antígeno) diluídos em tampão de HBS-EP, foram injetados em célula de fluxo 1, 2, 3 ou 4 como adequado em uma concentração faixa de 81 nM a 0,037 nM com diluições em 3 vezes para 4 minutos a 70 µl/min e, então, foi permitido que os mesmos se dissociassem em tampão por 10 minutos. A regeneração foi obtida por injeção de 10 mM de glicina, pH 2,1 (GE Healthcare, kit de Captura de Fab Humano 28958325) por 60 segundos a uma taxa de 30 µl/min. A análise de dados foi realizada como descrito no **Exemplo 9.1**.

Tabela 10

clone de mAb ²	CD137-mFc-Avi humano K _D (M)	CD137-mFc-Avi cino K _D (M)
FS22-172-003-AA/1am-G02v3	1,3	2,2
FS22-172-003-AA/E05v2	1,5	1,0
FS22-172-003-AA/E12v2	0,7	0,8
FS22-172-003-AA/G12v2	2,2	1,8

clone de mAb ²	CD137-mFc-Avi humano K _D (M)	CD137-mFc-Avi cino K _D (M)
FS22-053-008-AA/E05v2	2,8	1,1
FS22-053-008-AA/E12v2	2,6	0,6

[0388] Os dados de ligação demonstraram que os clones de mAb² CD137/PD-L1 anti-humanos e ligaram a CD137 humano e de cinomolgo dimérico com afinidades nanomolares baixas e tiveram reatividade cruzada humano/cinomolgo completa (**Tabela 10**). Como esperado, esses resultados foram similares aos dados de ligação relatados por esses clones de Fcab em formato de mAb² "simulado" (**Tabela 3, Exemplo 3.7**). A maior afinidade para CD137 dimérico foi observada para FS22-172-003-AA/E12v2, cuja afinidade também foi subsequentemente testada contra CD137-His-Avi monomérico com o uso do mesmo método como descrito acima. Nenhuma ligação de FS22-172-003-AA/E12v2 a CD137 monomérico de até 81 nM foi detectada, ilustrando que as regiões de ligação de Fcab dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano têm uma afinidade baixa para CD137 monomérico. Esses resultados são similares àqueles também observados para os Fcabs de CD137 FS22-053-008 que mostram que a conversão do Fcab em um formato de mAb² resultou em pouca alteração na ligação a CD137.

9.3 Determinação de especificidade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano por SPR

9.3.1 Especificidade para PD-L1 humano

[0389] Para analisar a especificidade dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, a ligação de seis mAb² (FS22-172-003-AA/lam-

G02v3, FS22-172-003-AA/E05v2, FS22-053-008-AA/E05v2, FS22-172-003-AA/E12v2, FS22-053-008-AA/E12v2 e FS22-172-003-AA/G12v2) a outros alvos de célula T foi testada com o uso de SPR. O objetivo foi demonstrar a especificidade mostrando-se nenhuma ligação dos mAb² aos antígenos PD-L2, CD80, PD-1 e B7-H3 em uma concentração de 1 µM.

[0390] As células de fluxo em chips CM5 foram imobilizadas com aproximadamente 1000 RU de PD-L2-Fc humano (R&D Biosystems, 1224-PL), CD80-Fc (R&D Biosystems, 140-B1), PD-1-His (R&D Biosystems, 8986-PD), B7-H3-His (F-star de produção interna, SEQ ID NO: 193), PD-L1-Fc (R&D Biosystems, 156-B7) e PD-L1-His (Acrobiosystems, PD-1-H83F3). A célula de fluxo 1 foi deixada para imobilização bruta. Os mAb² foram diluídos a 1 µM e 1 nM em 1x tampão de HBS-EP (GE Healthcare, código de produto BR100188), em que foi permitido que os mesmos fluíssem através do chip por 3 min e, então, foi permitido que os mesmos se dissociassem por 4 min. Uma injeção de 30 segundos de 10 mM de glicina, pH 1,5 foi usada para regeneração. Os anticorpos de controle positivo foram injetados a 50-100 nM para demonstrar o revestimento de cada antígeno. Os níveis de ligação foram determinados no fim da fase de associação e comparados.

[0391] Todos os mAb² testados mostraram um nível alto de especificidade com menos que 10 RU de ligação de mAb² aos quatro antígenos detectados a 1 µM em comparação com uma faixa de 105 a 570 RU de resposta de ligação detectada a 1 nM para ligação ao PD-L1-Fc humano ou PD-L1-His. Esses resultados demonstraram o nível alto de especificidade dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano para PD-L1 sem ligação aos outros alvos de célula T listados.

9.3.2 *Especificidade para CD137 humano*

[0392] Espera-se que a especificidade da fração de ligação de Fcab CD137 seja mantida nos mAb² CD137/PD-L1 quando comparada aos mAb² CD137/He1D1.3 (consultar **Exemplo 3.6**). A especificidade de FS22-172-003-AA/E12v2 para membros da família TNFR, OX40, GITR, CD40 e DR6 (R&D Biosystems) foi analisada por SPR de modo similar ao descrito no **Exemplo 9.3.1**. Em uma concentração de 1 µM, FS22-172-003-AA/E12v2 ligou menos que 7 RU ao OX40, GITR, CD40 e DR6 humano em comparação com 278 RU a CD137-mFc humano. Esse resultado demonstra o nível alto de especificidade dos mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 para CD137.

9.4 *Ligação simultânea de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano ao PD-L1 humano e a CD137 humano por SPR*

[0393] A habilidade dos mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 para se ligarem simultaneamente a CD137 humano e ao PD-L1-His Avi humano (consultar **Exemplo 1.3** para detalhes de antígeno) foi testada por SPR em um Biacore T200. G1/S70 foi usado como controle. O PD-L1 His humano, diluído a 10 µg/ml em tampão de acetato de sódio, pH 5,0 (GE Healthcare, 18-1069), foi imobilizado em um chip de Sensor CM5 S (GE Healthcare, BR100530) a uma densidade de superfície de aproximadamente 1100 RU. Uma célula de fluxo foi ativada e desativada sem qualquer proteína imobilizada para subtração de fundo. Os anticorpos, diluídos a 5 µg/ml em tampão de HBS-EP, foram capturados a uma taxa de fluxo de 30 µl/min para obter uma densidade de cerca de 200-300 RU. A ligação CD137-mFc-Avi humano foi testada a 0 e 100 nM por 5 min a 30 µl/min, seguida por uma etapa de dissociação de 2,5 min. O chip de sensor foi regenerado após cada ciclo com 20 mM de NaOH por

60 segundos a uma taxa de fluxo de 30 µl/min. FS22-172-003-AA/E12v2 teve a capacidade para se ligar simultaneamente tanto ao PD-L1 humano quanto a CD137 humano, enquanto o G1/S70 de controle se ligou apenas ao PD-L1 humano.

9.5 Afinidade de ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano ao PD-L1 humano e de cinomolgo expresso em superfície celular por citometria de fluxo

[0394] Para avaliar a ligação dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano ao PD-L1 humano e de cinomolgo de superfície celular, as células HEK293 que superexpressam PD-L1 humano foram geradas. As células HEK293 que superexpressam PD-L1 humano (HEK.hPD-L1) foram produzidas como descrito no **Exemplo 5.3.3**. As células HEK293 que superexpressam PD-L1 de cinomolgo (HEK.cPD-L1) também foram produzidas como descrito no **Exemplo 5.3.3**, exceto o cDNA que codifica PD-L1 de cinomolgo (SEQ ID NO: 189) que foi subclonado no vetor pCDNATM5/FRT em vez da sequência de PD-L1 humano.

[0395] O mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, FS22-172-003-AA/E12v2, foi, então, testado quanto a ligação às células HEK293 que expressam PD-L1 humano ou de cinomolgo com o uso de citometria de fluxo. A ligação não específica também foi avaliada testando-se a ligação às células parentais HEK293 que carecem de PD-L1 humano (linhagem de células Flp-In T-Rex 293, Life Technologies, R780-07). As afinidades de ligação foram comparadas a um anticorpo de controle positivo G1-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 16 e 17 para a cadeia pesada e cadeia leve, respectivamente), em que os domínios variáveis de cada uma dessas foram clonados e expressos no formato de IgG1 humano que compreende a mutação LALA no domínio CH2 (formato de G1-AA).

[0396] As suspensões de HEK293, HEK.hPD-L1 e HEK.cPD-L1 foram preparadas em tampão de FACS (DPBS (Gibco, 14190-094) que contém 0.5 % de BSA (Sigma, A7906)) e semeadas a 1×10^5 célula/poço em 100 µl em placas de 96 poços de fundo redondo (VWR, 734-1797). As células foram lavadas uma vez em tampão de FACS. Os mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulado FS22-172-003-AA/He1D1.3, mAb G1-AA/E12v2 e mAb de controle negativo G1-AA/4420 foram diluídos (400 nM - 0,005 nM, diluições em 5 vezes) em 100 µl de tampão de FACS. As células lavadas foram ressuspensas na mistura de anticorpos diluída, incubadas a 4 °C por 30 minutos, e, então, lavadas uma vez em tampão de FACS. 100 µl/poço de anticorpo secundário (anticorpo identificado IgG de cabra anti-humano Alexa Fluor 647, Invitrogen, A21445) diluído em 1:1000 em tampão de FACS foram, então, adicionados, incubados por 20 min em 4 °C, e as células lavadas novamente com tampão de FACS e ressuspensas em 100 µl de PBS que contém 7AAD (1:1000, Biotium, 40043) antes de serem analisados com o uso de um citômetro de fluxo Canto II (BD Bioscience). As células mortas foram excluídas e a fluorescência no canal APC (638 nm 660/20) foi medida. Os valores de média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) foram plotados vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0397] Constatou-se que os anticorpos mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 e G1-AA/E12v2 se ligaram ao PD-L1 humano de superfície celular com valores de EC₅₀ na faixa de 3,1 - 3,7 nM e PD-L1 de cinomolgo de superfície celular com valores de EC₅₀ na faixa 0,6 - 0,7 nM (consultar **Tabela 11**). Nenhuma

ligação às células HEK293 que carecem de superexpressão de PD-L1 foi observada mostrando a especificidade da ligação. Portanto, mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 testado se ligou especificamente ao PD-L1, sem ligação não específica observada. Esses resultados mostram que a especificidade ao PD-L1 humano e cino observada para o mAb PD-L1 (consultar **Exemplo 5.3.3**) é mantida.

Tabela 11

		FS22-172-003-AA/E12v2 EC₅₀ (nM)	G1-AA/E12v2 EC₅₀ (nM)
PD-L1 Humano	EC ₅₀ (nM)	3,7 ± 0,4	3,1
PD-L1 de cinomolgo	EC ₅₀ (nM)	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3

9.6 Afinidade de ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano a CD137 humano e de cinomolgo expresso em superfície celular por citometria de fluxo

[0398] As células DO11.10 (National Jewish Health [Saúde Judaica Nacional]) que expressam CD137 humano (SEQ ID NO: 185) ou cinomolgo de comprimento total (SEQ ID NO: 189), designadas "DO11.10.hCD137" e "DO11.10.cCD137" respectivamente, foram produzidas a fim de apresentar o antígeno em uma confirmação de ligação à membrana, mais similar a sua forma natural, para caracterização adicional de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano selecionado. Os detalhes da produção de célula DO11.10.hCD137 e DO11.10.cCD137 e a confirmação de expressão são descritos no **Exemplo 1.2**.

[0399] O mAb² CD137/PD-L1 anti-humano FS22-172-003-AA/E12v2 foi testado quanto a ligação às células que expressam CD137 humano ou cinomolgo (DO11.10.hCD137 ou DO11.10.cCD137) com o uso de citometria de fluxo. A ligação não específica também foi avaliada por teste de ligação às células DO11.10 que carecem de expressão de CD137. Os domínios variáveis de MOR7480.1 (Patente nº US2012/0237498) foram clonados e expresso em formato de IgG1 humano que compreende a mutação LALA no domínio CH2 (formato de G1-AA) e essa foi usada como um controle positivo.

[0400] Resumidamente, as suspensões de DO11.10, DO11.10.hCD137 ou DO11.10.cCD137 foram preparadas em tampão de FACS (DPBS que contém (Gibco, 14190-094) que contém 0,5 % de BSA (Sigma, A7906)) e semeadas a 1×10^5 célula/poço em 100 µl em placas de 96 poços de fundo redondo (VWR, 734-1797). As células foram lavadas uma vez em tampão de FACS e mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulado FS22-172-003-AA/He1D1.3, anticorpo G1-AA/MOR7480.1 e mAb de controle negativo G1-AA/4420 foram diluídos (400 nM - 0,005 nM, diluições em 5 vezes) em 100 µl de tampão de FACS. As células lavadas foram ressuspensas na mistura de anticorpos diluída, incubadas a 4 °C por 30 minutos, e, então, lavadas uma vez em tampão de FACS. 100 µl/poço de anticorpo secundário (anticorpo identificado IgG de cabra anti-humano Alexa Fluor 647, Invitrogen, A21445) diluído em 1:1000 em tampão de FACS foram, então, adicionados, a mistura de células/anticorpo foi incubada por 20 min em 4 °C, e as células foram, então, lavadas novamente com tampão de FACS e ressuspensas em 100 µl de PBS que contém 7AAD (1:1000, Biotium, 40043) antes de serem analisados com o uso de um citômetro de fluxo Canto II

(BD Bioscience). As células mortas foram excluídas e a fluorescência no canal APC (638 nm 660/20) foi medida. Os valores de média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) foram plotados vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0401] Os resultados são mostrados na **Tabela 12**. Constatou-se que os mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 e FS22-172-003-AA/He1D1.3 mAb² simulados se ligam aos receptores CD137 humano e cino expressos em superfície celular com valores de EC₅₀ na faixa de 4,8 - 9,1 nM, e constatou-se que o mAb de controle positivo se liga aos receptores CD137 humano e cino com um valor de EC₅₀ de 1,45 nM e 4,4 nM, respectivamente. Nenhuma ligação às células DO11.10 ou HEK293 que não superexpressam CD137 foi observada, confirmando a especificidade de ligação pelo mAb².

Tabela 12

Antígeno	FS22-172-003-AA/ E12v2 (EC₅₀ (nM))	FS22-172-003-AA/ He1D1.3 (EC₅₀ (nM))	G1-AA/MOR7480.1 (EC₅₀ (nM))
CD137 Humano	6,2 ± 1,95	6,25 ± 2,03	1,48 ± 0,4
CD137 de cinomolgo	7,39 ± 6,07	9,09 ± 6,93	2,6 ± 1,85

9.7 Afinidade de ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano a CD137 e PD-L1 endogenamente expresso em células T humanas primárias ativadas

[0402] A afinidade dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano para

CD137 e PD-L1 endogenamente expressos em células T humanas primárias ativadas foi determinada com o uso de citometria de fluxo. Para isolar células T, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir de cones de depleção de leucócito, um subproduto de doações de plaqueta. Resumidamente, teores de cone de leucócito foram lavados com PBS e revestidos em um gradiente Ficoll (Sigma-Aldrich, 1440-02). PBMCs foram isoladas por centrifugação e as células que não cruzaram o gradiente Ficoll foram recuperadas. PBMCs foram adicionalmente lavadas com PBS e as hemácias restantes foram lisadas através da adição de 10 ml de 1X tampão de lise de hemácia (eBioscience, 00-4300-54), de acordo com as instruções do fabricante. As células T Pan foram isoladas das PBMCs presentes no eluente com o uso do kit de Isolamento de Célula T Pan II (Miltenyi Biotec Ltd, 130-095-130) de acordo com as instruções do fabricante. CD137 é rapidamente expresso em altos níveis em células T CD8⁺ ativadas e também em células T CD4⁺ ativadas com níveis inferiores (Xue-Zhong Yu *et al*, 2013), portanto, as células T Pan foram estimuladas por 24 horas com o uso de microesferas CD3/CD28 de Ativador T Humano DynabeadsTM (Thermo, 11132D), de acordo com as instruções do fabricante. As microesferas de Ativador T Humano foram lavadas das células T com o uso de um Ímã DynaMagTM-15 (Thermo, 12301D), seguindo as instruções do fabricante antes de usar em um ensaio de ligação à célula para teste quanto a ligação de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulado FS22-172-003-AA/HelD1.3, anticorpo PD-L1 anti-humano de controle positivo G1-AA/E12v2, anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/MOR7480.1, anticorpo de controle negativo G1-

AA/4420.

[0403] As suspensões de célula T humana pan estimuladas foram preparadas em tampão de FACS ((DPBS (Gibco, 14190-094) que contém 0,5 % de BSA (Sigma, A7906)) e foram semeadas a 1×10^5 célula/poço em 100 µl em placas de 96 poços de fundo redondo (VWR, 734-1797). As células foram lavadas uma vez em tampão de FACS e mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulados FS22-172-003-AA/He1D1.3, anticorpo de controle positivo G1-AA/E12v2, anticorpo de controle positivo G1-AA/20H4.9, e anticorpo de controle negativo G1-AA/4420 foram diluídos (80 nM - 0,005 nM, em diluições em 5 vezes) em 100 µl de tampão de FACS. As células lavadas foram ressuspensas na mistura de anticorpos diluída que contém anticorpo identificado FITC CD4⁺ anti-humano (BD Biosciences, 550628) e anticorpo identificado CD8⁺ anti-humano eFluor450 (Invitrogen, 48-0087-42) para diferenciar entre CD4⁺ e células T CD8⁺, incubadas em 4 °C por 30 minutos, e, então, lavadas uma vez em tampão de FACS. 100 µl/poço de anticorpo secundário (anticorpo identificado IgG de cabra anti-humano Alexa Fluor 647, Invitrogen, A21445) diluído em 1:1000 em tampão de FACS foram, então, adicionados, a mistura de células/anticorpo foi incubada por 20 min em 4 °C, e as células foram, então, lavadas novamente com tampão de FACS e ressuspensas em 100 µl de PBS que contém 7AAD (1:1000, Biotium, 40043) antes de serem analisados com o uso de um citômetro de fluxo Canto II (BD Bioscience). As células mortas foram excluídas e a fluorescência no canal APC (638 nm 660/20) foi medida para mostrar a ligação de anticorpo de teste. Os valores de Média Geométrica da Intensidade de Fluorescência (GMFI) foram plotados vs a concentração de log

de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0404] Constatou-se que o mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 se ligou às células T CD4⁺ e células T CD8⁺ humano primárias estimuladas, como mostrado pelos valores de MFI na **Figura 2**. O anticorpo de controle positivo PD-L1 G1-AA/E12v2 se ligou com valores de MFI similares, como o mAb² tanto às células T CD4⁺ quanto às células T CD8⁺, confirmando que PD-L1 foi expresso nas células.

[0405] G1-AA/MOR7480.1, constatou-se que o controle positivo CD137 se ligou às mesmas células descritas acima através da MFI foi muito menor que o observado para FS22-172-003-AA/E12v2 ou G1-AA/E12v2. Isso se deve, provavelmente, ao fato de haver um nível inferior de expressão de CD137 nas células, em comparação com a expressão de PD-L1. Ademais, o valor de MFI foi maior para ligação de G1-AA/MOR7480.1 às células T CD8⁺ que nas células T CD4⁺. Como descrito anteriormente, espera-se observar a expressão menor de CD137 nas células T CD4⁺ estimuladas que em células T CD8⁺ (Xue-Zhong Yu *et al*, 2013) que corresponde ao nível de ligação baixo de anticorpo de controle positivo CD137 MOR7480.1 nas células T CD4⁺ em oposição às células T CD8⁺. Essa expressão baixa de CD137 observada nas células T primárias, particularmente nas células T CD4⁺, provavelmente também corresponde à observar nenhuma ou pouca ligação do Fcab em formato de mAb² simulados (FS22-172-003-AA/HelD1.3).

9.8 Ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano a FcRn por SPR

[0406] A ligação de receptor Fc neonatal (FcRn) é importante para a reciclagem de anticorpo (Martins *et al.*,

2016). A ligação de mAb² FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E12v2 e FS22-053-008-AA/E12v2 ao FcRn humano e de camundongo foi medida por SPR com o uso de BIAcore T200 (GE Healthcare). G1-AA/HelD1.3 foi incluído como um controle de IgG de controle de isotipo que carece de mutações no domínio CH3.

[0407] Resumidamente, os mAb² foram individualmente revestidos em célula de fluxo 2, 3 e 4 de Chip de Sensor CM5 Série S (GE Healthcare, BR100530) para obter uma resposta de aproximadamente 1000 RU. A célula de fluxo 1 foi ativada/desativada, mas deixada em branco como uma referência. FcRn humano (Acro Biosystems, FCM-H5286) ou FcRn de camundongo (R&D systems, 9114-Fc) foi dialisado e diluído em tampão de MHBS-EP⁺B, pH 6,0 ou pH 7,4 (10 mM de MES, FortéBio, 18-5026; 1x HBS-EP, GE Healthcare, BR100669; 0,1 mg/ml BSA, Sigma, A7906) e injetado na célula de fluxo 1, 2, 3 e 4 a 2000-3000 nM com diluições em 2 vezes por 1 min a 80 µl/min e, então, foi permitido que o mesmo se dissociasse em tampão por 3 min. Uma regeneração não foi exigida. Os dados subtraídos (célula de fluxo 2 - célula de fluxo 1, célula de fluxo 3 - célula de fluxo 1, ou célula de fluxo 4 - célula de fluxo 1) foram analisados com o uso de Software Evaluation 2.0 Biacore T200 para identificar a ligação com o uso da afinidade de estado estável modelo. Os dados de ligação são mostrados na **Tabela 13** e demonstraram que mAb² FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E12v2 e FS22-053-008-AA/E12v2 se ligaram ao FcRn humano ou de camundongo a pH 6,0 com afinidades similares ao anticorpo de controle G1-AA/HelD1.3. Nenhuma ligação foi observada com FcRn humano ou de camundongo a pH 7,4. Esses dados mostraram

que a ligação de FcRn foi mantida pelo mAb².

Tabela 13

	FcRn Humano K _D (M)		FcRn de Camundongo K _D (M)	
	pH = 6,0	pH = 7,4	pH = 6,0	pH = 7,4
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1,22 x 10 ⁻⁶	Sem ligação	1,67 x 10 ⁻⁷	Sem ligação
FS22-172-003-AA/E12v2	1,12 x 10 ⁻⁶	Sem ligação	1,58 x 10 ⁻⁷	Sem ligação
FS22-053-008-AA/E12v2	9,98 x 10 ⁻⁷	Sem ligação	1,77 x 10 ⁻⁷	Sem ligação
G1-AA/HelD1.3	1,23 x 10 ⁻⁶	Sem ligação	1,60 x 10 ⁻⁷	Sem ligação

9.9 Ligação de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano às células que expressam receptores Fcγ por citometria de fluxo

[0408] Os anticorpos agonísticos que alvejam membros de TNFRSF exigem reticulação por meio de receptores Fcγ para acionar o agrupamento e a ativação alvo para obter atividade *in vivo* (Li et al, 2013). No entanto, a fim de circunavegar efeitos sem alvo potenciais como ativação de CD137 sistêmico devido à reticulação por ligação de receptor Fcγ e diminuir a possibilidade de induzir ADCC de células imunológicas, por exemplo, células T, que expressam ambos os alvos, decidiu-se diminuir a habilidade de ligação de receptor Fcγ dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano por introdução de uma mutação LALA no domínio CH2 (consultar **Exemplo 3.2** para detalhes sobre o formato LALA). A ligação de célula por citometria de fluxo às células CHO que superexpressam apenas FcγRIIA (nº de

catálogo ECACC: 15042905), FcγRIIA (nº de catálogo ECACC: 15042903), FcγRIIIA (nº de catálogo ECACC: 15042902), FcγRIIIA (nº de catálogo ECACC: 15042901), ou FcγRIIB (nº de catálogo ECACC: 15042907) foi usada para confirmar que a presença da mutação LALA no domínio CH2 dos mAb² CD137/PD-L1 anti-humano reduziu afinidade de ligação para os receptores Fcγ anteriormente mencionados.

[0409] Resumidamente, as suspensões de CHO.FcγRIIA.131H, CHO.FcγRIIA.131E, CHO.FcγRIIIA.158F, CHO.FcγRIIIA.158V, CHO.FcγRIIB, ou CHO.WT foram preparadas em tampão de FACS (DPBS que contém (Gibco, 14190-094) que contém 0,5 % de BSA (Sigma, A7906)) e semeadas a 1×10^5 célula/poço em 100 µl nas placas de 96 poços de fundo redondo (VWR, 734-1797). As células foram lavadas uma vez em tampão de FACS e mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, controle positivo para anticorpo que liga receptor Fcγ G1/4420 e controle negativo para anticorpo de receptor Fcγ G1-AA/4420 foram diluídos (500 nM - 0,03 nM, diluições em 4 vezes) em 100 µl de tampão de FACS. As células lavadas foram ressuspensas na mistura de anticorpos diluída, incubadas a 4 °C por 30 minutos, e, então, lavadas uma vez em tampão de FACS. 100 µl/poço de anticorpo secundário (anticorpo identificado IgG de cabra anti-humano Alexa Fluor 488, Stratech Scientific Ltd, 109-545-098-JIR) diluído em 1:1000 em tampão de FACS foram, então, adicionados, a mistura de células/anticorpo foi incubada por 20 min em 4 °C, e as células foram, então, lavadas novamente com tampão de FACS e ressuspensas em 100 µl de PBS que contém 7AAD (1:1000, Biotium, 40043) antes de serem analisados com o uso de um citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter). As células mortas foram excluídas e a fluorescência no canal FITC (488

nm 525/40) foi medida. Os valores de média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) foram plotados vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0410] O mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 não mostrou ligação (ou se ligou abaixo do nível do anticorpo de controle negativo G1-AA/4420) a todos as células que expressam receptor Fcγ testadas (**Figura 3** (A) FcγRIIA 131H, (B) FcγRIIA 131E, (C) FcγRIIB, (D) FcγRIIIA 158F, (E) FcγRIIIA 158V). Isso indica que a mutação LALA diminui a ligação ao FcγRIIA, FcγRIIIA ou FcγRIIB que também diminui a reticulação de mAb² por meio desses receptores *in vivo*.

Exemplo 10: Caracterização de função de mAb²

10.1 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio célula T CD8+ humana primário

[0411] O ensaio de célula T humana primário descrito no **Exemplo 3.5** foi usado para testar a atividade do mAb².

[0412] Para reticulação com base em célula de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano, células HEK293 que superexpressam hPD-L1 (HEK.hPD-L1) foram produzidas essencialmente como descrito no **Exemplo 3.5**. As células HEK.hPD-L1 foram geneticamente modificadas para expressar um nível alto de PD-L1 humano e foram usadas em conjunto com as células MDA-MB-231 que expressam um nível intermediário de PD-L1 humano, bem como células SKBR3 que expressam um nível baixo de PD-L1 humano (**Tabela 14**), como quantificado por microesferas com Capacidade para Ligarem Anticorpo (Quantum Simply Cellular, Bays Laboratories, Inc. n° de catálogo 816A) seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 14

Linhagem celular	Capacidade para Ligar Anticorpo
WT de HEK	7463 ($\pm$ 971)
HEK.hPD-L1	702000 ($\pm$ 58000)
MDA-MB-231	137369 ($\pm$ 2429)
SKBR3	14734 ($\pm$ 239)

[0413] As células T CD8⁺ foram isoladas e ativadas com o uso de um anticorpo anti-CD3 como descrito no **Exemplo 3.5**. As células HEK.hPD-L1 foram plaqueadas a 2×10^5 células por poço nas placas de fundo plano de 96 poços revestidas com anticorpo anti-CD3 (8 µg/ml) em meio de cultura de célula T de 100 µl (meio de RPMI (Life Technologies, 61870-044) com 10 % de FBS (Life Technologies), 1X Estreptomicina de Penicilina (Life Technologies, 15140122), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco, 11360-070), e 50 µM de 2-mercaptoetanol (Gibco, M6250)). Uma vez que as células HEK.hPD-L1 ou células HEK que não foram transduzidas para expressar hPD-L1 usadas como controle tenham aderido após 4 horas de incubação, todo o meio de cultura de célula T foi removido e substituído com meio de cultura de célula T de 100 µl que contém células T em uma concentração de $5,0 \times 10^5$ células/ml que resulta em $5,0 \times 10^4$ células/poço.

[0414] Para a reticulação com base em célula com níveis fisiológicos menores de expressão de PD-L1, a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana, MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), foi usada com a mesma metodologia, como descrito para reticulação com base em célula HEK.hPD-L1.

[0415] Os mAb² foram diluídos em meio de célula T em concentração final de 2X que começa a 50 nM e um 1:5 de microtitulação foi realizado. 100 µl de microtitulação de mAb² foram adicionados às células por um volume de ensaio total de 200 µl e 1X de concentração de anticorpo.

[0416] O anticorpo anti-CD137 de controle positivo (G1-AA/20H4.9) foi diluído em meio de célula T em uma concentração final de 2X que começa em 50 nM que contém 50 nM de agente de reticulação (o anticorpo CH2 anti-humano (mG1/MK1A6)) e uma microtitulação de 1:5 foi realizada. 100 µl de mistura de anticorpos/reticuladores de controle positivo diluídos foram adicionados às células para um total de 200 µl de volume de ensaio e concentração de 1X de anticorpo.

[0417] O ensaio foi incubado a 37 °C, 5 % de CO₂ por 72 horas. Os tensoativos foram coletados e ensaiados com kit de ELISA de IL-2 humano Ready-SET-Go! (eBioscience, Cat. 88-7025-88) seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com o Software Gen5, BioTek. Os valores de absorbância de 630 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gen5, BioTek). A concentração de IL-2 humano (hIL-2) foi plotada vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0418] A **Tabela 15** mostra os valores de EC₅₀ e uma resposta máxima de liberação de IL-2 observada no ensaio de ativação de célula T na presença do mAb² CD137/PD-L1 anti-humano

testado com reticulação com base em célula. O mAb CD137 anti-humano de controle positivo, 20H4.9, mostra um aumento em liberação de hIL-2 com um EC₅₀ de 0,21 a 0,31 nM quando reticulado com anticorpo anti-hCH2 em qualquer ensaio. Todos os clones tiveram atividade nos ensaios, em que cada um exibiu potência com EC₅₀s sub-nanomolares. mAb² que contém Fcab FS22-172-003 elicitou a maior resposta de célula T com EC₅₀s na faixa de 0,19 a 0,31 nM no ensaio com base em HEK.hPD-L1 e 0,01 - 0,02 nM no ensaio com base em MDA-MB-231. Um subconjunto dos mAb² (que contém Fcabs FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-173-003 e FS22-172-004) também foi testado sem reticulação por PD-L1 expressa em células HEK e mostrou nenhuma atividade nesse ensaio, como esperado. As **Figura 4** e **Figura 5** mostram gráficos representativos de liberação de IL-2 para o ensaio de ativação de célula T para mAb² listados na **Tabela 15**.

[0419] A linhagem de Fcab FS22-053 e FS22-172 também foi testada nesse ensaio com o uso do menor PD-L1 que expressa linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano, SK-BR-3 (ATCC HTB-30). Como esperado, a menor expressão de PD-L1 resultou na menor ativação de célula T CD8⁺ em linha com os dois ensaios anteriores (dados não mostrados).

Tabela 15

	EC ₅₀ (nM) Doador 171115A		EC ₅₀ (nM) Doador 171115B	
	HEK.hPD-L1 XL	MDA-MB-231 XL	HEK.hPD-L1 XL	MDA-MB-231 XL
FS22-053-008-AA/E05v2	0,16	0,01	0,11	0,02

	EC ₅₀ (nM) Doador 171115A		EC ₅₀ (nM) Doador 171115B	
mAb ²	HEK.hPD- L1 XL	MDA-MB- 231 XL	HEK.hPD- L1 XL	MDA-MB- 231 XL
FS22-053-008-AA/E12v2	0,10	0,01	0,11	0,02
FS22-053-008-AA/G12v2	0,13	0,02	0,12	0,02
FS22-053-017-AA/E05v2	0,15	0,01	0,12	0,01
FS22-053-017-AA/E12v2	0,11	0,01	0,12	0,01
FS22-053-017-AA/G12v2	0,10	0,01	0,20	0,01
FS22-172-003-AA/E05v2	0,27	0,02	0,19	0,02
FS22-172-003-AA/E12v2	0,24	0,02	0,31	0,02
FS22-172-003-AA/G12v2	0,21	0,02	0,22	0,01
G1-AA/20H4.9	0,21	0,31	0,29	0,28

[0420] Os resultados mostraram que o mAb² pode se ligar às células que expressam níveis diferentes de PD-L1. A ligação ao PD-L1 expresso em célula resultou em reticulação dos mAb², de modo que os mesmos tivessem a capacidade para se ligara, se agruparem ou ativarem CD137 em células T, como medido pela produção de IL-2. O nível de ativação observado

com relação ao nível de reticulação por ligação de PD-L1, em que o mAb² ligado às células que expressam níveis superiores de hPD-L1 (HEK.hPD-L1), teve a maior ativação, enquanto os níveis inferiores de expressão de PD-L1 elicitaram a menor ativação.

10.2 Atividade de um mAb² CD137/PD-L1 anti-humano reticulado com populações diferentes de células HEK.hPD-L1 em um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ primário humano

[0421] Visto que foi observado que o nível de expressão de PD-L1 por linhagens celulares diferentes impacta a ativação de CD137, decidiu-se explorar adicionalmente o impacto da expressão de PD-L1 na atividade funcional do mAb² testado. Um ensaio similar àquele descrito no **Exemplo 10.1** foi realizado, em que a razão de HEK.hPD-L1 para células HEK.WT foi variada a fim de modular o nível de expressão de PD-L1 humano em uma abordagem com base em população.

[0422] As células HEK.hPD-L1 e células HEK que não foram transduzidas para expressar hPD-L1 (HEK.WT) foram plaqueadas em razões diferentes para fornecer a porcentagem de células HEK.hPD-L1 das células HEK totais presentes listadas na **Figura 6** (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,5 % ou 0 %). As células HEK foram plaqueadas a 2×10^5 células HEK totais por poço em placas de fundo plano de 96 poços revestidas com anticorpo anti-CD3 (8 µg/ml) em meio de cultura de célula T de 100 µl (meio de RPMI (Life Technologies, 61870-044) com 10 % de FBS (Life Technologies), 1X de Estreptomicina de Penicilina (Life Technologies, 15140122), 1 mM de Piruvato de Sódio (Gibco, 11360-070), e 50 µM 2-mercaptoetanol (Gibco, M6250)). Uma vez que todas as células HEK tenham aderido após 4 horas de incubação, todo meio de cultura de

célula T foi removido e substituído com meio de cultura de célula T de 100 µl que contém células T em uma concentração de $5,0 \times 10^5$ células/ml que resulta em $5,0 \times 10^4$ células/poço.

[0423] O ensaio foi executado com mAb² CD137/PD-L1 anti-humano FS22-172-003-AA/E12v2, mas, de outra forma, seguiu o protocolo descrito no **Exemplo 10.1**. O anticorpo de controle positivo de anti-CD137 G1-AA/20H4.9 foi incluído com reticulação adicional por meio de um anticorpo anti-CH2. O anticorpo G1-AA/4420 foi usado como um controle negativo.

[0424] Os resultados na **Figura 6** mostram que visto que a população de células HEK.hPD-L1 aumentou, a atividade do mAb² também aumentou, como ilustrado por um aumento na concentração de hIL-2 máxima observada. Em que 100 % da população de células HEK presentes foram HEK.hPD-L1, a reticulação máxima foi obtida e a maior concentração de hIL-2 máxima foi observada. O anticorpo de controle positivo G1-AA/20H4.9 também obteve uma concentração de hIL-2 máxima similar quando artificialmente reticulado maximamente por um anticorpo anti-CH2.

[0425] Os dados apoiam a observação de que a quantidade de PD-L1 presente no sistema (representado por linhagens celulares de teste que expressam níveis diferentes de PD-L1 em suas superfícies celulares ou por modulação do número de células em uma população que exhibe PD-L1) controla a reticulação dos mAb² e, dessa forma, dita o nível de agonismo de CD137 induzido pelo mAb². No entanto, mesmo onde apenas baixos níveis de PD-L1 estão presentes, o mAb² ainda teve a capacidade para CD137 agonista. Espera-se, portanto, que o mAb² tenha atividade onde PD-L1 é expresso em um sistema e as células T ativadas que expressam CD137 estão presentes.

Visto que o nível de PD-L1 no sistema aumenta, também é esperado que o agonismo exercido aumente. Em oposição ao mAb² que ainda teve a capacidade para induzir agonismo de CD137 na presença de baixos níveis de CD137, espera-se que as moléculas de CD137/PD-L1 que se ligam a CD137 monovalentemente tenham baixa eficácia na presença de níveis baixos de PD-L1, visto que as moléculas se ligam ao PD-L1 são propensas a estarem muito distantes para acionar o agrupamento de CD137, o que não é esperado ser um problema onde a molécula pode se ligar a CD137 bivalentemente, como é o caso no mAb² da invenção.

10.3 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio de reação de linfócito misturado primário humano

[0426] A atividade do mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foi testada em um ensaio de Reação de Linfócito Misturado (MLR) (consultar **Exemplo 5.3.4**). O ensaio de MLR usou células T CD4⁺ de um doador e células dendríticas derivadas de monócitos (iDCs) de outro doador. Visto que as células imunológicas contêm níveis fisiológicos de reguladores de ponto de checagem imunológicos, o ensaio de MLR pode ser usado para confirmar que a ativação de célula T é intensificada pelo mAb² em um sistema humano.

[0427] As células T expandidas CD4⁺ e iDC foram geradas como descrito no **Exemplo 5.3.4**.

[0428] As células T expandidas foram descongeladas um dia antes do experimento, lavadas com Meio AIM V (Gibco, 12055-091) e incubadas a 37 °C, 5 % de CO₂ em Meio AIM V durante a noite. Os anticorpos anti-CD137 e anti-PD-L1 e mAb² CD137/PD-L1 anti-humano listados na **Tabela 16** foram diluídos 4x a concentração final em triplicata em 50 µl de Meio AIMV

nas placas de fundo redondo de 96 poços (VWR, 734-1797). Um anticorpo glicoproteína gH de anti-Citomegalovírus (CMV), designado MSL109 (descrito no documento W01994/016730 A1), que contém a mutação LALA foi incluído como controle negativo. Uma série de diluição de 3 vezes que começa a partir de 30 nM a 0,002 nM foi testada. 1×10^4 células iDC suspensas em 50 μ l de Meio AIM V quanto 1×10^5 células T CD4⁺ expandidas suspensas em 100 μ l de Meio AIM V foram ambas adicionadas às diluições de anticorpo e incubadas por 5 dias a 37 °C + 5 % de CO₂. Os seguintes controles negativos foram incluídos: Células T CD4⁺ por si só, iDC por si só, células T CD4⁺ + iDCs e apenas Meio AIM V. Os tensoativos foram colhidos, as amostras foram diluídas (1:25) e as concentrações de interferon-gama (IFN- γ) medidas com o uso de Kit ELISA de IFN gama Humano Ready-SET-Go! (Life Technologies, 88-7316-77). As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com o Software Gen5, BioTek. Os valores de absorbância de 630 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gen5, BioTek). A concentração de IFN- γ humano foi plotada vs a concentração de log de anticorpo e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0429] O anticorpo PD-L1 anti-humano G1/S70 mostrou atividade potente no ensaio de MLR com um valor de EC₅₀ de 0,06 nM e um nível máximo de IFN- γ (E_{máx}) de 1135 pg/ml (**Tabela 16, Figura 7A e 7B** representativas). O EC₅₀ indica a concentração de mAb na qual metade da resposta agonística é

obtida, enquanto o $E_{\text{máx}}$ é um valor absoluto que indica a concentração máxima de IFN- γ obtida no ensaio. Nenhuma atividade foi observada com o anticorpo de controle negativo G1-AA/MSL109, como esperado. O anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/20H4.9, quando reticulado com anticorpo anti-hCH2, não elicitou qualquer atividade, indicando que a expressão de CD137 pode ser mais baixa e que o bloqueio de PD-L1 sobrecarrega a sinalização de CD137 nesse ensaio devido ao bloqueio humano e de cinomolgo-L1 ser muito forte. Surpreendentemente, todos os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano testados nesse ensaio mostraram valores de EC_{50} muito potentes menores que 0,04 nM e valores de $E_{\text{máx}}$ altos na faixa de 2626 a 3327 pg/ml. Isso indica que o mAb² tem potência aumentada nesse ensaio acima daquela dos anticorpos monoclonais PD-L1 e CD137.

Tabela 16

Molécula (s)	Tipo	EC_{50} (nM)	$E_{\text{máx}}$ (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E05v2	mAb ²	0,03	2654
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,02	2626
FS22-053-008-AA/E05v2	mAb ²	0,02	2797
FS22-053-008-AA/E12v2	mAb ²	0,04	3128
FS22-053-017-AA/E12v2	mAb ²	0,04	3327
G1-AA/20H4.9 + CH2 anti-humano	mAb CD137	N/A	N/A
G1/S70	mAb de PD-L1	0,06	1135
G1-AA/MSL109	Isotipo	N/A	N/A
células T CD4 ⁺ por si só	Controle	N/A	N/A

Molécula(s)	Tipo	EC50 (nM)	E _{máx} (pg/ml)
	celular		
iDC por si só	Controle celular	N/A	N/A
células T CD4 ⁺ + iDC por si só	Controle celular	N/A	N/A

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação de EC₅₀

[0430] Seguindo o mesmo protocolo descrito acima, a atividade do mAb² CD137/PD-L1 anti-humano FS22-172-003-AA/E12v2 foi testada novamente em um MLR, mas dessa vez contra cada parte componente (o Fcab anti-humano FS22-172-003 em formato de mAb² simulado e o anticorpo anti-PD-L1 G1-AA/E12v2), bem como a combinação dos dois.

[0431] O anticorpo componente PD-L1 anti-humano G1-AA/E12v2, mostrou atividade potente no ensaio de MLR com um valor de EC₅₀ de 0,08 nM e um nível máximo de IFN- γ (E_{máx}) de 12421 pg/ml (**Tabela 17; Figura 7C** representativa). Nenhuma atividade foi observada com o anticorpo de controle negativo G1-AA/4420, como esperado, e nenhuma atividade foi observada com o Fcab anti-humano FS22-173-003 em formato de mAb² simulado. O anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo, G1-AA/20H4.9, quando reticulado com anticorpo anti-hCH2, não elicitou qualquer atividade, indicando que a expressão de CD137 pode ser mais baixa e que o bloqueio de PD-L1 sobrecarrega a sinalização de CD137 nesse ensaio devido ao bloqueio de PD-L1 ser muito forte, como observado acima. Como esperado, o mAb² CD137/PD-L1 anti-humano FS22-172-003-

AA/E12v2 mostraram um valor de EC_{50} muito potente de 0,07 nM e um valor de $E_{m\acute{a}x}$ alto de 17874 pg/ml. Isso indica que o mAb² diminuiu a potência nesse ensaio acima daquela dos anticorpos monoclonais anti-PD-L1 e anti-CD137 por si sós ou ambos em combinação. Os dados também mostram que o mAb² teve potência maior que a combinação de dois anticorpos que compreendem os sítios de ligação ao Fcab e ao Fab dos mAb², respectivamente.

Tabela 17

Molécula(s)	Tipo	EC_{50} (nM)	$E_{m\acute{a}x}$ (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,07	17874
FS22-172-003-AA/HelD1.3	mAb ²	N/A	3574
G1-AA/E12v2	mAb de PD-L1	0,08	12421
FS22-172-003-AA/HelD1.3 + G1-AA/E12v2	Combinação de Componente	0,06	12301
G1-AA/20H4.9 + CH2 anti- humano	mAb CD137	1,9	4307
G1-AA/E12v2 + G1-AA/20H4.9 + CH2 anti-humano	Combinação de mAb	0,14	17525
G1-AA/4420	Isotipo	N/A	N/A
células T CD4 ⁺ por si só	Controle celular	N/A	N/A
iDC por si só	Controle celular	N/A	N/A
células T CD4 ⁺ + iDC por si só	Controle celular	N/A	N/A

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a

determinação de EC₅₀

10.4 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio de ativação de célula T de memória de antígeno

[0432] A atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foi testada em um ensaio de ativação de célula T de memória de antígeno medindo-se a resposta imunológica para dois grupamentos de peptídeo distintos que contêm antígenos fisiologicamente relevantes. Um grupamento compreendeu peptídeos restritos a classe I de MHC do Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, e Influenza vírus (CEF) cuja ativação de célula T CD8⁺ de teste e o segundo grupamento compreenderam peptídeos restritos a classe II de MHC de Citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, Influenza vírus, e toxina de Tétano (CEFT), que testou a ativação de célula T CD4⁺. Visto que as PBMCs humanas de um doador único foram usadas, e visto que as células imunológicas contiveram níveis fisiológicos de reguladores de ponto de checagem imunológicos e foram estimuladas por apresentação de antígeno em vez de reticulação de receptor de célula T por anticorpo anti-CD3, os resultados do ensaio confirmaram que a ativação de célula T acionada por antígeno é intensificada pelo mAb² em um sistema humano.

[0433] As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) crioconservadas foram descongeladas e contadas e 1,9x10⁵ células foram semeadas por poço em uma placa de fundo plano de 96 poços em 200 µl de meios de Instituto Memorial Roswell Park (RPMI) que contêm 10 % de soro fetal bovino (FBS) + 1 ng/ml de IL-2 + 5 ng/ml de IL-7 e 1 µg/ml de grupamento de peptídeo CEF (Thinkpeptides, n° de catálogo PX-CEF-G) ou 1 µg/ml de grupamento de peptídeo CEFT

(Thinkpeptides, nº de catálogo PX-CEFT-G). As células foram incubadas a 37°C com 5 % de CO₂ por 3 dias. Após 3 dias, os meios foram repostos pela adição de 22,5 µl de RPMI fresco que contém 10 % de FBS e mantém 1 ng/ml de IL-2 e 1 ng/ml de IL-7. As células foram incubadas a 37°C com 5 % de CO₂ por 4 dias adicionais.

[0434] As células foram coletadas e agrupados em conjunto e, então, distribuídas ao longo de placas de fundo redondo de 96 poços a 1x10⁵ células por poço em 150 µl de RPMI que contém 10 % de FBS + 1 ng/ml de IL-2 + 5 ng/ml de IL-7 e 1 µg/ml de grupamento de peptídeo CEF ou 1 µg/ml de grupamento de peptídeo CEFT. mAb² foram diluídos nos mesmos meios que as células foram semeadas e adicionados às células.

[0435] Cada um dentre o anticorpo anti-CD137 de controle positivo (G1-AA/20H4.9) e anticorpo anti-PD-L1 de controle positivo (G1-AA/E12v2) foi diluído nos mesmos meios que as células foram semeadas, em uma concentração final de 2X que começa em 400 nM que contém 400 nM de agente de reticulação (o anticorpo CH2 anti-humano (MK1A6)) e uma microtitulação de 1:5 foi realizada. 50 µl de mistura de anticorpos/reticuladores de controle positivo diluídos foram adicionados às células para um total de 200 µl de volume de ensaio e concentração de 1X de anticorpo.

[0436] O ensaio foi incubado a 37 °C, 5 % de CO₂ por 72 horas. Os tensoativos foram coletados e ensaiados com um kit MSD U-PLEX kit (Meso Scale Discovery, nº de catálogo K15067L-2) seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas em um instrumento leitor de placa por eletroquimioluminescência MESO QuickPlex SQ 120 com o uso de uma diluição de amostra de 1:5. Uma curva padrão para o

cálculo de concentração de citocina foi calculada com o uso do software MSD Discovery Workbench 4.0 e a concentração de citocina no tensoativo foi ajustada com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0437] Como mostrado nas **Tabela 18** e **Tabela 19**, o anticorpo PD-L1 anti-humano G1-AA/E12v2, mostrou atividade tanto para ativação de célula T CD4⁺ e CD8⁺ com um valor de EC₅₀ de 0,06 nM e 0,04 nM, respectivamente (E_{máx} de 65840 pg/ml e 86613 pg/ml, respectivamente). O EC₅₀ indica a concentração de mAb na qual metade da resposta é obtida, enquanto o E_{máx} é um valor absoluto que indica a concentração máxima de IFN-γ obtida no ensaio. O anticorpo CD137 anti-humano de controle positivo G1-AA/20H4.9, quando reticulado com anticorpo anti-hCH2, mostrou atividade para ativação de célula T CD8⁺, com um valor de EC₅₀ de 0,33 nM e um valor de E_{máx} de 116204 pg/ml, mas não elicitou qualquer atividade para ativação de célula T CD4⁺, indicando que a expressão de CD137 pode ser maior em células T CD8⁺ em comparação com as células T CD4⁺. Nenhuma atividade foi observada com o anticorpo de controle negativo G1-AA/4420, como esperado. Surpreendentemente, o mAb² mostrou ativação em ambos os ensaios de ativação de célula T CD4⁺ e ativação de célula T CD8⁺ com valores de EC₅₀ de 0,08 nM e 0,03 nM, respectivamente. O mAb² pode se ligar ao PD-L1 expresso em PBMC e teve atividade de PD-L1 equivalente em ambos os tipos de célula. Ademais, a ligação ao PD-L1 expresso em PBMC resultou em reticulação do mAb², de modo que os mesmos tivessem a capacidade para se ligarem a, se agruparem a e ativarem CD137 em ambos os subtipos de célula T, como medido por liberação de IFN-γ. A concentração máxima de IFN-γ

liberado por células T tratadas com mAb² foi maior que qualquer um dos anticorpos de controle positivo com valores de E_{máx} de 86680 pg/ml e 188242 pg/ml para ativação de célula T CD4⁺ e ativação de célula T CD8⁺, respectivamente. Isso indica que o mAb² aumentou a atividade nesse ensaio acima daquela dos anticorpos monoclonais PD-L1 e CD137.

Tabela 18 - valores de ensaio de memória de antígeno de grupamento de peptídeo CEFT CD4⁺)

Molécula (s)	Tipo	EC₅₀ (nM)	E_{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,08	86680
G1-AA/20H4.9 + CH2 anti-humano	mAb CD137	N/A	12965
G1-AA/E12v2	mAb de PD-L1	0,06	65840
G1-AA/4420	Isotipo	N/A	N/A

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação de EC₅₀

Tabela 19 - valores de ensaio de memória de antígeno de grupamento de peptídeo CEF CD8⁺)

Molécula (s)	Tipo	EC₅₀ (nM)	E_{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,03	188242
G1-AA/20H4.9 + CH2 anti-humano	mAb CD137	0,33	116204
G1-AA/E12v2	mAb de PD-L1	0,04	86613
G1-AA/4420	Isotipo	N/A	N/A

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação de EC₅₀

10.5 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 de camundongo de bloqueio de PD-L1

[0438] A atividade de FS22-172-003-AA/E12v2 foi testada em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 de camundongo para investigar a atividade de bloqueio de ponto de checagem de PD-L1. A atividade funcional para PD-L1 humano foi examinada em um ensaio de liberação de IL-2 com o uso de célula T OVA DO11.10 e células de hibridoma de célula B LK35.2, como descrito no **Exemplo 5.4**.

[0439] Os resultados são mostrados na **Tabela 20**. O mAb² CD137/PD-L1 anti-humano mostrou atividade potente no ensaio de ativação de célula T DO11.10 de camundongo com um valor de EC₅₀ de 1,27 nM, que confirma que FS22-172-003-AA/E12v2 pode se ligar ao PD-L1 e bloquear a interação de PD-L1 com PD-1. Essa atividade foi similar àquela dos anticorpos de controle positivo anti-PD-L1 humano G1-AA/E12v2 e G1-AA/S70, indicando que nenhuma perda de atividade de PD-L1 anti-humano ocorreu quando G1-AA/E12v2 foi incorporado nas moléculas de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2.

Tabela 20 - Valores de ensaio de ativação de célula T DO11.10 (liberação de IL-2 de camundongo)

Molécula(s)	Tipo	EC₅₀ (nM)	E_{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	1,27	424
G1-AA/E12v2	mAb de PD-L1	1,19	480

Molécula(s)	Tipo	EC₅₀ (nM)	E_{máx} (pg/ml)
G1-AA/S70	mAb de PD-L1	1,4	498
G1-AA/He1D1.3	mAb de controle de isotipo IgG1 humano	N/A	N/A

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação de EC₅₀

Exemplo 11: Reatividade cruzada funcional de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em ensaios funcionais cinomolgo

11.1 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 de cinomolgo

[0440] O agrupamento de CD137 por meio de moléculas agonistas em células T ativadas sucinta a ativação de célula T e sinalização a jusante que resulta em, porém sem limitação, produção de IL-2. A habilidade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano para ativar células DO11.10 que expressam CD137 de cinomolgo foi testada em um ensaio de ativação de célula T. Um ensaio de ativação de célula T DO11.10 com o uso de células T DO11.10 geneticamente modificadas para superexpressar CD137 de cinomolgo foi desenvolvido e a ativação de célula T foi avaliada medindo-se a liberação de IL-2.

[0441] As células DO11.10 (National Jewish Health [Saúde Judaica Nacional]) que expressam CD137 de cinomolgo (SEQ ID NO: 189) designadas "DO11.10.cCD137", foram produzidas e a expressão de CD137 de cinomolgo confirmada como descrito no **Exemplo 1.2.**

[0442] Os seguintes mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foram testados nesse ensaio de ativação de célula T DO11.10: FS22-

172-003-AA/lamG02v3, FS22-053-008-AA/E05v2, FS22-053-008-AA/E12v2, FS22-053-008-AA/G12v2, FS22-053-017-AA/E05v2, FS22-053-017-AA/E12v2, FS22-053-017-AA/G12v2, FS22-172-003-AA/E05v2, FS22-172-003-AA/E12v2, FS22-172-003-AA//G12v2. As diluições de mAb² ou mAb de controle positivo G1-AA/MOR7480.1 com ou sem anticorpo anti-hCH2 (mG1/MK1A6) reticulador foram preparadas e adicionadas às células DO11.10.cCD137 em uma placa de fundo redondo de 96 poços que foi revestida durante a noite com 0,1 µg/ml de anticorpo anti-CD3 (clone 17A2, BioLegend, 100208) e foi semeada com 2×10^5 células HEK.cyPD-L1 a serem usadas como células de reticulação com base em célula, que superexpressam PD-L1 de cinomolgo. As células que superexpressam PD-L1 de cinomolgo foram feitas como descrito no **Exemplo 5.3.3**, com o uso de PD-L1 de cinomolgo como descrito no **Exemplo 9.5**. Após uma incubação de 18 horas, os tensoativos foram coletados e ensaiados com kit ELISA de IL-2 de camundongo (eBioscience, 88-7024-86) seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas a 450 nm com o uso do leitor de placa com Software Gens, BioTek. Os valores de absorbância de 570 nm foram subtraídos daqueles de 450 nm (Correção). A curva padrão para o cálculo de concentração de citocina se baseou no ajuste de curva logística de quatro parâmetros (Software Gens, BioTek). A concentração de mIL-2 foi plotada vs a concentração de log de mAb² ou mAb de referência e as curvas resultantes foram ajustadas com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0443] Todos os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano testados nesse ensaio mostraram atividade na presença de células HEK que superexpressam PD-L1 de cinomolgo para reticular os mAb²,

indicando que todos os mAb² têm a capacidade para se ligarem tanto ao PD-L1 de cinomolgo quanto se ligarem e agruparem CD137 de cinomolgo que elicita ativação de célula T D011.10, como lido pela produção de IL-2 (consultar a **Tabela 21** e a **Figura 8**). Todos os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano mostraram atividade similar com valores de EC₅₀ na faixa de 0,06 a 0,11 nM e valores de E_{máx} na faixa de 8060 a 12300 pg/ml de IL-2 apenas quando reticulado por meio de PD-L1 expresso em célula cinomolgo. Na ausência de PD-L1 de cinomolgo, quando o ensaio foi realizado com o uso de células HEK que não expressam PD-L1 de cinomolgo, não houve atividade como resultado de nenhuma reticulação. O anticorpo CD137 de controle positivo G1-AA/MOR7480.1 que mostrou ter reatividade cruzada com cinomolgo (Fisher *et al*, 2012) mostra atividade nesse ensaio, quando reticulado com anti-CH2, no entanto, todos os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano são melhores tanto em termos de valores de EC₅₀ inferiores quanto valores de E_{máx} superiores, indicando que reatividade cruzada e a melhor atividade em um sistema que expressa CD137 de cinomolgo.

Tabela 21

Molécula	Tipo	EC ₅₀ (nM) (reticulada)	E _{máx} (pg/ml) (reticulada)
FS22-172-003-AA-Iam/G02v3	mAb ²	0,08	12304
FS22-053-008-AA/E05V2	mAb ²	0,06	8057
FS22-053-008-AA/E12V2	mAb ²	0,08	9010
FS22-053-008-AA/G12V2	mAb ²	0,07	9656
FS22-053-017-AA/E05V2	mAb ²	0,10	9021

Molécula	Tipo	EC₅₀ (nM) (reticulada)	E_{máx} (pg/ml) (reticulada)
FS22-053-017-AA/E12V2	mAb ²	0,11	9362
FS22-053-017-AA/G12V2	mAb ²	0,08	8933
FS22-172-003-AA/E05V2	mAb ²	0,08	10520
FS22-172-003-AA/E12V2	mAb ²	0,06	11291
FS22-172-003-AA/G12V2	mAb ²	0,06	11216
G1-AA/MOR7480.1	mAb CD137	0,71	5705

11.2 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio de reação de leucócito misturado primário de cinomolgo

[0444] A atividade do mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foi testada em um ensaio de Reação de Linfócito Misturado (MLR) cinomolgo. Similar ao ensaio de MLR humano descrito no **Exemplo 10.3**, esse ensaio mede uma resposta de ensaio imunológico celular que ocorre entre duas populações de linfócitos alogênicos (mesma espécie, mas geneticamente distinta). O ensaio usa células T CD4⁺ de um indivíduo cinomolgo e monócitos CD14⁺ de outro indivíduo. Visto que as células imunológicas contêm níveis fisiológicos de reguladores de ponto de checagem imunológicos, o ensaio de MLR pode ser usado para confirmar que a ativação de célula T é intensificada pelo mAb² em um sistema de cinomolgo.

Isolamento de células T CD4⁺

[0445] PBMCs foram isoladas de amostras sanguíneas de macaco cinomolgo por separação de gradiente Ficoll. As células T CD4⁺ foram isoladas com o uso de um kit de isolamento CD4⁺ de primata não humano (Miltenyi Biotec Ltd, 130-091-102), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram usadas frescas no ensaio de MLR.

Isolamento de monócitos CD14⁺

[0446] Os monócitos intocados foram isolados de PBMCs cinomolgo com o uso de um kit de isolamento de CD14 de primata não humano (Miltenyi Biotec Ltd, 130-091-097), seguindo as instruções do fabricante. Os monócitos foram usados frescos no ensaio de MLR.

Ensaio de MLR

[0447] O mAb² CD137/PD-L1 anti-humano FS22-172-003-AA/E12v2 e anticorpo PD-L1 anti-humano G1-AA/E12v2 e anticorpo de controle de isotipo G1-AA/4420 foram diluídos 4x da concentração final em triplicata em 50 µl de Meio AIM V nas placas de fundo redondo de 96 poços (VWR, 734-1797). Um anticorpo de lisozima de ovo anti-hen (HEL), designado HelD1.3 (descrito no **Exemplo 2.2**), que contém a mutação LALA foi incluído como controle negativo. Uma série de diluição de 4 vezes que começa a partir de 300 nM a 0,02 nM foi testada. $7,5 \times 10^4$ de células de monócito suspensas em 50 µl de Meio AIM V e $7,5 \times 10^5$ de células T CD4⁺ suspensas em 100 µl de Meio AIM V foram ambas adicionadas às diluições de anticorpo e incubadas por 6 dias a 37 °C + 5 % de CO₂. Os seguintes controles negativos foram incluídos: células T CD4⁺ por si sós, monócitos CD14⁺ por si só, células T CD4⁺ + iDCs, e Meio AIM V apenas. Os tensoativos foram colhidos no dia 2 e as concentrações de interleucina 2 (IL-2) foram medidas com o uso de um Pannel de Microesfera Magnética de Citocina de Primata Não Humano MILLIPLEX MAP (Merck Millipore, n° de catálogo PRCYTOMAG-40K-01), os tensoativos também foram colhidos no dia 6 e as concentrações de interferon gama (IFN-γ) medidas com o uso do mesmo kit. As amostras analisadas nas máquinas Bio Plex 200, da Bio-Rad.

[0448] Ambos os mAb² CD137/PD-L1 anti-humano mostraram atividade nesse ensaio que indica que os mAb² têm a capacidade para se ligarem ao PD-L1 de cinomolgo e subsequentemente se ligarem e agruparem CD137 de cinomolgo nos níveis de expressão endógenos a células imunológicas de cinomolgo recentemente isoladas que resultam em liberação de citocina como resultado de ativação de célula T (consultar **Figura 9**).

11.3 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em um ensaio de PBMC primário de cinomolgo

[0449] A atividade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano foi testada em um ensaio de PBMC primário de cinomolgo. Esse ensaio mede uma resposta de ensaio imunológico celular que ocorre em uma população misturada de PBMCs que foram estimulados com mAb anti-CD3. O ensaio uso as PBMCs inteiras de um indivíduo cinomolgo e, visto que as células imunológicas contêm níveis fisiológicos de reguladores de ponto de checagem imunológicos, o ensaio de PBMC pode ser usado para confirmar que a ativação de célula T é intensificada pelo mAb² em um sistema de cinomolgo.

[0450] O experimento foi realizado essencialmente como descrito no **Exemplo 3.5** com os seguintes desvios: o anticorpo anti-CD137 de controle positivo (G1-AA/MOR7480.1) foi diluído nos mesmos meios que as células foram semeadas, em uma concentração final de 2X que começa a 40 nM que contém 40 nM de agente de reticulação (o anticorpo CH2 anti-humano (MK1A6) e uma microtitulação de 1:4 foi realizada. Os mAb² (FS22-172-003-AA/E12v2) e o anticorpo de controle negativo (G1-AA/HelD1.3) foram diluídos da mesma maneira sem o agente de reticulação. 100 µl de mistura de

anticorpos/reticuladores diluídos foram adicionados às células para um total de 200 µl de volume de ensaio e concentração de 1X de anticorpo. O ensaio foi incubado a 37°C com 5 % de CO₂ por 3 dias.

[0451] Os tensoativos foram coletados e ensaiados com um kit de Painel Pró-Inflamatório MSD V-Plex 1 (NHP) (Meso Scale Discovery, nº de catálogo K15056D-2), seguindo as instruções do fabricante. As placas foram lidas em um instrumento leitor de placa por eletroquimioluminescência MESO QuickPlex SQ 120. Uma curva padrão para o cálculo de concentração de citocina foi calculada com o uso do software MSD Discovery Workbench 4.0 e a concentração de citocina no tensoativo foi ajustada com o uso do log (agonista) vs equação de resposta em GraphPad Prism.

[0452] A **Figura 28A** mostra uma plotagem representativa de liberação de IFN-γ da ativação de célula T no ensaio de PBMC de cinomolgo e a **Figura 28B** mostra uma plotagem representativa de liberação de IFN-γ da ativação de célula T no ensaio de PBMC humana.

[0453] O anticorpo anti-humano CD137 G1-AA/MOR7480.1 quando reticulado com anticorpo anti-hCH2, mostrou atividade em ambos os ensaios de PBMC. Nenhuma atividade foi observada com o anticorpo de controle negativo G1-AA/HelD1.3, como esperado. Surpreendentemente, os mAb² mostraram ativação similar em ambos os ensaios de PBMC com valores de EC₅₀ de 0,08 nM e 0,03 nM, respectivamente. O EC₅₀ indica a concentração de mAb na qual metade da resposta agonística é obtida. Portanto, o mAb² pode se ligar ao PD-L1 expresso em PBMC que resultou em reticulação dos mAb², de modo que os mesmos tivessem a capacidade para se ligarem a, agruparem e

ativarem CD137 em ambas as células T de espécie, como medido por liberação de IFN- γ . A concentração máxima de IFN- γ liberado pelas células T tratadas com mAb² foi maior que qualquer um dos anticorpos de controle positivo, indicando que o mAb² aumentou a atividade nesse ensaio acima daquela dos anticorpos monoclonais anti-CD137.

Exemplo 12: Produção de um Fcab CD137 anticamundongo

[0454] Para testar a atividade de mAb² que contém uma região de ligação do antígeno CD137 em modelos de camundongo *in vivo*, devido ao risco de não ter a capacidade para obter Fcabs de reatividade cruzada de camundongo e humano devido à baixa homologia de sequência entre as sequências de CD137 de camundongo e humano, em que os Fcabs que se ligam especificamente a CD137 de camundongo foram gerados e caracterizados. Após os Fcabs de ligação a CD137 de camundongo serem gerados, surpreendentemente, constatou-se subsequentemente que FS22-053-14 teve a capacidade para ter reatividade cruzada de camundongo e humano.

12.1 Seleção de naíve de Fcabs de CD137 anticamundongo

[0455] A fim de selecionar Fcabs que se ligam a CD137 humano, as campanhas de seleção de exibição de levedura e fago foram empregadas, similar às aquelas anteriormente descritas para seleção de Fcabs que se ligam a CD137 humano (consultar **Exemplo 2.1**). O CD137 dimérico de camundongo recombinante ou CD137 de camundongo de comprimento completo que expressa células usados como antígenos (consultar **Exemplo 1**).

[0456] O antígeno mCD137-mFc-Avi interno e as células DO11.10 que expressam mCD137 (DO11.10.mCD137) foram usados em seleções com o uso das seis bibliotecas de fago. Todas as

saídas de antígeno recombinante de ciclo 3 (576 clones) e todas as saídas de seleção de célula de ciclo 3 (576 clones) foram triadas por ELISA de fago e por célula que se liga às células DO11.10.mCD137. 34 manifestações de clone de Fcab foram subclonadas e produzidas como mAb² HelD1.3, como descrito no **Exemplo 2.2**.

[0457] As quatro bibliotecas de levedura naíve que exibem domínios CH1 a CH3 de IgG1 humano anteriormente usadas para seleção de Fcabs que se ligam a CD137 humano foram usadas para seleções de Fcabs que se ligam a CD137 de camundongo. Um total de 53 ciclos de seleções separados foram realizados para identificar ligantes CD137 anticamundongo. O antígeno CD137 de camundongo biotinilado, dimérico, recombinante de produção interna (mCD137-mFc-Avi) foi usado para selecionar ligantes das bibliotecas naíve de levedura.

12.2 Caracterização de Fcabs de CD137 anticamundongo das seleções de naíve

[0458] A especificidade dos Fcabs de CD137 anticamundongo para CD137 de camundongo foi testada em formato de mAb² "simulado" HelD1.3 e medida por BLI em um sistema Octet QKe por teste quanto a ligação dos Fcabs a quaisquer outros receptores de TNFRSF de camundongo (CD40, OX40, GITR). Os biossensores de estreptavidina (PALL ForteBio 18-5021) para revestir 10 ng/μl de receptores CD40, GITR, OX40 de camundongo (todos obtidos junto a R&D Systems e biotinilados com o uso de um kit de Sulfo-NHS-SS-Biotina EZ-Link da Thermoscientific nº 21328). Fcabs de CD137 anticamundongo em formato de mAb² simulados foram diluídos em 1:1 em tampão cinético (PALL 18-1092) a uma concentração final de pelo menos 1 μM. Sensores revestidos por antígeno foram imersos

nas soluções de mAb² por 180 segundos seguido por 180 segundos em 1 × de tampão cinético. Anticorpos para cada um dos receptores de TNFRSF foram usados como controles positivos. Os clones de Fcab FS22m-055, FS22m-063, FS22m-066, FS22m-075, FS22m-135, FS22m-055, FS22m-063, FS22m-066 não se ligaram a qualquer um dos receptores de TNFRSF testados, desse modo, demonstrando suas especificidades para CD137 de camundongo.

[0459] As células HEK.FRT.luc que expressam a sequência de CD137 de camundongo (SEQ ID NO: 187) foram produzidas seguindo a mesma metodologia que anteriormente descrito no **Exemplo 2.3**. Os mAb² que contêm os Fcabs de CD137 anticamundongo anteriormente selecionados foram triados com o uso dessa linhagem celular, HEK.FRT.luc.mCD137, de acordo com o método descrito no **Exemplo 2.3**. 56 mAb² foram testados dos quais 29 foram positivos para atividade de NF-κB. Lob12.3 que contém um Fc IgG1 humano com a mutação LALA (G1-AA/lob12.3), foi usada como um mAb CD137 anticamundongo de controle positivo e mostrou um aumento em luminescência que confirmou a validade do ensaio. HelD1.3, que também contém um Fc de IgG1 humano com uma mutação LALA, foi usada como um isotipo IgG humano de controle negativo para retirar a interferência do Fab simulado de IgG humano nesse ensaio. EC₅₀s foram calculados quando possível e mAb² que não alcançaram um platô em atividade foram descartados em favor de mAb² que mostraram cinética de atividade sigmoidal clássica. mAb² foram classificados na ordem de EC₅₀ e alteração em vezes em atividade mediante a reticulação de Proteína L. FS22m-063 foi selecionado com base no fato de ter o melhor EC₅₀ mediante a reticulação (1,44 nM) e a maior

alteração em vezes em atividade mediante a reticulação (27 vezes).

12.3 Atividade de Fcabs FS22m-063, FS22-053-014 e FS22-053-017 em formato de mAb² simulados em ensaio de ativação de célula T DO11.10 CD137 de camundongo

[0460] O clone FS22-053-017 (em formato de mAb² simulado de HelD1.3) também foi comparado contra o clone de Fcab que se liga a CD137 murino FS22m-063 (também no formato de mAb² simulado de HelD1.3), bem como o clone parental FS22-053-014 (no formato de mAb² simulado de HelD1.3), em um ensaio de ativação de célula T DO11.10 CD137 de camundongo como descrito no **Exemplo 2.4**. As moléculas de mAb² foram reticuladas com Proteína L em uma razão molar de 4:1 (mAb²:Proteína L). Os resultados são mostrados na **Tabela 22**.

[0461] Como esperado, todas as moléculas testadas mostraram atividade, como medido por liberação de IL-2, quando reticuladas por Proteína L, mas não tiveram atividade quando não reticuladas. FS22m-063 que foi selecionado para se ligar a CD137 de camundongo teve a melhor atividade no ensaio, com um EC₅₀ de 0,39 nM quando reticulado. Tanto FS22-053-14 quanto FS22-053-017 tiveram atividade no ensaio, indicando que a função não foi perdida devido à mutagênese, embora FS22-053-017 tivesse uma perda ligeira em atividade com um EC₅₀ que foi aproximadamente 8 vezes pior que FS22-053-14 quando reticulado por Proteína L. A **Figura 10** mostra que os Fcabs de reatividade cruzada humano e murino amadurecido por afinidade CD137 FS22-053-014 e FS22-053-017, e Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063, em formato de mAb² simulados de HelD1.3 ativa CD137 quando reticulado com Proteína L que resulta em uma liberação de mIL-2 em um ensaio

de ativação de célula T DO11.10.

Tabela 22

Clone de Fcab (em formato de mAb ² de HelD1.3) ou mAb	Liberação de IL-2 com ou sem reticulação de Proteína L		
	Nenhum XL	+XL E _{máx} (IL-2 pg/ml)	+XL EC ₅₀ (nM)
FS22-053-014	N/A	28071	2,04
FS22-053-017	N/A	41042	16,74
FS22m-063	N/A	24175	0,39
G1-AA/lob12.3 + Proteína L	N/A	21332	2,26

N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação de EC₅₀

Exemplo 13: Caracterização *in vitro* de mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo

[0462] Para testar a atividade de mAb² que contém uma região de ligação do antígeno CD137 em modelos de camundongo *in vivo*, FS22m-063 foi escolhido como o Fcab que mostrou a melhor atividade no ensaio de ativação de célula T, como descrito no **Exemplo 12.3**.

13.1 Construção, expressão e purificação de mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo

[0463] Os mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo foram produzidos compreendendo o Fcab CD137 anticomundongo FS22m-063 e também uma região de Fab de ligação ao PD-L1 (clone YW243.55.S70 do documento US8.217.149 B2). Os mesmos foram preparados de maneira similar ao método descrito no **Exemplo 3.2** por substituição de parte do CH3 do anticorpo de ligação ao anti-PD-L1 que contém os laços de AB, CD e EF com a região

correspondente do Fcab. Esses mAb² modelo de PD-L1 compreenderam uma mutação LALA no domínio CH2 (AA). A introdução da mutação LALA no domínio CH2 de IgG1 humano é conhecida por reduzir a ligação de receptor Fcγ (Bruhns, P., et al. (2009) e Hezareh M., et al. (2001)).

[0464] Os mAb² FS22m-063-AA/PD-L1 foram produzidos por expressão transiente em células HEK293-6E e purificados com o uso de colunas de proteína A de mAb Select SuRe.

13.2 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo em um ensaio de ativação de célula T OT-1 primária humana

[0465] Para testar a atividade dos mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo nas células que não foram geneticamente modificadas para superexpressar CD137, foi necessário um ensaio de célula T primária de camundongo. As células T CD8⁺ citotóxicas ativadas são responsáveis por matar diretamente células cancerígenas e expressar CD137 em suas superfícies celulares (Ye et al, 2014). O agrupamento de CD137 é conhecido por ser essencial para induzir a sinalização a jusante e a ativação de célula T CD8⁺ adicional. Um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ foi, portanto, usado para avaliar a habilidade de mAb² para acionar o agrupamento e a sinalização a jusante subsequente de CD137. Embora tentativas tenham sido realizadas para espelhar o ensaio de ativação de célula T CD8⁺ humano identicamente, as células T CD8⁺ murino isoladas de baços de C57BL/6 ou Balb/c naïve não mostraram a ativação potencial exigida para tal ensaio. Portanto, um ensaio de ativação de célula T CD8⁺ específico de antígeno alternativo foi desenvolvido. A ativação de célula T CD8⁺ foi obtida por estímulo de antígeno de células T de OT-1 geneticamente modificadas, isoladas dos

camundongos C57BL/6 OT-1 (Jackson Laboratory, nº de Catálogo 003831) que têm um receptor de célula T específico para peptídeo de ovalbumina 257-264, e foi determinada pela liberação de IL-2.

[0466] Para isolar células T CD8⁺, esplenócitos foram isoladas de baços de camundongo OT-1 frescos. Resumidamente, cada baço de um camundongo C57BL/6 OT-1 foi coletado e armazenado em PBS antes de ser transferido para um poço de uma placa de cultura de tecido de 6 poços e mecanicamente desagregado com 2 agulhas. O baço desagregado foi passado através de uma peneira celular de 70 µm e a peneira foi enxaguada com PBS. A suspensão celular foi, então, peletizada por centrifugação, o tensoativo removido e as hemácias foram lisadas através da adição de 10 ml de 1X de tampão de lise de hemácia (eBioscience, 00-4300-54), de acordo com as instruções do fabricante. Os esplenócitos foram plaqueados para ativação de meio de célula T (IMDM, 5 % de FCS, 50 µM de 2-Mercapto Etanol, 1X de Penstrep) que contém 10 nM de peptídeo SIINFEKL (SEQ ID NO: 194) InvivoGen, nº de catálogo vac-sin) em placas de 6 poços a 10x10⁶ de células por poço. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C com 5 % de CO₂. Após 48 horas, as células T CD8⁺ foram isoladas com o uso de um Kit de Isolamento de célula T CD8⁺ (Miltenyi Biotec, 130-104-075), seguindo as instruções do fabricante. As células T CD8⁺ isoladas e ativadas foram plaqueados em médio (IMDM, 5 % de FCS, 50 µM de 2-Mercapto Etanol, 1X de Penstrep) suplementadas com 30 U/ml de IL-2 (Peprotech, AF-200-02) e mantidas a menos que 1x10⁶ por ml em cada divisão diária por 3 dias adicionais. Após os três dias de expansão as células foram, então, usadas no seguinte ensaio.

[0467] A incubação com células B16.F10, que foram cultivadas na presença de IFN- γ para induzir expressão de PD-L1, e que foram, então, pulsadas com Peptídeo SIINFEKL foi usada como um primeiro sinal para acionar a ativação inicial das células T de OT-1 e foram subsequentemente usadas para avaliar a eficácia de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70.

[0468] Resumidamente, as células B16.F10 foram primeiro cultivadas na presença de 20 ng/ml de IFN- γ murino (Peprotech, n° de catálogo AF-315-05-100UG) para induzir expressão de PD-L1. Essas células foram, então, incubadas com 500 nM de peptídeo SIINFEKL por uma hora a 37 °C antes de serem semeadas a $1,5 \times 10^4$ de células por poço em 100 μ l de meios em uma placa de 96 poços de fundo plano. 2×10^4 de células de OT-1 por poço foram adicionadas às células B16.F10 em 50 μ l de meios. Os anticorpos de teste (FS22m-063-AA/S70, G1-AA/S70, G1-AA/lob12.3, FS22m-063-AA/HelD1.3) foram preparados em uma microtitulação de 1:4 que começa a 160 nM (4X de concentração final) e 50 μ l de mistura de anticorpos foram adicionados a cada poço, que resulta consequentemente em um volume de ensaio final de 200 μ l. O ensaio foi incubado por 3 dias a 37 °C com 5 % CO₂. Após 3 dias, os tensoativos foram colhidos e um ELISA para mIFN- γ (eBioscience, n° de catálogo 88-7314-88) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

[0469] Como observado na **Figura 11** e na **Tabela 23**, o mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo tem a maior potência com um valor de EC₅₀ de 0,003 nM. Esse ensaio indica que o mAb² tem potência forte como resultado de agrupamento de CD137 que resulta em agonismo aumentado e ativação de célula T CD8+.

Tabela 23

Molécula	Tipo	EC₅₀ (nM)	E_{máx} (pg/ml)
FS22m-063-AA/S70	mAb ²	0,003	23886
G1-AA/S70 + G1-AA/lob12.3 + anti-hCH2	Combinação de mAb de controle positivo	0,02	24703
G1-AA/S70	mAb de PD-L1	0,02	19477
G1-AA/lob12.3 + anti-hCH2	mAb CD137	0,36	17833
FS22m-063-AA/He1D1.3	mAb ² simulado	n/a	3854

Meio N/A - não aplicável visto que o sinal baixo não permite a determinação EC₅₀

[0470] Tendo mostrado atividade *in vitro* e atividade superior aos controles de anticorpo positivo, é desejável, então, testar os mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo em um modelo de tumor de camundongo singênico *in vivo* adequado.

Exemplo 14: Caracterização *in vivo* de mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo

14.1 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo em um modelo de tumor de tumor singênico CT26

[0471] Tendo mostrado que o Fcab FS22m-063 tem a capacidade para acionar o agrupamento e a ativação de CD137 *in vitro*, é desejável testar sua habilidade para ativar CD137 *in vivo*.

Preparação de Fcab FS22m-063 em formato de mAb² para teste *in vivo* em camundongos

[0472] Um mAb² que compreende o Fcab CD137 anticomundongo, FS22m-063 e uma região Fab específica para PD-L1 com o uso de metodologia similar ao mAb² modelo produzido no **Exemplo 3.2** foi preparado e testado quanto atividade antitumoral *in vivo* em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26.

[0473] Controles: G1/lob12.3, G1-AA/lob12.3, G1/S70, G1-AA/4420.

[0474] Os anticorpos de controle para os experimentos *in vivo* foram produzidos por união da região pesada variável do anticorpo anti-PD-L1 S70 (clone YW243.55.S70 do documento US8.217.149 B2) à região de constante de IgG humano (G1m17) que contém a mutação LALA, e a região leve variável do anticorpo S70 foi unida à região de constante humana (Lm1) por meio de região J kappa humana. O anticorpo CD137 anticomumungo Lob12.3 (Taraban *et al.*, 2002) em formato de IgG1 humano com e sem a mutação LALA na região constante foi usada como um anticorpo CD137 anticomumungo de controle positivo. O mAb² foi gerado substituindo-se o domínio CH3 do construto reformatado descrito acima com FS22m-063 e foi designado "FS22m-063-AA/S70".

[0475] Os modelos de camundongo singênico são aceitos como sistemas murinos adequados para testar o efeito antitumoral de inibir alvos terapêuticos e foram usados extensivamente para validar o desenvolvimento de produtos terapêuticos humanos. O modelo de tumor singênico CT26 foi usado nesse experimento como tumores CT26 conhecidos por serem altamente imunogênicos (Lechner *et al.*, 2013) e responderem parcialmente à monoterapia com anticorpo anti-CD137 (Kim *et al.*, 2009) e expressarem PD-L1 (Kleinovink, 2017).

[0476] Os camundongos fêmeas Balb/c (Charles River) com 8-10 semanas de idade e pesando 20-25 g, cada, foram deixados em repouso por uma semana antes do estudo começar. Todos os animais receberam microchips e um identificador único. Cada coorte tinha 12 camundongos. A linhagem celular de carcinoma

de cólon CT26 (S. Rosenberg, NIH) foi inicialmente expandida, armazenada e, então, pré-triada por meio de IDEXX BioResearch para patógenos que usam o protocolo IMPACT I e mostraram estar livres de patógeno. Cada animal recebeu $0,1 \times 10^6$ de células injetadas subcutaneamente no flanco esquerdo em 100 μ l de DMEM. 7 dias após inoculação de célula tumoral, os camundongos que não tiveram tumores nesse momento foram removidos do estudo.

[0477] O mAb² FS22m-063-AA/S70 e os anticorpos de controle (G1/lob12.3, G1-AA/lob12.3 (anti-CD137 controles positivos), G1/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/4420 (controle de isotipo)) foram injetados intraperitonealmente em camundongos em 20 μ g por camundongo (uma concentração final de ~ 1 mg/kg) em DPBS + 1 mM de arginina + 0,05 de Tween 80. Cada camundongo recebeu as moléculas de mAb² ou o anticorpo de controle ou uma combinação de dois anticorpos de controle por 200 μ l de injeção intraperitoneal (IP) nos dias 7, 9 e 11 que seguem a inoculação de tumor. As medições precisas de tumores foram realizadas, qualquer dosagem de fármaco no dia em questão foi realizada, e os camundongos foram colocados sob observação pelo restante do estudo. As medições de volume tumoral foram feitas com calibres para determinar o eixo geométrico mais longo e o eixo geométrico mais curto do tumor. A fórmula a seguir foi usada para calcular o volume tumoral:

$$L \times (S^2) / 2$$

em que L = eixo geométrico mais longo; S = eixo geométrico mais curto

[0478] Como mostrado na **Figura 12**, o mAb² FS22m-063-AA/S70 mostrou inibição de crescimento tumoral significativa em

comparação com os camundongos tratados com algum dentre os anticorpos de controle. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado Grupo em comparação com todos os grupos. Nenhum dos camundongos mostrou sinais de toxicidade explícita e todos os tratamentos foram bem tolerados, indicando que um CD137 e PD-L1 de alvo específico não induz a toxicidade significativa.

[0479] Todos os animais que contêm tumores que tem medição igual ou abaixo de $62,5 \text{ mm}^3$ foram contados como animais completamente responsivos (consultar **Tabela 24**). 28 % dos animais tratados com G1/lob12.3 (controle positivo de anti-CD137 sem mutação LALA) foram considerados como livres de tumor no fim do estudo, enquanto 7 % dos animais tratados com G1-AA/lob12.3 (controle positivo de anti-CD137 com a mutação LALA) e 0 % de FS22m-063-AA/S70 (Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo) de camundongos tratados foram considerados livres de tumor. FS22m-063-AA/S70 induz a inibição de crescimento tumoral significativa em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG. Nenhum animal tratado com G1-AA/4420 (controle de IgG) ou G1/S70 (controle positivo de PD-L1) estava livre de tumor no fim do estudo. Os gráficos na **Figura 17** mostram as medições de crescimento tumoral em mm^3 para cada animal ao longo do tempo.

Tabela 24: Número e porcentagem de camundongos livres de tumor no fim do estudo no estudo de tumor singênico CT26.

Composto	Camundongos livres de tumor no fim do estudo
G1-AA/4420	0/13 (0 %)
G1-AA/lob12.3	1/14 (7 %)
G1/S70	0/14 (0 %)
G1/lob12.3	4/14 (28 %)
G1-AA/lob12.3 + G1/S70	1/14 (7 %)
FS22m-063-AA/S70	0/14 (0 %)

[0480] O estudo mostra que em camundongos com um sistema imunológico completamente funcional, em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26, agonismo de CD137, presumidamente como resultado de reticulação por meio de PD-L1, resulta em uma redução no crescimento tumoral, presumidamente através de atividade citotóxica aumentada de células T CD8⁺ no tumor.

[0481] A análise de sobrevivência (**Figura 18** e **Tabela 25**) mostrou que o FS22m-063-AA/S70 induziu um benefício de sobrevivência significativo em comparação com o controle de isotipo (G1-AA/4420). A **Tabela 25** mostra um resumo da sobrevivência média em dias para cada grupo e análise estatística em pares (classificação de Log) em modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com G1-AA/4420 (controle de IgG), a combinação de G1/S70 mais G1-AA/lob12.3 e FS22m-063-

AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 resultou em sobrevivência significativamente aumentada em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG. FS22m-063-AA/S70 mostrou nenhum benefício de sobrevivência significativo através da combinação de G1/S70 + G1-AA/lob12.3.

Tabela 25: Tempo de sobrevivência média para animais tratados com cada composto.

Composto	Sobrevivência Média (Dias)	valores p	
		classificação de Log	
FS22m-063-AA/S70	30,5		
G1/S70 + G1-AA/lob12.3	27	0,2235	Ns
G1-AA/4420	26	0,0058	**

[0482] Tendo mostrado que em camundongos com um sistema imunológico completamente funcional, em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26, agonismo de CD137, presumidamente como resultado de reticulação por meio de PD-L1, resulta em uma redução no crescimento tumoral, presumidamente através de atividade citotóxica aumentada de células T CD8⁺ no tumor, o estudo foi repetido com os seguintes desvios.

[0483] O mAb² FS22m-063-AA/S70 e anticorpos de controle G1-AA/lob12.3 (controle positivo de anti-CD137), G1/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/He1D1.3 (controle de isotipo)) foram injetados intraperitonealmente em

camundongos a 200 µg por camundongo (uma concentração final de ~10 mg/kg) em DPBS + 1 mM de arginina + 0,05 de Tween 80. Cada camundongo recebeu as moléculas de mAb² ou o anticorpo de controle ou uma combinação de dois anticorpos de controle por 200 µl de injeção intraperitoneal (IP) nos dias 7, 9 e 11 que seguem a inoculação de tumor.

[0484] O tratamento com FS22m-063-AA/S70 resultou na inibição de crescimento tumoral significativa (mostrado como média de volume tumoral na **Figura 19**) em comparação com os anticorpos de controle.

[0485] A análise de sobrevivência (**Figura 20** e **Tabela 26**) mostrou que o FS22m-063-AA/S70 induziu um benefício de sobrevivência significativo em comparação com o controle de isotipo (G1-AA/HelD1.3) e G1/S70. Não houve benefício de sobrevivência significativo através de G1-AA/lob12.3

[0486] A **Tabela 26** mostra um resumo de sobrevivência média em dias para cada grupo e análise estatística em pares (classificação de Log) em modelo de tumor singênico CT26 que cresceu subcutaneamente em camundongos Balb/c tratados com G1-AA/HelD1.3 (controle de IgG), G1/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/lob12.3 (controle positivo de anti-CD137) e FS22m-063-AA/S70 (Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 induziu a sobrevivência significativa em um modelo de tumor singênico CT26 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG e camundongos tratados com controle positivo CD137.

Tabela 26: Resumo de sobrevivência média em dias para cada grupo e análise estatística em pares (classificação de Log) em modelo de tumor singênico CT26.

Composto	Sobrevivência Média (Dias)	valores p classificação de Log	
FS22m-063-AA/S70	48,5		
G1/S70	23,5	0,0057	**
G1-AA/lob12.3	28	0,131	Ns
G1-AA/HelD1.3	27	0,0149	*

14.2 Atividade de resposta a dose de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26

Atividade antitumoral de resposta a dose

[0487] O mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70 mostrou atividade antitumoral no modelo de tumor singênico CT26 em uma dose de 20 µg por camundongo (~1 mg//kg) dosado três vezes a cada dois dias (q2dx3). Para investigar a dose ideal de mAb² FS22m-063-AA/S70 *in vivo*, uma faixa de doses (2, 6, 20 e 200 µg/camundongo, equivalente a aproximadamente 0,1, 0,3, 1 e 10 mg/kg) foram testados no modelo CT26 em um cronograma de dosagem de q2dx3 como descrito acima que começa 7 dias após a inoculação de célula tumoral. O anticorpo de controle negativo G1-AA/4420 foi incluído em uma dose de 200 µg por camundongo (~10 mg/kg) com o mesmo cronograma. O anticorpo de controle positivo G1/lob12.3 foi incluído em uma dose sub-ideal de 20 µg por camundongo (~1 mg/kg) com o mesmo cronograma.

[0488] Seguindo o mesmo protocolo como descrito no **Exemplo 14.1**, os camundongos fêmeas Balb/c (Charles River) com 8-10 semanas de idade e pesando 20-25 g, cada, foram

deixados em repouso por uma semana antes do estudo começar. Todos os animais receberam microchips e um identificador único. Cada coorte tinha 12 camundongos. A linhagem celular de carcinoma de cólon CT26 (ATCC, CRL-2638) foi inicialmente expandida, armazenada e, então, pré-triada por meio de IDEXX BioResearch para patógenos que usam o protocolo IMPACT I e mostraram estar livres de patógeno. Cada animal recebeu $0,1 \times 10^5$ de células injetadas subcutaneamente no flanco esquerdo em 100 µl de DMEM. 7 dias após inoculação de célula tumoral, os camundongos que não tiveram tumores nesse momento foram removidos do estudo.

[0489] No dia 7 do estudo, o mAb² FS22m-063-AA/S70 foi injetado intraperitonealmente em camundongos em uma concentração final de acordo com a faixa de dose descrita acima. Os anticorpos de controle (G1/lob12.3 (anticorpo de controle positivo CD137), G1-AA/4420 (controle de isotipo)) foram injetados intraperitonealmente em camundongos a uma concentração final de 20 µg por camundongo (~1 mg/kg) e 200 µg por camundongo (~10 mg/kg), respectivamente, em DPBS + 1 mM de arginina + 0,05 de Tween 80. Cada camundongo recebeu a molécula de mAb² ou o anticorpo de controle por 200 µl de injeção intraperitoneal (IP) nos dias 7, 9 e 11, após a inoculação de tumor (q2dx3). As medições precisas de tumores foram realizadas, qualquer dosagem de fármaco no dia em questão foi realizada, e os camundongos foram colocados sob observação pelo restante do estudo. As medições de volume tumoral foram feitas com calibres para determinar o eixo geométrico mais longo e o eixo geométrico mais curto do tumor, como descrito no **Exemplo 14.1**.

[0490] Como mostrado na **Figura 13A**, o mAb² FS22m-063-

AA/S70 mostrou inibição de crescimento tumoral significativa em comparação com camundongos tratados com o controle de isotipo (G1-AA/4420) quando dosado a ~0,3 mg/kg até ~10 mg/kg. A significância estatística que foi mostrada com o uso da Análise de Modelo Misturado em comparação com todos os grupos de análise de Sobrevivência, **Figura 13B e Tabela 27**, mostra que mAb² FS22m-63-AA/S70 induz um benefício de sobrevivência estatisticamente significativo em comparação com o controle de isotipo em modelo singênico CT26 quando dosado em níveis acima 0,3 mg/kg. Significância estatística realizada com o uso de teste de classificação de log (Mantel Cox). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. Nenhum dos camundongos mostrou sinais de toxicidade explícita e todos os tratamentos foram bem tolerados.

Tabela 27

Tratamento	Sobrevivência Média (dias)	Significância estatística (teste de classificação de log)			
		FS22m-063-AA/S70			
		10 mg/kg	1 mg/kg	0,3 mg/kg	0,1 mg/kg
FS22m-063-AA/S70 de 10 mg/kg	39				
FS22m-063-AA/S70 de 1 mg/kg	29	ns			
FS22m-063-AA/S70 de 0,3 mg/kg	24	***	*		
FS22m-063-AA/S70 de	21	****	***	**	

Tratamento	Sobrevivência Média (dias)	Significância estatística (teste de classificação de log)			
		FS22m-063-AA/S70			
		10 mg/kg	1 mg/kg	0,3 mg/kg	0,1 mg/kg
0,1 mg/kg					
G1-AA/4420 10 mg/kg	21	****	**	*	ns

NS significa não significativo

[0491] O estudo mostra que em camundongos com um sistema imunológico completamente funcional, em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26, agonismo de CD137, presumidamente como resultado de reticulação por meio de PD-L1, resulta em uma redução dependente de dose em crescimento tumoral e um aumento dependente de dose em sobrevivência, presumidamente através de atividade citotóxica aumentada de células T CD8⁺ no tumor.

14.3 Mecanismo de ação de resposta a dose

[0492] O mecanismo de ação do mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo foi avaliado no mesmo modelo de camundongo que porta tumor CT26, como descrito no **Exemplo 14.2**. O sangue, o baço e o tecido tumoral do portador de tumor CT26 tratado com FS22m-063-AA/S70 em quatro doses diferentes (2, 6, 20 e 200 µg/camundongo, equivalente a aproximadamente 0,1, 0,3, 1, 10 mg/kg) bem como anticorpo de controle negativo G1-AA/4420 foram testados quanto a ativação de célula T e os marcadores de proliferação conhecidos por terem efeitos a jusante de agonismo de CD137 (Fisher et al., 2012).

[0493] Seguindo o mesmo protocolo de estudo, como descrito nesse exemplo, no dia 9 (48 horas após a primeira dose), dia 11 (48 horas após a segunda dose) e no dia 15 (96

horas após a terceira dose e final) o sangue foi coletado nos tubos que contêm EDTA por punção cardíaca, e o tecido de baço e tumor foi coletado por dissecação. O tecido de baço e tumor foi desagregado para suspensão celular única por métodos mecânicos e enzimáticos padrão. As hemácias foram lisadas uma vez em tampão de lise de hemácia (eBioscience, nº de catálogo 00-4300-54) de acordo com as instruções do fabricante.

[0494] As hemácias do sangue não coagulado foram lisadas duas vezes em tampão de lise de hemácia (eBioscience nº de catálogo 00-4300-54) de acordo com as instruções do fabricante.

[0495] Todas as amostras foram, então, tratadas da mesma forma. As células foram, então, lavadas uma vez com PBS e as amostras colorizadas com corante de viabilidade fixável (Invitrogen, nº de catálogo 65-0865-14) a diluição de 1:3000 em PBS, seguindo as instruções do fabricante. As células foram colorizadas por citometria de fluxo para marcadores de superfície celular com um painel de colorização de anticorpo (todos exceto os anticorpos Ki67 e FoxP3) (**Tabela 28** abaixo) na presença de bloco Fc (eBioscience nº de catálogo 14-0161-86 a 1:50) por 30 minutos a 4 °C. As células foram, então, fixadas e permeabilizadas com o kit de colorização Foxp3 eBioscience (eBioscience nº de catálogo 00-5523-00) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de permeabilização com anticorpos Ki67 e Foxp3 na presença de bloco Fc (todos em diluição de 1:100) e incubadas por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas uma vez com tampão de permeabilização e ressuspensas em 200 µl de

PBS + 0,5 % de BSA. As células foram, então, analisadas em um citômetro de fluxo BD Fortessa. Os dados foram analisados com FlowJoX, Excel e GraphPad Prism. Os dados plotados representam a abundância e proliferação de célula T observadas ao longo do tempo para subpopulações de célula T CD4⁺ e CD8⁺. Os dados são apresentados como a porcentagem da população parental de acordo com a descrição de população no eixo geométrico Y.

[0496] Como mostrado na **Figura 14B**, a razão em porcentagem CD8⁺:CD4⁺ aumenta em favor de células T CD8⁺, tanto no tumor quanto na periferia em linha com uma dose de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo aumentada, indicando que o tratamento causa uma alteração no equilíbrio das duas subpopulações de célula T provavelmente como resultado de aumento de números de célula T CD8⁺. No dia 15, o marcador de proliferação em células T CD8⁺ é aumentado em linha com nível de dose de tratamento com a maior proliferação observada no maior nível de dose. Isso indicaria que as células T CD8⁺ se proliferaram, que é um sinal de ativação e corresponderia aos números de célula T CD8⁺ aumentados, que resulta em uma razão de célula T CD8⁺:CD4⁺ aumentada.

[0497] De modo geral, esse estudo mostrou que o aumento do nível de dose de CD137/PD-L1 anticamundongo resulta em mais células T CD8⁺ no tumor. O papel principal de células T CD8⁺ (frequentemente também chamadas linfócitos citotóxicos) é a morte de células infectadas ou malignas por meio 3 mecanismos principais: 1) liberação de citocinas por exemplo, TNF α e IFN- γ , 2) produção e liberação de grânulos citotóxicos e 3) expressão de FasL. A presença de mais células T CD8⁺ no tumor após o tratamento com CD137/PD-L1

anticamundongo presumidamente resulta em atividade citotóxica por meio desses mecanismos contra o tumor, que resulta em controle tumoral.

Tabela 28

Alvo	Clone de Anticorpo	Fluoróforo	Empresa	n° de Catálogo
CD45	30-F11	AF700	eBioscience	56-0451-82
CD3	145-2C11	PECy7	eBioscience	25-0031-82
CD4 ⁺	RM4-5	BUV395	BD Biosciences	740208
CD8 ⁺	53-6,7	BUV737	BD Biosciences	564297
FoxP3	Fjk-16S	PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5773-82
CD44	IM7	BV650	BioLegend	103049
CD62L	MEL-14	Bv421	BioLegend	104435
CD69	H1.2F3	Bv510	BioLegend	104532
Ki67	16A8	647	BioLegend	652407
PD-L1	10F.9G2	Bv785	BioLegend	124331
IgG	MK1A6	FITC	Bio-Rad	MCA647F
Viabilidade	n/a	780	Invitrogen	65-0865-14

n/a significa não aplicável

14.4 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anticomundongo em um modelo de tumor de tumor singênico MC38

[0498] Os modelos de camundongo singênico são aceitos

como sistemas murinos adequados para testar o efeito antitumoral de inibir alvos terapêuticos e foram usados extensivamente para validar o desenvolvimento de produtos terapêuticos humanos. O modelo de tumor singênico MC38 foi usado nesse experimento com tumores MC38 conhecidos por serem altamente imunogênicos e responderem a monoterapia com anticorpo anti-CD137 (Kocak *et al*, 2006) e expressarem PD-L1 (Juneja *et al*, 2017).

[0499] Os camundongos fêmeas C57BL/6 (The Jackson Laboratory) com 9-10 semanas de idade e pesando 18 a 24 g, cada, foram deixados em repouso por uma semana antes de o estudo começar. Todos os animais receberam microchips e um identificador único. Cada coorte tinha 12 camundongos. A linhagem celular de carcinoma de cólon MC38 (National Cancer Institute [Instituto Americano do Câncer], EUA) foi inicialmente expandida, armazenada e, então, pré-triada para patógenos e se mostraram estar livres de patógeno. Cada animal recebeu 1×10^6 células injetadas subcutaneamente no flanco direito em 100 µl em meio de cultura isento de soro (Meio Eagle Modificado de Dulbecco). 7 dias após inoculação de célula tumoral, os camundongos que não tiveram tumores nesse momento foram removidos do estudo.

[0500] O mAb² FS22m-063-AA/S70 e os anticorpos de controle (G1-AA/lob12.3 (controle positivo CD137), G1-AA/S70 (controle positivo PD-L1), G1-AA/4420 (controle de isotipo)) foram injetados intraperitonealmente em camundongos a uma concentração fixa de 20 µg por dose em DPBS + 1 mM de arginina + 0,05 de Tween 80. Cada camundongo recebeu a molécula de mAb² ou o anticorpo de controle por 200 µl de injeção intraperitoneal (IP) nos dias 7, 9 e 11, após as

inoculações de tumor. As medições precisas de tumores foram realizadas, qualquer dosagem de fármaco no dia em questão foi realizada, e os camundongos foram colocados sob observação pelo restante do estudo. As medições de volume tumoral foram feitas com calibres para determinar o eixo geométrico mais longo e o eixo geométrico mais curto do tumor. A fórmula a seguir foi usada para calcular o volume tumoral:

$$L \times (S^2) / 2$$

em que L = eixo geométrico mais longo; S = eixo geométrico mais curto

[0501] Como mostrado na **Figura 15**, o mAb² FS22m-063-AA/S70 mostrou inibição de crescimento tumoral significativa em comparação com os camundongos tratados com qualquer um dentre os anticorpos de controle. A significância estatística mostrou pares para taxas de crescimento ao longo do tempo total do estudo com o uso de uma análise de Modelo Misturado em comparação com todos os grupos. Como mostrado na **Tabela 29**, inesperadamente todos os camundongos tratados com mAb² FS22m-063-AA/S70 estavam livres de tumor no fim do estudo, em comparação com apenas 4 de 12 camundongos tratados com uma combinação de anticorpos anti-PD-L1 e anti-CD137 (G1-AA/S70 + G1-AA/lob12.3) ou os anticorpos PD-L1 ou CD137 por si sós. Os gráficos na **Figura 21** mostram as medições de crescimento tumoral em mm³ para cada animal ao longo do tempo.

Tabela 29

Grupo	% de Camundongos Livres de Tumor	Número de Camundongos Livres de Tumor
G1-AA/lob12.3	16 %	2/12
G1-AA/4420	0 %	0/12
G1-AA/S70	16 %	2/12
G1-AA/S70 + G1-AA/lob12.3	33 %	4/12
FS22m-063-AA/S70	100 %	12/12

[0502] O estudo mostra que em camundongos com um sistema imunológico completamente funcional, em um segundo modelo de tumor singênico, MC38, que mostra resposta sub-ideal a 1 mg/kg de mAb PD-L1, surpreendentemente, 1 mg/kg de mAb² CD137/PD-L1 induz a regressão completa de tumor em 100 % dos camundongos tratados.

[0503] A análise de sobrevivência (**Figura 22 e Tabela 30**) mostra o resumo de sobrevivência média em dias para cada grupo de tratamento tratado com 3 doses de G1-AA/4420 (controle de isotipo), G1-AA/S70 (controle positivo anti-PD-L1), G1-AA/lob12.3 (controle positivo de anti-CD137), a combinação de G1-AA/S70 mais G1-AA/lob12.3, e FS22m-063-AA/S70 (o Fcab CD137 anticamundongo FS22m-063 em um formato de mAb² PD-L1 modelo). A **Tabela 30** também mostra a análise estatística em pares (classificação de Log). FS22m-063-AA/S70 induz a sobrevivência completa em um modelo de tumor singênico MC38, com 100 % sobrevivência dos animais no fim do estudo (identificado como "indefinido"), em comparação

com os camundongos tratados com controle de IgG.

Tabela 30: Sobrevivência média em modelo de tumor MC38

Composto	Sobrevivência Média (Dias)	valores p	
		classificação de Log	
FS22m-063-AA/S70	não identificado		
G1-AA/S70 + G1-AA/lob12.3	33,5	0,0006	***
G1-AA/lob12.3	25	0,0001	***
G1-AA/S70	28	<0,0001	****
G1-AA/4420	20	<0,0001	****

14.5 Atividade de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em um modelo de tumor de tumor singênico B16.F10

[0504] O modelo de tumor singênico B16.F10 foi usado para testar a atividade antitumoral dos mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo (FS22m-063-AA/S70) *in vivo*. Esse modelo é visto como mais desafiador para tratar com anticorpos terapêuticos (Baird, J. R., et al, 2013). O anticorpo G1-AA/4420 foi usado como um controle de isotipo no estudo. O modelo de tumor singênico B16.F10 não foi mostrado anteriormente como sensível aos anticorpos agonistas CD137. No entanto, os linfócitos de infiltração de tumor (TILs) isolados dos tumores B16.F10 expressam CD137 (Curran. M., et al, 2013).

[0505] Os camundongos fêmeas C57BL/6 (Charles River) com 8-10 semanas de idade e pesando 20-25 g, cada, foram aclimatizados por uma semana antes do estudo começar. Todos

os animais receberam microchips e um identificador único. Cada coorte tinha 10 camundongos. A linhagem celular de melanoma B16.F10 (ATCC nº de catálogo CRL-6475) foi inicialmente expandida, armazenada e, então, pré-triada por meio de IDEXX BioResearch para patógenos que usam o protocolo IMPACT I e mostraram estar livres de patógeno. As células B16.F10 foram descongeladas do armazenamento a -150 °C e adicionadas a 20 ml de DMEM (Gibco, 61965-026) com 10 % de FCS (Gibco, 10270-106) em um frasco de cultura de tecido T175. Cada animal recebeu 1×10^6 células injetadas subcutaneamente no flanco esquerdo.

[0506] 20 µg de cada anticorpo foi injetado em camundongos (~1 mg/kg) em 200 µl de PBS. Cada camundongo recebeu os anticorpos por injeção intraperitoneal (IP) a cada 2 dias por 3 doses que começa no dia 7 após a inoculação de célula tumoral. Os volumes tumorais foram determinados por medição com o uso de compassos (como descrito no **Exemplo 14.1**) e qualquer dosagem de fármaco devida no dia em questão foi realizada, e os camundongos foram submetidos à observação pelo restante do teste. Os volumes tumorais foram calculados como descrito no **Exemplo 14.1**.

[0507] O teste foi interrompido quando pontos finais humanos foram alcançados com base no volume e na condição tumorais. A análise estatística de taxas de crescimento foi realizada em pares ao longo do tempo total do estudo com o uso da Análise de Modelo Misturado.

[0508] Houve desaceleração significativa de taxa de crescimento tumoral para os mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em comparação com o anticorpo de controle de isotipo G1-AA/4420 (**Figura 16**). FS22m-063-AA/S70 induziu a inibição

parcial de crescimento tumoral em um modelo de tumor singênico B16.F10 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG. Os gráficos na **Figura 23** mostram as medições de crescimento tumoral em mm³ para cada animal ao longo do tempo.

[0509] A análise de sobrevivência (**Tabela 31**) mostra o resumo de sobrevivência média em dias para cada grupo e análise estatística em pares (classificação de Log) no modelo de tumor singênico B16.F10 que cresceu subcutaneamente em camundongos C57BL/6 tratados com G1-AA/4420 (controle de isotipo) e os mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70. FS22m-063-AA/S70 induziu a sobrevivência aumentada em um modelo de tumor singênico B16.F10 em comparação com os camundongos tratados com controle de IgG.

Tabela 31: Sobrevivência média no modelo de tumor singênico B16.F10

Composto	Sobrevivência Média (Dias)	Valores p Classificação de log
FS22m-063-AA/S70	23,5	n/a
G1-AA/4420	19	n/a

[0510] Esse estudo mostrou que em camundongos com um sistema imunológico completamente funcional, em uma dificuldade notória para tratar modelo de tumor de camundongo singênico B16.F10, agonismo de CD137, presumidamente como resultado de reticulação por meio de PD-L1, resulta em uma redução no crescimento tumoral, presumidamente através de atividade citotóxica aumentada de células T CD8⁺ no tumor.

14.6 Farmacologia de fígado de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em modelo que porta tumor de camundongo singênico CT26

[0511] O tratamento com mAb anti-CD137 de pacientes com tumor sólido com urelumabe em testes clínicos de investigação resultou em eventos imunológicos relacionados a tratamento graves que se mostraram relacionados à dose de urelumabe administrada. Os efeitos desses eventos imunológicos são manifestados no fígado como hepatotoxicidade grave (Segal, N. H., *et al*, 2017).

[0512] O trabalho mecanicista pré-clínico realizado em camundongos em que os animais foram dosados com o uso de anticorpos de ferramenta agonística CD137 mostrou hepatotoxicidade similar. Esses estudos mostraram uma exigência por células T e CD137 na hepatotoxicidade resultante (Niu, L., *et al* 2007 e

[0513] Dubrot J, *et al*. 2010). Embora insuficientemente entendida, a interação entre os compartimentos de mieloide e célula T também foi mostrada como importante na iniciação da cascata inflamatória que resulta em danos e hepatotoxicidade ao fígado (Bartkowiak, T *et al.*, 2018). Portanto, esses animais modelo têm relevância traducional para a clínica na previsão do risco de hepatotoxicidade em pacientes humanos após a administração de outros agonistas CD137 e especificamente um mAb² CD137/PD-L1.

[0514] Os camundongos do estudo de tumor singênico CT26 descrito no **Exemplo 14.1** não mostraram sinais explícitos de toxicidade após dosagem repetida com mAb² FS22m-063-AA/S70 que tem capacidade de agonista CD137 mediante a reticulação de PD-L1. Para determinar a possibilidade de nesses animais

a ativação imunológica observada como resultado de tratamento com ~1 mg/kg mAb² FS22m-063-AA/S70 (que se correlacionam com atividade imunológica antitumoral) ser correlacionada com hepatotoxicidade, amostras de fígado foram tomadas na necropsia para avaliação histológica. Os camundongos de mAb² FS22m-063-AA/S70 e controle foram submetidos à necropsia 4, 7 e 14 dias após a última administração (três camundongos por grupo por ponto no tempo) e as amostras de fígado foram fixadas por formalina e incorporadas em parafina. As seções de fígado foram, então, cortadas e submetidas a avaliação histopatológica por meio de colorização com hematoxilina e eosina e pontuação de parâmetros de inflamação e danos do fígado por um patologista certificado. Os métodos para preparação de tecido e colorização histopatológica por hematoxilina e eosina são altamente padronizados e bem conhecidos na técnica.

[0515] Um sistema de pontuação foi usado para avaliar a patologia de fígado nas seções colorizadas por hematoxilina e eosina. O fígado foi pontuado quanto a patologia correspondente à necrose hepatocelular, inflamação de trato de entrada, hepatócitos degenerativos e mitose aumentada. A frequência de camundongos que mostram efeito mínimos, ligeiros, moderados e marcados em cada grupo é mostrada na **Tabela 32**.

[0516] Os animais tratados com mAb² FS22m-063-AA/S70 têm patologia de fígado mínima. Especificamente:

- necrose hepatocelular mínima a ligeira com infiltrado de linfócito misturado no parênquima
- células inflamatórias misturadas mínimas a ligeira em tratos periportais

- hepatócitos degenerativos mínimos
- mitose aumentada mínima a marcada

Tabela 32: Constatações de fígado

Fígado	G1/4420 (Controle de isotipo)			FS22m-063-AA/S70		
	D4	D7	D14	D4	D7	D14
Necrose hepatocelular, degeneração com células inflamatórias misturadas (parenquimal)						
Mínimo	3	3	3	2	2	3
Leve	0	0	0	1	1	0
Células inflamatórias misturadas (+/- SCN) em tratos de entrada						
Mínimo	1	0	0	1	3	3
Leve	0	0	0	1	0	0
Hepatócito degenerativo						
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Mitose aumentada						
Mínimo	1	1	1	2	2	3
Leve	1	0	1	1	0	0
Moderado	0	0	0	0	0	0
Marcado	0	0	0	0	0	0

[0517] Essas constatações não são consideradas como representativas de hepatotoxicidade grave, como observado com

outros exemplos de anticorpos agonistas anti-CD137.

[0518] Dada a relevância de estudos pré-clínicos em camundongos quanto a avaliação de risco de hepatotoxicidade grave em pacientes humanos tratados com agentes agonistas CD137, esses resultados indicam que um mAb² torna CD137 em agonista por reticulação mediada através de ligação ao PD-L1 tem um baixo risco de induzir hepatotoxicidade em pacientes humanos tratados em doses terapêuticas.

14.7 Ocupação de tumor e receptor periférico e efeitos farmacodinâmicos de mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em um modelo de tumor de camundongo singênico CT26

[0519] No **Exemplo 14.3**, o mAb² CD137-PD-L1 anticamundongo FS22m-063-AA/S70 mostrou a habilidade para aumentar células T CD8⁺ no tumor após múltiplas doses. Para investigar a extensão da ligação-alvo em células T, bloqueio de PD-L1 e o efeito que FS22m-063-AA/S70 tem sobre a proliferação de célula T, um estudo de farmacodinâmica de dose única foi realizado no mesmo modelo de tumor singênico CT26 como descrito no **Exemplo 14.1**.

[0520] O anticorpo G1-AA/4420 foi usado como um controle. O mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo e anticorpos de controle para os experimentos *in vivo* foram produzidos como descrito no **Exemplo 14.1**.

[0521] Seguindo o mesmo protocolo como descrito no **Exemplo 14.1**, os camundongos fêmeas Balb/c (Charles River) com 8-10 semanas de idade e pesando 20-25 g, cada, foram deixados em repouso por uma semana antes do estudo começar. Todos os animais receberam microchips e um identificador único. Esse estudo compreendeu 3 grupos de dosagem, que receberam anticorpo de controle ou mAb² em uma das duas doses

ao longo de 8 pontos no tempo (2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 192 h). Cada coorte de dosagem teve 64 camundongos (8 camundongos por ponto no tempo). A linhagem celular de carcinoma de cólon CT26 (S. Rosenberg, NIH) foi inicialmente expandida, armazenada e, então, pré-triada por meio de IDEXX BioResearch para patógenos que usam o protocolo IMPACT I e mostraram estar livres de patógeno. Cada animal recebeu 1×10^5 de células injetadas subcutaneamente no flanco esquerdo em 100 μ l de DMEM. 7 dias após inoculação de célula tumoral, os camundongos que não tiveram tumores nesse momento foram removidos do estudo.

[0522] Cada camundongo recebeu a amostra de teste por meio de uma injeção intravenosa (IV) de 100 μ l no dia 11 após a inoculação de tumor. Nos grupos que recebem mAb², mAb² FS22m-063-AA/S70 foi injetado intravenosamente em camundongos em 20 μ g ou 200 μ g por camundongo (uma concentração final de ~1 mg/kg e ~10 mg/kg respectivamente) e no grupo que recebe anticorpo de controle G1-AA/4420 (controle de isotipo) foi injetado intravenosamente em camundongos a 200 μ g por camundongo (uma concentração final de ~10 mg/kg) em DPBS + 1 mM de arginina + 0,05 de Tween 80.

[0523] O engate de tumor e receptor de sangue periférico e a resposta farmacodinâmica como resultado de dosagem com os mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo foram avaliados. O tecido tumoral e o sangue de camundongos que portam tumor CT26 tratados com FS22m-063-AA/S70 (mAb² anti-mCD137/PD-L1) em cada uma das doses, bem como anticorpo de controle negativo G1-AA/4420, foram testados para células T positivas ligadas ao mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo, proliferação de célula T e PD-L1 livre não ligado por mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo.

A expressão total de CD137 também foi avaliada.

[0524] O sangue (100 µl) foi coletado nos capilares revestidos com EDTA por sangramento de veia caudal e foi lisado duas vezes em tampão de lise de hemácia (eBioscience n° de catálogo 00-4300-54) de acordo com as instruções do fabricante.

[0525] O tecido tumoral foi coletado por dissecação e foi desagregado para suspensão celular única por métodos mecânicos e enzimáticos padrão. Quaisquer hemácias restantes no tecido tumoral desagregado foram lisadas uma vez em tampão de lise de hemácia (eBioscience, n° de catálogo 00-4300-54) de acordo com as instruções do fabricante.

[0526] As células foram lavadas uma vez com PBS e amostras colorizadas com corante de viabilidade fixável (Invitrogen, n° de catálogo 65-0865-14) a diluição de 1:3000 em PBS, seguindo as instruções do fabricante. As células foram colorizadas por marcadores de superfície celular por citometria de fluxo com um painel de colorização de anticorpo (todos exceto os anticorpos Ki67 e FoxP3) (**Tabela 33** abaixo) na presença de bloco Fc (eBioscience n° de catálogo 14-0161-86 a 1:50) por 30 minutos em 4 °C. The células foram, então, fixadas e permeabilizadas com o kit de colorização Foxp3 eBioscience (eBioscience n° de catálogo 00-5523-00) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de permeabilização com anticorpos Ki67 e Foxp3 na presença de bloco Fc e incubadas por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas uma vez com tampão de permeabilização e ressuspensas em 200 µl de PBS + 0,5 % de BSA. As células foram, então, analisadas em um citômetro de fluxo BD

Fortessa. Os dados foram analisados com FlowJoX, Excel e GraphPad Prism.

[0527] A **Figura 24** mostra a porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas do sangue ou dos tumores que foram positivas para anticorpo anti-IgG ligado ao mAb² mCD137/PD-L1 na amostra. Como mostrado na **Figura 24**, as células T foram positivas para mAb² anti-mCD137/PD-L1 ligado logo após 2 horas depois da administração intravenosa. Houve uma correlação dependente de dose na longevidade de ligação, com mAb² anti-mCD137/PD-L1 não mais detectado após 96 h em células T isoladas do sangue e do tumor após a administração de uma dose de 1 mg/kg, enquanto mAb² anti-mCD137/PD-L1 ainda foi detectado entre 120 h e 192 h após a administração de dose de 10 mg/kg. Como esperado, a colorização de fundo mínima foi observada para o anticorpo de controle. As populações de células T isoladas do tumor que foram positivas para mAb² anti-mCD137/PD-L1 foram maiores na saída em comparação com as células T isoladas do sangue. Isso pode indicar que os níveis de expressão-alvo, CD137 ou PD-L1, foram maiores em células T isoladas do tumor, de modo que a o anti-mCD137/PD-L1 alvejasse de modo mais eficaz o tumor em comparação com as células T no sangue.

[0528] A **Figura 25** mostra a detecção de Ki67 como um marcador para a proliferação de célula T nas células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas do sangue e dos tumores. Como indicado na **Figura 25**, quando comparado ao anticorpo de controle, o mAb² anti-mCD137/PD-L1 resultou em aumentos na frequência de células T de sangue periférico positivas Ki67, indicando uma resposta farmacodinâmica (PD), isto é, que ambos os alvos são ou foram em algum momento engatados, que resulta na

ativação de células T como observado por uma resposta proliferativa, em ambos os níveis de dose testados. Visto que células T de infiltração de tumor são expostas a um ambiente inflamatório, as populações de célula T isoladas dos tumores exibiram uma frequência maior de células T proliferativas positivas Ki67. Por outro lado, a frequência de linha de base de células T positivas Ki67 foi muito menor no sangue. Ambas as células T CD4⁺ e CD8⁺ pareceram responder ao tratamento de anti-mCD137/PD-L1, indicando que CD137 em ambos os tipos de célula foi engatado por mAb² e agrupado por ligação ao PD-L1 que resulta em sinalização de CD137 e ativação de célula T que resulta em proliferação aumentada. O efeito pareceu mais forte para células T CD8⁺ que está em linha com células T CD8⁺ que expressa níveis maiores de CD137 que células T CD4⁺. Os dados sugerem que o efeito máximo é obtido a 1 mg/kg, embora a duração da resposta pareça maior a 10 mg/kg, que pode estar relacionado a uma ocupação de receptor mais prolongada e, portanto, engate de alvo mais longo no nível superior de dose. Quanto mais prolongada for a ocupação do receptor, maior será a resposta de PD. No tumor, as células T já são altamente proliferativas, e um aumento correlacionado a dose em magnitude de proliferação em ambas as células T CD4⁺ e CD8⁺ ao longo do tempo foi observado.

[0529] As amostras dos camundongos tratados com anticorpo de controle G1-AA/4420 foram aumentadas com 100 nM de mAb² anti-mCD137/PD-L1 e agiram como controle para 100 % de engate de receptor PD-L1. Isso foi mostrado pela ausência de ligação de um anticorpo anti-mPD-L1 concorrente (clone 10F.9G2, consultar **Tabela 33**). As amostras dos tumores e do sangue de

camundongos tratados com anti-mCD137/PD-L1 mostraram bloqueio de PD-L1 quase completo na dose de 10 mg/kg para a duração total do estudo, como mostrado na **Figura 26** representada por 100 % de ocupação de receptor PD-L1. Nas amostras dos camundongos tratados com 1 mg/kg de anti-mCD137/PD-L1, o engate de receptor PD-L1 diminui após aproximadamente 72 h em células T presentes no sangue e nos tumores, em que o engate de receptor PD-L1 em células T presentes no sangue diminuiu muito mais rápido em células T presentes em tumores. Esses dados indicam um bloqueio específico de tumor de PD-L1 que tem tanto a vantagem de inibir o eixo geométrico de PD-1/PD-L1 quanto de manter o mAb² anti-mCD137/PD-L1 no tumor por mais tempo que no sangue, o que é esperado que permita que o efeito total do fármaco persista no tumor, enquanto ao mesmo tempo limita os efeitos sem alvo na periferia.

[0530] De modo geral, esse estudo mostrou que aumentar a dose de CD137/PD-L1 anticamundongo resultou na ativação e proliferação de células T CD8⁺ e CD4⁺ no tumor como medido pelo número de células às quais o mAb² se ligou, em que o engate de receptor PD-L1 pelo mAb² e a expressão de Ki67 aumentada como um marcador de proliferação. As células CD8⁺ e CD4⁺ ativadas e de proliferação também foram observadas no sangue periférico, atuando como um marcador adicional de atividade induzida por CD137/PD-L1 anticamundongo. Essa ativação de célula T dependente de dose apoia a inibição de crescimento tumoral anteriormente observada no **Exemplo 14** mediante a administração de CD137/PD-L1 anticamundongo.

[0531] O papel principal de células T CD8⁺ (frequentemente também chamadas linfócitos citotóxicos) é a morte de células

infectadas ou malignas por meio 3 mecanismos principais: 1) liberação de citocinas (por exemplo, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$), 2) produção e liberação de grânulos citotóxicos e 3) expressão de ligante Fas. Espera-se que a presença de mais células T CD8^+ no tumor após o tratamento com CD137/PD-L1 anticamundongo resulte na atividade citotóxica por meio desses mecanismos contra o tumor, que resulta em controle tumoral. Enquanto as células T CD8^+ são a célula T citotóxica predominante que corresponde à morte de célula tumoral, as células T CD4^+ desempenham um papel pivô em imunidade adaptativa por reconhecimento de peptídeos apresentados por moléculas de classe II de MHC, que se tornam ativados e produzem $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$, em que ambos medeiam a proteção contra tumores (Zanetti, 2015, JI, 2015).

Tabela 33

Alvo	Clone de Anticorpo	Fluoróforo	Empresa	n° de Catálogo
CD45	30-F11	AF700	eBioscience	56-0451-82
CD3	145-2C11	BUV737	BD Biosciences	564618
CD4	RM4-5	Bv786	BD Biosciences	563727
CD8	53-6,7	BUV395	BD Biosciences	563786
FoxP3	Fjk-16S	PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5773-82
CD4+4	IM7	BV650	BioLegend	103049

Alvo	Clone de Anticorpo	Fluoróforo	Empresa	n° de Catálogo
CD62L	MEL-14	Bv421	BioLegend	104435
CD137	17B5	PE	BioLegend	106105
Ki67	16A8	PE-Cy7	BioLegend	652426
PD-L1	10F.9G2	Bv605	BioLegend	124321
IgG	MK1A6	FITC	Bio-Rad	MCA647F
Viabilidade	n/a	e780	Invitrogen	65-0865-14

n/a significa não aplicável

Exemplo 15: Farmacocinética de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em camundongo

[0532] A fim de determinar a farmacocinética de mAb² anti-CD137/PD-L1 em camundongos, camundongos fêmea C57BL/6 (consultar **Exemplo 14.4**), mas sem tumores MC38, isto é, camundongos livres de tumor, foram administradas com 100 µl de mAb² anti-CD137/PD-L1 em 4 doses (25 mg/kg, 10 mg/kg, 3 mg/kg e 1 mg/kg) e monitoradas por 384 horas.

[0533] A micro amostragem de cerca de 20 µl de sangue total foi realizada a 2, 6, 24, 48, 96 e 384 horas, e processada para isolar aproximadamente 5 µl de soro. A quantidade de mAb² anti-CD137/PD-L1 presente em cada ponto do tempo foi determinada com o uso do sistema Gyrolab xPlore por Gyros Protein Technologies. Um ensaio sanduíche foi realizado com o uso de um Gyrolab Bioaffy 1000 CD (Número de Produto P0004253) com anticorpo adsorvido anti-humano- (cadeia pesada e leve) macaco de cabra biotinilado (Cambridge Bioscience, número de produto A80-319B) como anticorpo de captura e IgG anti-humano de cabra-AlexaFluor® 647

(Cambridge Bioscience, número de produto 2040-31) como anticorpo de detecção. Uma curva padrão gerada na faixa de 8000-0,07 ng/ml foi usada para determinar a concentração de amostra, com amostras que passam por diluição em tampão de AN REXXIP, como exigido (Gyros, número de produto P0004994). Outros tampões foram usados de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de amostra média dos camundongos individuais por ponto no tempo (três camundongos por ponto no tempo) foi plotada (**Figura 27**).

[0534] A **Figura 27** mostra a farmacocinética de mAb² anti-CD137/PD-L1, que demonstra que o mAb² tem liberação terminal comparável a um IgG humano padrão em camundongos (Bergman et al, 1998).

Exemplo 16: Resposta Farmacocinética/Farmacodinâmica ao e tolerabilidade de mAb² CD137/PD-L1 anti-humano em macacos cinomolgos

[0535] Uma constatação de estudo de faixa de dose preliminar foi conduzida para avaliar a resposta farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) ao e a tolerabilidade de mAb² CD137/PD-L2 anti-humano em macacos cinomolgos. Resumidamente, o mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 foi administrado a macacos cinomolgos por meio de infusão intravenosa (IV) como uma dose única ou doses repetidas. Os parâmetros toxicológicos padrão como massa corporal, consumo de alimentos, observações clínicas, hematologia e química de sangue foram avaliadas para a avaliação de tolerabilidade ao longo da duração do estudo.

[0536] O mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 teve uma meia vida terminal de aproximadamente 6 dias e foi, de modo geral, bem tolerado em doses de até 30 mg/kg semanalmente, como

determinado pelos resultados de química clínica e de histopatologia). Os níveis de sPD-L1 sérico aumentados (uma indicação de engate de alvo direto e ativação celular) foram observados em todos os animais no dia 1, com pico alcançado em 168 horas após o fim de infusão, após o que os níveis diminuíram em linha com a diminuição nos níveis sistêmicos dos mAb² FS22-172-003-AA/E12v2.

[0537] Consistente com as constatações do estudo para avaliar a resposta de PD dos mAb² CD137/PD-L1 anticamundongo em um modelo de tumor de camundongo singênico (**Exemplo 15**), um aumento relacionado ao fármaco em proliferação e ativação de célula também foi observado em células T de Memória Central e Memória Efetora CD4⁺ e CD8⁺, que foi medido por uma expressão aumentada de Ki67. Cinéticas similares foram observadas para células NK e um aumento moderado, mas transiente na porcentagem relativa e nas contagens absolutas de células T regulatórias CD4⁺ (FoxP3⁺ CD4⁺).

[0538] Tomados em conjunto, esses resultados indicam fortemente que o mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 anti-humano tem atividade farmacológica *in vivo* potente no macaco cinomolgo e é bem tolerado em até 30 mg/kg. Adicionalmente, os dados de PK/PD gerados em linha com os dados de molécula substituta (FS22m-063-AA/S70), que fortalece a fundamentação para o uso de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 na configuração clínica.

Listagem de Sequências

Sequências de aminoácidos de CDR de mAb E12v2 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: **1**)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQLQG (SEQ ID NO: **2**)

CDR3 de VH - DLFTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **3**)

CDR1 de VL - RASQSIGNRLA (SEQ ID NO: **4**)

CDR2 de VL - EASTSET (SEQ ID NO: 5)

CDR3 de VL - QQSYSTPYT (SEQ ID NO: 6)

Sequências de aminoácidos de CDR de E12v2 (IMGT)

CDR1 de VH - GYPFTSYG (SEQ ID NO: 7)

CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: 8)

CDR3 de VH - ARDLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 9)

CDR1 de VL - QSIGNR (SEQ ID NO: 10)

CDR2 de VL - EAS (SEQ ID NO: 11)

CDR3 de VL - QQSYSTPYT (SEQ ID NO: 6)

Sequência de aminoácidos de domínio VH de mAb E12v2 (SEQ ID NO: 12)

CDRs IMGT (negrito itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado).

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYPFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISAYSGGTN**
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY**WGQGT
LTVSS*

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de mAb E12v2 (SEQ ID NO: 13)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACCCCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAG
CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
TACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
CTACATGGAAGTGAAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGG
ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
GTGACCGTGTGCGAGC

Sequência de aminoácidos de domínio VL de mAb E12v2 (SEQ ID NO: 14)

CDRs IMGT (negrito itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado).

*DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS**QSIGNR**LAWYQHKPGKAPKLLIY**EASTSETGVP***

*SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QQSYSTPYT***FGQGTKLEIK*

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de mAb E12v2
(SEQ ID NO: **15**)

GACATCCAGATGACGCAGAGCCCGTCTACCCTGTCCGCCTCCGTGAGAGATCGCGTGAT
CATCACCTGTCGGGCCAGCCAGTCCATCGGAAACCGCTTGGCGTGGTACCAGCACAAGC
CTGGGAAGGCTCCGAAGCTGCTCATCTACGAAGCCTCGACTTCGGAGACTGGTGTCCCT
AGCCGGTTCAGCGGATCGGGATCAGGGACCGATTTCACTCTGACCATTTCTCCCTGCA
ACCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCATATTCACCCCGTACACCTTCG
GACAAGGCACCAAGCTCGAAATCAAG

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de mAb G1-AA/E12v2
(com LALA) (SEQ ID NO: **16**)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs
Kabat (itálico e sublinhado); Mutação LALA (negrito e
sublinhado)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSC***KASGYPF****TSYG***ISWVRQAPGQGLEWMG***WISAYS****GGTN**
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSY****YYYY***WGQGL*
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
*APE***AA***GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT*
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de aminoácidos de cadeia leve de mAb G1-AA/E12v2
(SEQ ID NO: **17**)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs
Kabat (itálico e sublinhado)

*DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS***QSIGNRLAWYQHKPGKAPKLLIY****EASTSET***GV*
*SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC***QQSYSTPYT***FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF*
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequências de aminoácidos de CDR de mAb E05v2 (Kabat)CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: **1**)CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQKLQG (SEQ ID NO: **2**)CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **3**)CDR1 de VL - RASQSIGRLA (SEQ ID NO: **18**)CDR2 de VL - EASNLES (SEQ ID NO: **19**)CDR3 de VL - QQSYSTPRVT (SEQ ID NO: **20**)Sequências de aminoácidos de CDR de E05v2 (IMGT)CDR1 de VH - GYTFTSYG (SEQ ID NO: **21**)CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: **8**)CDR3 de VH - ARDLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **9**)CDR1 de VL - QSISGR (SEQ ID NO: **22**)CDR2 de VL - EAS (SEQ ID NO: **11**)CDR3 de VL - QQSYSTPRVT (SEQ ID NO: **20**)Sequência de aminoácidos de domínio VH de mAb E05v2 (SEQ ID NO: **23**)

CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS***GYTFTSYGIS***WVRQAPGQGLEWMGW***ISAYSGGTN***
Y***AQKLQGR***VTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC***ARDLFPTIFGVSYYYY***WGQGL
 VTVSS

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de mAb E05v2 (SEQ ID NO: **24**)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
 GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAG
 CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
 TACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
 CTACATGGAAGTCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGG
 ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
 GTGACCGTGTGCGAGC

Sequência de aminoácidos de domínio VL de mAb E05v2 (SEQ ID NO: 25)

CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSI**SGRLAWYQQKPGKAPNLLIY**EASN**LESGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPRVT**FGQGTKVEIK*

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de mAb E05v2 (SEQ ID NO: 26)

GACATTTCAGATGACCCAATCCCCGTCACGCTGAGCGCCTCCGTCGGTGATCGCGTGAC
AATCACTTGTCGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGC
CTGGAAAGGCTCCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAGTGCCT
AGCCGGTTTCAGCGGATCAGGGTCCGGTACCGAGTTCACCCTGACCATTTCCTCGCTCCA
ACCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCCTATTCAACTCCGCGCGTGACCT
TCGGCCAGGGCACTAAGGTCGAAATCAAA

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de mAb G1-AA/E05v2 (com LALA) (SEQ ID NO: 27)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado); Mutação LALA (negrito e sublinhado)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISAYS**GGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**CARDLFPTIFGVSY**YYYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

Sequência de aminoácidos de cadeia leve de mAb G1-AA/E05v2 e mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 e FS22-053-008-AA/E05v2 (SEQ ID NO: 28)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSISGRLAWYQQKPGKAPNLLIY****EASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPRVT**FGQGTKVEIKRTVAAPSVFI***
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequências de aminoácidos de CDR de mAb G12v2 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: **1**)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQKLQG (SEQ ID NO: **2**)

CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **3**)

CDR1 de VL - RASQSI**SGRLA** (SEQ ID NO: **18**)

CDR2 de VL - EASNLES (SEQ ID NO: **19**)

CDR3 de VL - QQSYSWPRT (SEQ ID NO: **29**)

Sequências de aminoácidos de CDR de G12v2 (IMGT)

CDR1 de VH - GYTFTSYG (SEQ ID NO: **21**)

CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: **8**)

CDR3 de VH - ARDLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **9**)

CDR1 de VL - QSI**SGR** (SEQ ID NO: **22**)

CDR2 de VL - EAS (SEQ ID NO: **11**)

CDR3 de VL - QQSYSWPRT (SEQ ID NO: **29**)

Sequência de aminoácidos de domínio VH de mAb G12v2 (SEQ ID NO: **23**)

CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKV**SGR**SGRLAWYQQKPGQGLEWMGW**ISAYSGGT**NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSYYYY**WGQGTLVTVSS*

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de mAb G12v2 (SEQ ID NO: **24**)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT

GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGTTGGTCCGCCAAG
 CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
 TACGCTCAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
 CTACATGGAAGTGAAGTCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGG
 ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
 GTGACCGTGTGAGC

Sequência de aminoácidos de domínio VL de mAb G12v2 (SEQ ID NO: 30)

CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS**QSI**SGRLAWYQQKPGKAPNLLIY**EAS**NLESGVP
 SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSWPRT**FGQGTKVEIK

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de mAb G12v2 (SEQ ID NO: 31)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGTCCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGAC
 CATCACTTGCCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGC
 CCGGAAAGGCCCAAACCTTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGCGTCCCT
 TCGCGGTTCTCTGGCTCCGGTTCGGAACTGAGTTCACCCTCACCATCTCGTCCCTGCA
 ACCGGAAGATTTGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGTACTCCTGGCCCCGACATTTCG
 GACAGGGAACCAAAGTCGAGATTAAG

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de mAb G1-AA/G12v2 (com LALA) (SEQ ID NO: 27)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado); Mutação LALA (negrito e sublinhado)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISAYS**GGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSY**YYYWGQGL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de aminoácidos de cadeia leve de mAb G1-AA/G12v2 e mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 e FS22-053-008-AA/G12v2 (SEQ ID NO: 33)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS***QSI******SGRLAWYQQKPGKAPNLLIY******EASNLESGVP***
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC***QQSYSWPRT***FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
SLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequências de aminoácidos de CDR de mAb lambdav3/lam-G02v3 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: **1**)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQKLQG (SEQ ID NO: **2**)

CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **3**)

CDR1 de VL - TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: **34**)

CDR2 de VL - EVTNRPS (SEQ ID NO: **35**)

CDR3 de VL - SSFKRGSTLVV (SEQ ID NO: **36**)

Sequências de aminoácidos de CDR de lambdav3/lam-G02v3 (IMGT)

CDR1 de VH - GYTFTSYG (SEQ ID NO: **21**)

CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: **8**)

CDR3 de VH - ARDLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: **9**)

CDR1 de VL - SSDVGGYNY (SEQ ID NO: **37**)

CDR2 de VL - EVT (SEQ ID NO: **38**)

CDR3 de VL - SSFKRGSTLVV (SEQ ID NO: **36**)

Sequência de aminoácidos de domínio VH de mAb lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: **23**)

CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS****GYTFTSYG****ISWVRQAPGQGLEWMGW****WISAYSGGTN***
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC***ARDLFPTIFGVSY******YYYY****WGQGT*
LVTVSS

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VH de mAb
 lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 24)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
 GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGCGGTCCGCCAAG
 CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
 TACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
 CTACATGGAAGTGAAGTCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGG
 ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
 GTGACCGTGTGCGAGC

Sequência de aminoácidos de domínio VL de mAb lambdav3/lam-
 G02v3 (SEQ ID NO: 41)

CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

*QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT****SSDVGGYNY****VSWYQQFPGKAPKLMIF****EVTNRPSG***
*VSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDAEYYC****SSFKRGSTLVV****FGGGTKLTVL*

Sequência de ácidos nucleicos de domínio VL de mAb
 lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 42)

CAGTCGGCCCTTACTCAACCCGCGTCAGTCTCCGGTAGCCCCGGACAGTCCATCACGAT
 TTCGTGCACCGGAACCAGCAGCGATGTCGGGGGATACAACTACGTGTCCTGGTACCAGC
 AGTTCCCGGGAAAGGCCCTAAGCTGATGATCTTCGAAGTCACTAACAGACCTTCCGGA
 GTGTCGGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGACAACACTGCGAGCCTGACCATCTCGGG
 CCTGCAAGCCGAGGACGAAGCCGAGTACTACTGTAGCTCATTCAAGCGCGGTTCACCC
 TCGTGGTGTTCGGCGGTGGCACTAAGCTCACCGTGCTGGGA

Sequência de aminoácidos de cadeia pesada de mAb G1-
 AA/lambdav3/lam-G02v3 (com LALA) (SEQ ID NO: 27)

Domínio VH (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado); Mutação LALA (negrito e sublinhado)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS**GYTFTSYG**ISWVRQAPGQGLEWMGW**ISAYSGGTN**
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGVSY****YYYWGQ**GTL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de aminoácidos de cadeia leve de mAb G1-AA/lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 44)

Domínio VL (itálico); CDRs IMGT (negrito e itálico); CDRs Kabat (itálico e sublinhado)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT**SSDVGGYNY**VSWYQQFPGKAPKLMIF**EVTNR**PSG
 VSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC**SSFKRGSTLVV**FGGGTKLTVLGQPAAAP
 SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY
 AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Definição alternativa de HCDR1 (IMGT) (SEQ ID NO: 45)

GYX₁FTSYG

em que X₁ é P ou T

Definição alternativa de LCDR1 (Kabat) (SEQ ID NO: 46)

RASQSIX₂X₃RLA

em que X₂ é S ou G, X₃ é N ou G

Definição alternativa de LCDR2 (Kabat) (SEQ ID NO: 47)

EASX₄X₅EX₆

Em que X₄ é T ou N; X₅ é S ou L; X₆ é T ou S

Definição alternativa de LCDR3 (Kabat) (SEQ ID NO: 48)

QQSYSX₇PX₈X₉T

Em que X_7 é T ou W; X_8 está ausente ou é R; X_9 é Y, R ou V

Definição alternativa de LCDR1 (IMGT) (SEQ ID NO: 49)

QSIX₁₀X₁₁R

Em que X_{10} é G ou S; X_{11} é N ou G

Definição alternativa de LCDR3 (IMGT) (SEQ ID NO: 50)

QQSYSX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅T

Em que X_{12} está ausente ou é T; X_{13} é T, W ou P; X_{14} é P ou R;

X_{15} é Y ou R

IgG1 de sequência de aminoácidos de HFW (Kabat)

HFW1 - EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYX₁₆FT (SEQ ID NO: 51)

Em que X_{16} é P ou T

HFW2 - WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 52)

HFW3 - RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 53)

HFW4 - WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

Sequência de aminoácidos de HFW de IgG1 (IMGT)

HFW1 - EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 55)

HFW2 - ISWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO: 56)

HFW3 - NYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 57)

HFW4 - WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

Sequências de aminoácido de LFW de cadeia leve kappa (Kabat)

LFW1 - DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITC (SEQ ID NO: 58)

LFW2 - WYQHKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 59)

LFW3 - GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 60)

LFW4 - FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 61)

Sequências de aminoácido de LFW de cadeia leve kappa (IMGT)

LFW1 - DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS (SEQ ID NO: 62)

LFW2 - LAWYQHKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 63)

LFW3 - TSETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 64)

LFW4 - FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 61)

Sequências de aminoácido de LFW de cadeia leve lambda (Kabat)LFW1 - QSALTQPASVSGSPGQSITISC (SEQ ID NO: **65**)LFW2 - WYQQFPGKAPKLMIF (SEQ ID NO: **66**)LFW3 - GVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC (SEQ ID NO: **67**)LFW4 - FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: **68**)Sequências de aminoácido de LFW de cadeia leve lambda (IMGT)LFW1 - QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT (SEQ ID NO: **69**)LFW2 - VSWYQQFPGKAPKLMIF (SEQ ID NO: **70**)LFW3 - NRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC (SEQ ID NO: **71**)LFW4 - FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: **68**)Sequências de aminoácidos de alças estruturais de domínio CH3 de WT

Laço de AB de WT - RDELTKNQ (SEQ ID NO: 72)

Laço de CD de WT - SNGQPENNY (SEQ ID NO: 73)

Laço de EF de WT - DKSRWQQGNV (SEQ ID NO: 74)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de WT (SEQ ID NO: 75)

Laços de AB, CD e EF sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVLDKSRWQQGNVFSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKSLSLSPGSequência de aminoácidos do domínio CH2 (SEQ ID NO: 76)APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKSequência de aminoácidos do domínio CH2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 77)

Mutação LALA sublinhado

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKSequência de aminoácidos do domínio CH2 com mutação LALA e mutação P114A (SEQ ID NO: 176)

Mutação LALA sublinhado; Mutação P114A em negrito e sublinhado

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK

Sequência de aminoácidos de motivo de PPY (SEQ ID NO: 78)

PPY

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de FS22-053-008

Primeira sequência de FS22-053-008 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-008 - DYWRWLE (SEQ ID NO: 80)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de FS22-053-008 (SEQ ID NO: 81)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de FS22-053-008 (SEQ ID NO: 82)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTA
CTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACA
ACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCGCCCGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de FS22-053-009

Primeira sequência de FS22-053-009 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-009 - EHTRWLD (SEQ ID NO: 83)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de FS22-053-009 (SEQ ID NO: 84)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVEHTRWLDDGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de FS22-053-009
 (SEQ ID NO: 85)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
 GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACA
 TACTAGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
de domínio CH3 de Fcab FS22-053-011

Primeira sequência de FS22-053-011 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-011 - DYWRWTD (SEQ ID NO: 86)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-011
 (SEQ ID NO: 87)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWTDDGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-011
 (SEQ ID NO: 88)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
 GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAATTA
 CTGGAGGTGGACTGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
de domínio CH3 de Fcab FS22-053-017

Primeira sequência de FS22-053-017 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-017 - YHWRWLE (SEQ ID NO: 89)
Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-017
 (SEQ ID NO: 90)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSGDSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-017 (SEQ ID NO: 91)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCACGCGACGAACTCAATCC
 GCCCTACCTGTTCTCCAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTTGTGAAGGGTTTCTACCCAT
 CCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGACAGCCGGAGAACAACCTATAAGACTACC
 CCGCCTGTGCTGGACTCGGACGGCAGCTTCTTCTTGTACTCCAACTGACCGTGTACCA
 CTGGCGGTGGCTGGAAGGGAACGTGTTTAGCTGCTCCGTCATGCATGAAGCCCTGCACA
 ACCACTACACCCAGAAGTCCCTCTCGCTCTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-053-014

Primeira sequência de FS22-053-014 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-014 - YHWRWLD (SEQ ID NO: 92)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-014
 (SEQ ID NO: 93)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSGDSFFLYSKLTVYHWRWLDGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-014 (SEQ ID NO: 94)

GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
 GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTACCA
 TTGGAGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACA

ACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCCGGA

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-053-010

Primeira sequência de FS22-053-010 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-010 - DYMRWLD (SEQ ID NO: 95)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-010 (SEQ ID NO: 96)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDS DGSFFLYSKLTVDYMRWLDGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-010 (SEQ ID NO: 97)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTA
CATGAGGTGGCTGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-053-012

Primeira sequência de FS22-053-012 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-012 - DHMRWLE (SEQ ID NO: 98)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-012 (SEQ ID NO: 99)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDS DGSFFLYSKLTVDHMRWLEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-012 (SEQ ID NO: 100)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC

GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGATCA
 TATGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
 de domínio CH3 de Fcab FS22-053-013

Primeira sequência de FS22-053-013 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-013 - GYERWLE (SEQ ID NO: 101)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-013
 (SEQ ID NO: 102)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSGDSFFLYSKLTVGYERWLEGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-
 053-013 (SEQ ID NO: 103)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
 GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGTTA
 CGAAAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
 de domínio CH3 de Fcab FS22-053-015

Primeira sequência de FS22-053-015 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-015 - DHWRWLQ (SEQ ID NO: 104)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-015
 (SEQ ID NO: 105)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT

PPVLDS DGSFFLYSKLTVDHWRLQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-015 (SEQ ID NO: 106)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATCA
TTGGAGGTGGCTGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-053-016

Primeira sequência de FS22-053-016 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-016 - DYIRWLN (SEQ ID NO: 107)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-016 (SEQ ID NO: 108)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDS DGSFFLYSKLTVDYIRWLNGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053-016 (SEQ ID NO: 109)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTA
CATCAGGTGGCTGAACGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de FS22-053

Primeira sequência de FS22-053-008 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda sequência de FS22-053-008 - YYNRWQD (SEQ ID NO: 110)

Sequências de aminoácidos de FS22-053 domínio CH3 (SEQ ID NO: 111)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVYYNRWQDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-053 (SEQ ID NO: 112)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCC
GCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTATTA
TAACAGGTGGCAGGATGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-172-003

Primeira sequência de FS22-172-003 - PYIIPPY (SEQ ID NO: 113)

Segunda sequência de FS22-172-003 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-003 (SEQ ID NO: 115)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-003 (SEQ ID NO: 116)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATA
CATCATCCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGC
AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACA

ACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCGCCCCGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-172-002

Primeira sequência de FS22-172-002 - PFQMPPY (SEQ ID NO: 117)

Segunda sequência de FS22-172-002 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-002 (SEQ ID NO: 118)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELPFQMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-002 (SEQ ID NO: 119)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATT
CCAGATGCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGC
AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-172-004

Primeira sequência de FS22-172-004 - NYIYPPY (SEQ ID NO: 120)

Segunda sequência de FS22-172-004 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-004 (SEQ ID NO: 121)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-

172-004 (SEQ ID NO: 122)

GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACTA
 CATCTACCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGC
 AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACA
 ACCACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCGCCCGGA

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
 de domínio CH3 de Fcab FS22-172-001

Primeira sequência de FS22-172-001 - PFVMPPY (SEQ ID NO: 123)

Segunda sequência de FS22-172-001 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-001
 (SEQ ID NO: 124)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELPFVMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-
 172-001 (SEQ ID NO: 125)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATT
 CGTTATGCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGC
 AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
 de domínio CH3 de Fcab FS22-172-005

Primeira sequência de FS22-172-005 - QQVYPPY (SEQ ID NO: 126)

Segunda sequência de FS22-172-005 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-005
(SEQ ID NO: 127)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-005
(SEQ ID NO: 128)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCAGCA
 GGTTTACCCACCATAACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGC
 AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
 ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais
de domínio CH3 de Fcab FS22-172-006

Primeira sequência de FS22-172-006 - RKYYPPY (SEQ ID NO: 129)

Segunda sequência de FS22-172-006 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-006
(SEQ ID NO: 130)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELRKYYPPYNQLSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-172-006
(SEQ ID NO: 131)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAA
 ATACTACCCGCCGTACAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGC
 AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA

ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequências de aminoácidos de sequências de alças estruturais de domínio CH3 de Fcab FS22-172

Primeira sequência de FS22-172 - RKYYPPY (SEQ ID NO: 129)

Segunda sequência de FS22-172 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Sequência de aminoácidos de domínio CH3 de Fcab FS22-172 (SEQ ID NO: 132)

Primeira e segunda sequências sublinhado

GQPREPQVYTLPPSRDELRKYYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos de domínio CH3 de Fcab FS22-172 (SEQ ID NO: 133)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAA
ATACTACCCGCCGTACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCGCGC
AGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 134)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKV***SCKASGYPF***TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN*
*YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEL***RLRSDDTAVYYCARDLFPTIF***GVSYYYWGQGL*
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
*AVLQSSGLYSLSSVTVPS***SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK***SCDKTHTCPPCP*
*APE***AA***GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT*
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
*YTLPPSRDELPYII***PPY***NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT***PPVLDSG**
*SFFLYSKLTVGADRWLE***GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de mAb² FS22-

172-003-AA/E12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 135)

GAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAGACCTGGCGCCTCTGTGAAGGT
GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACCCCTTTACCTCCTACGGCATCTCCTGGGTCCGACAGG
CTCCTGGACAAGGCTTGAATGGATGGGCTGGATCTCCGCTTATTCCGGCGGCACCAAT
TACGCCCAGAACTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCTCCACCGC
CTACATGGAAGTGCGGTCCCTGAGATCTGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAG
ATCTGTTCCCCACCATCTTCGGCGTGTCTACTACTACTATTGGGGCCAGGGCACCCTG
GTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAG
CAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCTCTG
AGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTCCA
GCTGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTCGTGACCGTGCCTTCCAG
CTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGG
TGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCT
GCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC
CCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG
ACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGC
CTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTT
TACACCTTGCCCTCCATCTCGGGACGAGCTGCCCTACATCATCCCTCCATACAACCAGGT
GTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA
GCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGC
TCATTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGGCGCCGACAGATGGCTGGAAGGGAACGT
GTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGT
CTCTGTCCCCTGGC

Sequência de aminoácidos da cadeia leve de mAb² FS22-172-
003-AA/E12v2 e FS22-053-008-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 17)

DIQMTQSPSTLSASVRDRVIIITCRASQSIGNRLAWYQHKPGKAPKLLIYEASTSETGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS

TLTLSKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 136)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACACTGTCCGCCTCTGTGCGGGACAGAGTGAT
CATCACCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAACAGACTGGCCTGGTATCAGCACAAGC
CTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGAGGCCTCCACATCTGAGACAGGCGTGCCC
TCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCA
GCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTACAGCACCCCTTACACCTTTG
GCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCACGCGTGTTTCATCTTC
CCCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAA
CTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA
ACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGAC
CCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 137)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
*APE***AA***GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT*
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELPIYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 138)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGCGGTCCGCCAAG
CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC

TACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
CTACATGGAAGTCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGG
ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
GTGACCGTGTGCGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGTCGGTGTTCCTCGCTGGCCCCATCGTC
CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCG
AGCCCGTACAGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCCG
GCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGG
TCGACAAGAAGTCTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCCCA
GCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCCAAGCCGAAGGATAC
CCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG
ACCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCT
GCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGC
CTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATCATCCACCATAACAACAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGT
CCCTGTCGCCCGGT

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve de mAb² FS22-
172-003-AA/E05v2 (SEQ ID NO: 139)

GACATTCAGATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGAGCGCCTCCGTCCGTGATCGCGTGAC
AATCACTTGTCGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGC
CTGGAAAGGCTCCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAGTGCCT
AGCCGGTTCAGCGGATCAGGGTCCGGTACCGAGTTCACCCTGACCATTTCCTCGCTCCA
ACCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCCTATTCAACTCCGCGCGTGACCT
TCGGCCAGGGCACTAAGGTGCAAATCAAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCGGTGTTTATC
TTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTCAGGCACTGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAA

CAATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCG
GAAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACTTATTCCTGTCC
TCCACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGT
GACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

Sequência de aminoácidos (AA) da cadeia pesada de mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 140)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYWQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELPIYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 141)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGCGGTCCGCCAAG
CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
TACGCTCAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
CTACATGGAAGTGAAGTCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGG
ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
GTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGTCGGTGTTCCTGCTGGCCCCATCGTC
CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCG
AGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCCG
GCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGG
TCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCCA
GCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGATAC

CCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG
 ACCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCT
 GCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGC
 CTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTG
 TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATCATCCACCATAACAACAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGT
 CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGT
 CCCTGTCGCCCCGT

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve de mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 (SEQ ID NO: 142)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGTCCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGAC
 CATCACTTGCCGCGCCTCACAAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGC
 CCGGAAAGGCCCCAAACCTTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGCGTCCCT
 TCGCGGTTCTCTGGCTCCGGTTCGGAACTGAGTTCACCCTCACCATCTCGTCCCTGCA
 ACCGGAAGATTTGCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGTACTCCTGGCCCCGGACATTG
 GACAGGGAACCAAAGTCGAGATTAAGCGGACTGTGGCGGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTT
 CCCCCGTCCGACGAACAGCTGAAGTCCGGTACCGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAA
 TTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAA
 ACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCAATTATTCCTGTCCTCC
 ACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGAC
 CCATCAAGGGCTTTCGTGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

Sequência de AA da cadeia pesada de mAb² FS22-053-008-AA/E12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 143)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
*EVQLVQSGAEVKRPGASVKV****SCKASGY******PFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYS******GGTN***
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSY***YYYWGQGL***
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APE~~AA~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELNPYYLFNQNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de mAb² FS22-
053-008-AA/E12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 144)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACCCCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGCGGTCCGCCAAG
CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
TACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
CTACATGGAAGTGAAGTCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGG
ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
GTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGTCGGTGTTCCTCGCTGGCCCCATCGTC
CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCG
AGCCCGTCAAGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCCG
GCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGG
TCGACAAGAAGTTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCCCA
GCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCCAAGCCGAAGGATAC
CCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG
ACCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCACGGGAAGAAGACAGTACAACCTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCT
GCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGC
CTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTG
TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGT
CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT
CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGT

CCCTGTCGCCCCGGT

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve de mAb² FS22-053-008-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 145)

GACATCCAGATGACGCAGAGCCCGTCTACCCTGTCCGCCTCCGTGAGAGATCGCGTGAT
CATCACCTGTCGGGCCAGCCAGTCCATCGGAAACCGCTTGGCGTGGTACCAGCACAAGC
CTGGGAAGGCTCCGAAGCTGCTCATCTACGAAGCCTCGACTTCGGAGACTGGTGTCCCT
AGCCGGTTCAGCGGATCGGGATCAGGGACCGATTTCACTCTGACCATTTCTCCCTGCA
ACCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCATATTCACCCCGTACACCTTCG
GACAAGGCACCAAGCTCGAAATCAAGCGGACTGTGCGCCGCACCTTCCGTGTTTCAATTTT
CCACCCTCCGACGAACAGCTGAAATCGGGTACAGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAA
TTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAA
ACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACTTATTCCTGTCCTCC
ACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGAC
CCATCAAGGGCTTTTCGTGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-053-008-AA/E05v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 146)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
*APE***AA***GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT*
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELNPPLYFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de mAb² FS22-053-008-AA/E05v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 147)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGCGGTCCGCCAAG
CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC

TACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
 CTACATGGAAGTCTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGG
 ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
 GTGACCGTGTCTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGTCGGTGTTCCTCGCTGGCCCCATCGTC
 CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCG
 AGCCCGTACACAGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCCG
 GCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
 CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGG
 TCGACAAGAAGTCTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCCCA
 GCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCCAAGCCGAAGGATAC
 CCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG
 ACCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCT
 GCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGC
 CTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTG
 TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT
 CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGT
 CCCTGTCGCCCGGT

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve de mAb² FS22-
 053-008-AA/E05v2 (SEQ ID NO: 148)

GACATTCAGATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGAGCGCCTCCGTCCGTGATCGCGTGAC
 AATCACTTGTCGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGC
 CTGGAAAGGCTCCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAGTGCCT
 AGCCGGTTCAGCGGATCAGGGTCCGGTACCGAGTTCACCCTGACCATTTCTCGCTCCA
 ACCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCCTATTCAACTCCGCGCGTGACCT
 TCGGCCAGGGCACTAAGGTGCAAATCAAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCGGTGTTTATC
 TTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTCAGGCACTGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAA

CAATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCG
GAAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACTTATTCCTGTCC
TCCACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGT
GACCCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-053-008-AA/G12v2
com mutação LALA (SEQ ID NO: 149)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGLT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia pesada de mAb² FS22-
053-008-AA/G12v2 com mutação LALA (SEQ ID NO: 150)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGT
GTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGCGGTCCGCCAAG
CACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAAC
TACGCTCAAAGCTGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGC
CTACATGGAAGTGAATCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGG
ACCTGTTCCCCACTATCTTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTC
GTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGTCGGTGTTCCTGCTGGCCCCATCGTC
CAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCG
AGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCCG
GCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTTCGTC
CTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAGG
TCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCTTGCCCA
GCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCCTTCGGTGTTCCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGATAC

CCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG
 ACCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC
 AAGCCACGGGAAGAACAGTACAACCTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCT
 GCACCAAGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGC
 CTGCCCCAATTGAGAAAACCTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTG
 TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGT
 CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGC
 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGT
 CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTGT
 CCCTGTCGCCCCGT

Sequência de ácidos nucleicos da cadeia leve de mAb² FS22-
 053-008-AA/G12v2 (SEQ ID NO: 151)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGTCCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGAC
 CATCACTTGCCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGC
 CCGGAAAGGCCCCAAACCTTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGCGTCCCT
 TCGCGGTTCTCTGGCTCCGGTTCGGAACTGAGTTCACCCTCACCATCTCGTCCCTGCA
 ACCGGAAGATTTGCGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGTACTCCTGGCCCCGGACATTG
 GACAGGGAACCAAAGTCGAGATTAAGCGGACTGTGGCGGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTT
 CCCCCGTCCGACGAACAGCTGAAGTCCGGTACCGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAA
 TTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAA
 ACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACTTATTCCCTGTCCTCC
 ACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGAC
 CCATCAAGGGCTTTCGTCGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAATGC

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-017AA/E12v2 com
 mutação LALA (SEQ ID NO: 152)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
*EVQLVQSGAEVKRPGASVKV****SCKASGY******PFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYS******GGTN***
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD***TAVYYCARDLFPTIFGVSY******YYYWGQGL***
TVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APE~~**AA**~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-053-017AA/E05v2 com
 mutação LALA (SEQ ID NO: 153)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
 YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGT
 L*
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APE~~**AA**~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-053-017AA/G12v2 com
 mutação LALA (SEQ ID NO: 154)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
 YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGT
 L*
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APE~~**AA**~~GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-172-003AA/lam-G02v3
 com mutação LALA (SEQ ID NO: 155)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
 YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYWQGGL
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELPIIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-172-003AA/S70 com
 mutação LALA (SEQ ID NO: 156)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSA
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELPIIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia leve de S70 (SEQ ID NO: 157)

Domínio VL (itálico);
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22-172-003AA/HelD1.3
 com mutação LALA (SEQ ID NO: 158)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
 QVQLQESGPGLVRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDY
 NSALKSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGLVTVSSAS

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia leve de HelD1.3 (SEQ ID NO: 159)

Domínio VL (itálico)

*DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVP
 SRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGSYQCQHFWSPTPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22m-063AA/S70 com
 mutação LALA (SEQ ID NO: 160)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDEPYWSYVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 MNYRWELGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

Sequência de AA da cadeia pesada de FS22m-063AA/HelD1.3 com
 mutação LALA (SEQ ID NO: 161)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

*QVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGGRGLEWIGMIWGDGNTDY
 NSALKSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGLVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GG*

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DEPYWSYVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVMN
 YRWELGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia pesada de G1-AA/E12v2 com mutação
 LALA (SEQ ID NO: 162)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPF^TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFP^TIFGVSY^YYWGQGLT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Sequência de AA da cadeia pesada de G1/S70 (SEQ ID NO: 163)

Domínio VH (itálico)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTY
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSA
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sequência de AA da cadeia pesada de G1-AA/S70 com mutação
 LALA (SEQ ID NO: 164)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTY
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSA

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sequência de AA da cadeia pesada de G1/4420 (SEQ ID NO: 165)

Domínio VH (itálico)

*EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYE
 TYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSS*
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sequência de AA da cadeia leve de 4420 (SEQ ID NO: 166)

Domínio VL (itálico)

*DVVMQTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNR
 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTGLEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

Sequência de AA da cadeia pesada de G1-AA/4420 com mutação
 LALA (SEQ ID NO: 167)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

*EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYE
 TYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSS*
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sequência de AA da cadeia pesada de G1-AA/HelD1.3 com mutação LALA (SEQ ID NO: 168)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

*QVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDY
NSALKSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Sequência de AA da cadeia pesada de G1-AA/MLS109 com mutação LALA (SEQ ID NO: 169)

Domínio VH (itálico); Mutação LALA (sublinhado em negrito)

*EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSPYSVFWVRQAPGKGLEWVSSINSdstyky
YADSVKGRFTISRDN AENSIFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRSYYAFSSGSLSDYYYGLD
VWGQGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Sequência de aminoácidos da cadeia leve de MLS109 (SEQ ID NO: 170)

Domínio VL (itálico)

*DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHTNGYNLYLDWYVQKPGQSPQLLIYLASNR
ASGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEDVGVYYCMQALQIPRTFGQGTKVEIKRTVAAP*

SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequências de aminoácidos de laços de AB e EF de domínio CH3
de FS22-172-003

Laço de AB - RDELPYIIPPYNQ (SEQ ID NO: 171)

Laço de EF - GADRWLEGNV (SEQ ID NO: 172)

Sequências de aminoácidos de laços de AB e EF de domínio CH3
de FS22-53-008

Laço de AB - RDELNPPYLFSNQ (SEQ ID NO: 173)

Laço de EF - DYWRWLEGNV (SEQ ID NO: 174)

Sequências de aminoácidos de laços de AB e EF de domínio CH3
de FS22-053-017

Laço de AB - RDELNPPYLFSNQ (SEQ ID NO: 173)

Laço de EF - YHWRWLEGNV (SEQ ID NO: 175)

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de G1/280 02 G02
(SEQ ID NO: 177)

Domínio VH (itálico)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTN
YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGLT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

Sequência de aminoácidos da cadeia leve de G1/280 02 G02
(SEQ ID NO: 178)

Domínio VL (itálico)

*QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQFPGKAPKLMIFEVTNRPSG
VSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCSSFKRGSTLVVFGGGTKLTVLGQPAAAP*

SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Sequência de aminoácidos de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 179)

Domínio extracelular (itálico); Domínios transmembrana e intracelular (negrito)

*FTVTVPKDLYVVEYGSNM***TIECKFPVEKQ***LDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHG***EEDLKVQ**
*HSSYRQ***RARLLKDQ***LSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY***NK**
*INQRILVVD***PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNV****TS**
*TLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNER***THLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET**

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 180)

*FTVTVPKDLYVVEYGSNM***TIECKFPVEKQ***LDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHG***EEDLKVQ**
*HSSYRQ***RARLLKDQ***LSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY***NK**
*INQRILVVD***PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNV****TS**
TLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNER

Sequência de aminoácidos de PD-L1 de camundongo (SEQ ID NO: 181)

Domínio extracelular (itálico); Domínios transmembrana e intracelular (negrito)

FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQ
*HSNFRGRASLPKDQL***LKGNAALQITDVKLQDAGVYCCII***SYGGADYKRITLKV***NAPYRK**
INQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSS
*LRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTH***WVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET**

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular de PD-L1 de camundongo (SEQ ID NO: 182)

FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQ
*HSNFRGRASLPKDQL***LKGNAALQITDVKLQDAGVYCCII***SYGGADYKRITLKV***NAPYRK**
INQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSS

LRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTH

Sequência de aminoácidos de PD-L1 de cinomolgo (SEQ ID NO: 183)

Domínio extracelular (itálico); Domínios transmembrana e intracelular (negrito)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQ
HSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNK
INQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTS
*TLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTH***LVILGAIFLLLGVA**
LTFI FYLRKGRMMDMKKCGIRVTNSKKQORDTQLEETKGPSARFDIPDEIPVIESKPNTL
SIVLGTTLTVAMIIVATIFGYRRQKGRRLTLKL

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular de PD-L1 de cinomolgo (SEQ ID NO: 184)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQ
HSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNK
INQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTS
TLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTH

Sequência de aminoácidos de CD137 humano (SEQ ID NO: 185)

Domínio extracelular (itálico); Domínios transmembrana e intracelular (negrito)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTS
NAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSL
*DGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ***IISFFLALTSTALL**
FLFFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular CD137 humano (SEQ ID NO: 186)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTS
NAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSL
DGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ

Sequência de aminoácidos CD137 de camundongo (SEQ ID NO:

187)

Domínio extracelular (itálico); Domínios transmembrana e intracelular (negrito)

VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCAGYFRFKKFCSSSTHN
AECECIEGFHCLGPPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTTFNDQNGTGVCRPWTNCSL
DGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLSLQVL**TLFLALTSALLLA**
LIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQPFKKTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular CD137 de camundongo (SEQ ID NO: 188)

VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRVCAGYFRFKKFCSSSTHN
AECECIEGFHCLGPPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTTFNDQNGTGVCRPWTNCSL
DGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLSLQVL

Sequência de aminoácidos de CD137 de cinomolgo (SEQ ID NO: 189)

Domínio extracelular (itálico); Domínios transmembrana e intracelular (negrito)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTS
NAECDICISGYHCLGAECMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSL
DGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ**IIFFLALTSTVVLF**
LLFFLVLRFSVVKRSRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular de CD137 de cinomolgo (SEQ ID NO: 190)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTS
NAECDICISGYHCLGAECMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSL
DGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada de G1/HelD1.3 (SEQ ID NO: 191)

Domínio VH (itálico)

QVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWWVRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDY
NSALKSRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGLVTVSSAS

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Peptídeo OVA (SEQ ID NO: 192)

ISQAVHAAHAEINEAGR

Sequência de aminoácidos de domínio extracelular de B7-H3 humano (SEQ ID NO: 193)

ILEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQG
 SAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKP
 SMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV
 HSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTD
 ATLRCFSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGN
 ASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTIT
 TCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLV
 RNPVLQQDAHGSVTITGQPM

Peptídeo SIINFEKL (SEQ ID NO: 194)

SIINFEKL

Sequência de aminoácidos de PD-L1-rCD4-His humano (SEQ ID NO: 195)

Peptídeo de sinal (sublinhado); Domínio extracelular de PD-L1 (fonte regular); CD4+ de rato C-terminal (domínios 3 e 4) (itálico); Junção entre antígeno e fusão C-terminal que codifica um sítio de restrição de NotI (negrito e sublinhado); Etiqueta de hexa-histidina C-terminal (negrito)

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
 EDKNIIQFVHGEE~~DLKVQHSSYRQ~~~~RARLLKDQ~~LSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY
 GGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD~~PVTSEHELTCQ~~AE~~GYPKAE~~VIWTSSDHQVLSG

KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPN
 ERT**AAA**TSITAYKSEGESAEFSFPLNLGEESLQGELRWKA EKAPSSQSWITFSLKNQKV
 SVQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGSGNLTLTLDRGILYQEVNLVVMKVTQP
 DSNTLTCEVMGPTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEEVKM
 DSKIQVLSKGLN**SGSHHHHHH**

Sequência de aminoácidos de PD-L1-Fc-His Humano (SEQ ID NO: 196)

Peptídeo de sinal (sublinhado) Domínio extracelular de PD-L1 (fonte regular) Fc de IgG1 Humano (itálico) Junção entre antígeno e fusão C-terminal que codifica um sítio de restrição de NotI (negrito e sublinhado) Etiqueta de hexa-histidina C-terminal (negrito)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
 EDKNIIQFVHGEE DLKVQHSSYRQ RARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY
 GGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCQAE GYPKAEVIWTSSDHQVLSG
 KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPN
 ERT**AAA**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK**SGSH**
HHHHH

Sequência de aminoácidos de PD-L1-rCD4-His de Camundongo (SEQ ID NO: 197)

Peptídeo de sinal (sublinhado); Domínio extracelular de PD-L1 (fonte regular); CD4+ de rato C-terminal (domínios 3 e 4) (itálico); Junção entre antígeno e fusão C-terminal que codifica um sítio de restrição de NotI (negrito e sublinhado); Etiqueta de hexa-histidina C-terminal (negrito)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEK
 EDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISY

GGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGK
 RSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQN
 RT**AAA**TSITAYKSEGESA~~EF~~SPFLNLGEE~~SL~~QGE~~LR~~WKA~~EK~~APSSQSWITFSLKNQKVS
 VQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGSGNLTLTLDRGILYQEVNLVVMKVTQPD
 SNTLTCEVMGPTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEEVKMD
 SKIQVLSKGL**NGSHHHHHH**

Sequência de aminoácidos de PD-L1-Fc-His de Camundongo (SEQ ID NO: 198)

Peptídeo de sinal (sublinhado) Domínio extracelular de PD-L1 (fonte regular) Fc de IgG1 Humano (itálico) Junção entre antígeno e fusão C-terminal que codifica um sítio de restrição de NotI (negrito e sublinhado) Etiqueta de hexa-histidina C-terminal (negrito)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEK
 EDEQVIQFVAGEEDLKPQH~~SNFRGRASLPKDQL~~LLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIIISY
 GGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGK
 RSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQN
 RT**AAA**DKTH~~TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK~~
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**SHH**
HHHH

Sequência de aminoácidos de PD-L1-His-Avi Humano (SEQ ID NO: 199)

Domínio extracelular de PD-L1 (fonte regular) Etiqueta de hexa-histidina C-terminal (itálico) Etiqueta de Avi (negrito)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEE~~DLKVQ~~
 HSSYRQ~~RARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY~~NK
 INQRILVVD~~PVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNV~~TS

TLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERGSHHHHHHGG**GLNDIF**
EAQKIEWHE

Sequências de aminoácidos otimizados por códon que codificam a cadeia pesada de FS22-172-003-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 32)

AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTTCTTCTGTCCTGTCCGTGACCAC
 CGGCGTGCACTCTGAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAGACCTGGCG
 CCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACCCCTTTACCTCCTACGGCATCTCC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCTGGATCTCCGCTTATTC
 CGGCGGCACCAATTACGCCCAGAACTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCACCGACACCT
 CTACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGCAGGTCCTGAGATCTGACGACACCGCCGTGTAC
 TACTGCGCCAGAGATCTGTTCCCCACCATCTTCGGCGTGTCCTACTACTACTATTGGGG
 CCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTC
 TGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG
 GACTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGT
 GCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCTGTGCTGA
 CCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCT
 TCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTG
 TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAA
 AGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT
 GTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA
 CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCG
 TGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC
 AACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAG
 GGAACCCCAAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGCCCTACATCATCCCTC
 CATAACAACAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCC
 GTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCT
 GGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGGCGCCGACAGATGGC
 TGGAAGGGAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACA
 CAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG TGATGAATTC

Sequências de aminoácidos otimizados por códon que codificam

a cadeia leve de FS22-172-003-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 39)

AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACACAGGTTCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCT
 GACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACACTGTCCGCCTCTG
 TGC GGGACAGAGTGATCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAACAGACTGGCC
 TGGTATCAGCACAAGCCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGAGGCCTCCACATC
 TGAGACAGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGA
 CAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTACAGC
 ACCCCTTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCC
 CAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG
 TGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC
 GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC
 CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGT
 ACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGG
 GGCGAGTGCTGATGAATTC

Referências

[0539] Todos os documentos mencionados neste relatório descritivo estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0540] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215(3), 403-10 (1990).

[0541] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25(17), 3389-402 (1997).

[0542] Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniow P, Rogers GT, Burke PJ, Melton R. Antibody-enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites. Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4, 915-922 (1991).

- [0543]** Baird JR *et al.* Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *J Immunol.* 190(1): 469-478 (2013).
- [0544]** Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol.* Jun 8;5, 117 (2015).
- [0545]** Bartkowiak T *et al.* Activation of 4-1BB on Liver Myeloid Cells Triggers Hepatitis via an Interleukin-27-Dependent Pathway. *Clin Cancer Res.* 24(5), 1138-51 (2018).
- [0546]** Bergman I, Burckart GJ, Pohl CR, Venkataramanan R, Barmada MA, Griffin JA And Cheung NV. Pharmacokinetics of IgG and IgM Anti-Ganglioside Antibodies in Rats and Monkeys After Intrathecal Administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284(1), 111-115 (1998)
- [0547]** Bitra A, Doukov T, Wang J, Picarda G, Benedict CA, Croft M, Zajonc DM. Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling. *J Biol Chem.* 293(4):1317-1329 (2017).
- [0548]** Brown MH, Barclay AN. Expression of immunoglobulin and scavenger receptor superfamily domains as chimeric proteins with domains 3 and 4 of CD4⁺ for ligand analysis. *Protein Eng.* 7(4), 515-21 (1994).
- [0549]** Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 113(16):3716-25 (2009).
- [0550]** Chacon JA1, Wu RC, Sukhumalchandra P, Molldrem JJ, Sarnaik A, Pilon-Thomas S, Weber J, Hwu P, Radvanyi L. Co-

stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. PLoS One. 8(4):e60031 (2013).

[0551] Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. BMC Biotechnol. 6:49 (2006).

[0552] Chester C, Ambulkar S, Kohrt HE. 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 65(10):1243-8 (2016).

[0553] Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. Blood. 131(1):49-57 (2018).

[0554] Claus C *et al.* A novel tumor-targeted 4-1BB agonist and its combination with T-cell bispecific antibodies: an off-the-shelf cancer immunotherapy alternative to CAR T-cells [abstract]. Em: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. Cancer Res. 77 (2017).

[0555] Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? Nat Rev Immunol. 3(8):609-20 (2003).

[0556] Curran MA, Geiger TL, Montalvo W, Kim M, Reiner SL, Al-Shamkhani A, Sun JC, Allison J. P. Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. J. Exp.Med. 210(4): 743-755 (2013).

[0557] Dubrot J *et al.* Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without

selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol Immunother.* 59(8):1223-1233 (2010).

[0558] Dyson MR, Zheng Y, Zhang C, Colwill K, Pershad K, Kay BK, Pawson T, McCafferty J: Mapping protein interactions by combining antibody affinity maturation and mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 417(1), 25-35 (2011).

[0559] Fisher TS et al. Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother.* 61(10):1721-33 (2012).

[0560] Grosso J, Inzunza D, Wu Q, Simon J, Singh P, Zhang X, Phillips T, Simmons P, Cogswell J. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 1(Suppl 1):P53. (2013).

[0561] Hasenhindl C, Traxlmayr MW, Wozniak-Knopp G, Jones PC, Stadlmayr G, Rüker F, Obinger C. Stability assessment on a library scale: a rapid method for the evaluation of the commutability and insertion of residues in C-terminal loops of the CH3 domains of IgG1-Fc. *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10), 675-82 (2013).

[0562] Hezareh M, Hessel AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW. Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 75(24):12161-8. (2001).

[0563] Hinner MJ, Aiba, RSB., Wiedenmann A, Schlosser C, Allersdorfer A, Matschiner G, Rothe C, Moebius U, Kohrt HE, Olwill SA. Costimulatory T cell engagement via a novel bispecific anti-CD137 /anti-HER2 protein. *J. Immunotherapy Cancer* 3 (Suppl 2): P187. (2015).

- [0564]** Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 23(9):1126-36 (2005).
- [0565]** Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 56(13):3055-61 (1996).
- [0566]** Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol.* 158(6):2600-9 (1997).
- [0567]** Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG. Mapping of the Clq binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 164(8), 4178-84 (2000).
- [0568]** Jain T *et al.* Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape. *PNAS* 114 (5), 944-949 (2017).
- [0569]** Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G, Ling NR, Lowe J, Walker MR, Phillips DJ, Aloisio CH, Wells TW. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* 1, 223-52 (1985).
- [0570]** Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL, Phillips DJ, Vlug A, Harada S, Radl J. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* 31(2), 143-68 (1992).
- [0571]** Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW,

Collins N, Haining WN, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8⁺ T cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 214(4), 895-904 (2017).

[0572] Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^o edição. NIH Publicação n^o 91-3242. Washington, D.C.: Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (1991).

[0573] Kim YH, Choi BK, Kim KH, Kang SW, Kwon BS. Combination Therapy with Cisplatin and Anti-4-1BB. *Cancer Res*. 68(18), 7264-7269 (2009).

[0574] Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. *MAbs* 8(6), 1010-20 (2016).

[0575] Kleinovink JW, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, Hall T, Ossendorp F, Franssen MF. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology*. 6(4), e1294299 (2017).

[0576] Kocak E et al. Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res*. 15;66(14), 7276-84 (2006).

[0577] Lechner MG et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of *in vivo* behavior and response to immunotherapy. *J Immunother*. 36(9), 477-89 (2013).

[0578] Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T, Bagshawe KD. A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A

to suppress the immune response. *Int. J. Cancer* 47(5), 659-64 (1991).

[0579] Lefranc MP *et al.* IMGT®, o sistema de informações internacional ImMunoGeneTics® 25 anos. *Nucleic Acids Res.* 43(Emissão de Banco de dados):D413-22 (2015).

[0580] Lefranc MP *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 29(3), 185-203 (2005).

[0581] Li F. e Ravetch JV. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(48), 19501-6 (2013).

[0582] Link A *et al.* Preclinical pharmacology of MP0310: a 4-1BB/FAP bispecific DARPIn drug candidate promoting tumor-restricted T cell co-stimulation [abstract]. Em: *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 14-18 de abril de 2018; Chicago (IL) Resumo nr 3752 (2018).

[0583] Makkouk A, Chester C, Kohrt HE. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 54, 112-119 (2016).

[0584] Martins JP, Kennedy PJ, Santos HA, Barrias C, Sarmiento B. A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery. *Pharmacol. Ther.* 161, 22-39 (2016).

[0585] Niu L *et al.* Cytokine-mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice. *J Immunol.* 178(7), 4194-4213 (2007).

[0586] Pérez-Ruiz E, Etxeberria I, Rodríguez-Ruiz, Melero

I. Anti-CD137 and PD-1/PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical Synergy. Clin. Cancer Res. 23, (18) (2017)

[0587] Reichen C *et al.* FAP-mediated tumor accumulation of a T-cell agonistic FAP/4-1BB DARPIn drug candidate analyzed by SPECT/CT and quantitative biodistribution [abstract]. Em: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 14-18 de abril de 2018; Chicago (IL) Resumo nr 3029 (2018).

[0588] Schofield DJ *et al.* Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. Genome Biol. 8(11), R254 (2007).

[0589] Segal NH *et al.* Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer. Clin Cancer Res. 24(8):1816-1823 (2018).

[0590] Segal NH *et al.* Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. Clin Cancer Res. 23(8):1929-1936 (2017).

[0591] Shuford WW *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8⁺ T cell proliferation and lead to the amplification *in vivo* of cytotoxic T cell responses. J Exp Med. 186(1), 47-55 (1997).

[0592] Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. J. Mol. Biol. 147(1), 195-7 (1981).

[0593] Taraban VY *et al.* Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. Eur. J. Immunol. 32, 3617-3627 (2002).

[0594] Tello, D, Goldbaum, FA, Mariuzza, RA, Ysern, X,

Schwarz, FP, Poljak, RJ. Three-dimensional structure and thermodynamics of antigen binding by anti-lysozyme antibodies, *Biochem Soc. Trans.*, 21(4), 943-6 (1993).

[0595] Tolcher AW *et al.* Phase Ib Study of Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Combination with Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 23, 5349-57 (2017)

[0596] Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 9(1), 63-73 (2018).

[0597] Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4⁺ and CD8⁺ T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol.* 168(10), 4897-906 (2002).

[0598] Wolf M, Kuball J, Ho WY, Nguyen H, Manley TJ, Bleakley M, Greenberg PD. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8⁺ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood.* 110(1):201-10 (2007).

[0599] Won EY, Cha K, Byun JS, Kim DU, Shin S, Ahn B, Kim YH, Rice AJ, Walz T, Kwon BS, Cho HS. The structure of the trimer of human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily. *J Biol Chem.* 285(12), 9202-10 (2010).

[0600] Wozniak-Knopp G *et al.* Introducing antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains: Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties. *Protein Eng Des Sel.* 23(4), 289-97

(2010).

[0601] Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, Coukos G, Powell DJ Jr. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. Clin Cancer Res. 20(1):44-55 (2014).

[0602] Yu X, Anasetti C. CH 10 - T-cell costimulation in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 195-222 (2013).

[0603] Zanetti M. Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. J Immunol. 194:2049-2056 (2015).

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de anticorpo que se liga ao ligante de morte programada 1 (PD-L1) e CD137 **caracterizada por** compreender

- (a) um sítio de ligação a antígeno com base em região determinante de complementaridade (CDR) para PD-L1; e
- (b) um sítio de ligação a antígeno CD137 localizado em um domínio CH3 da molécula de anticorpo;

em que o sítio de ligação a antígeno à base de CDR compreende CDRs 1-6 apresentados em:

- (i) SEQ ID NOs **1, 2, 3, 4, 5 e 6**, respectivamente **[E12v2]**;
- (ii) SEQ ID NOs **1, 2, 3, 18, 19 e 20**, respectivamente **[E05v2]**; ou
- (iii) SEQ ID NOs **1, 2, 3, 18, 19 e 29**, respectivamente **[G12v2]**; e

em que o sítio de ligação a antígeno CD137 compreende uma primeira sequência e uma segunda sequência localizadas nas alças estruturais de AB e EF do domínio CH3, respectivamente, em que as primeira e segunda sequências têm a sequência apresentada em SEQ ID NOs **113 e 114 [FS22-172-003]**, ou **79 e 80 [FS22-53-008]**, respectivamente.

2. Molécula de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** compreender o domínio VH e o domínio VL apresentados em:

- (i) SEQ ID NOs **12 e 14**, respectivamente **[E12v2]**;
- (ii) SEQ ID NOs **23 e 25**, respectivamente **[E05v2]**; ou
- (iii) SEQ ID NOs **23 e 30**, respectivamente **[G12v2]**.

3. Molécula de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** compreender:

(i) CDRs 1-6 apresentadas em SEQ ID NOs **1, 2, 3, 4, 5** e **6**, respectivamente [**E12v2**]; e/ou

(ii) o domínio VH e domínio VL apresentados em SEQ ID NOs **12** e **14**, respectivamente [**E12v2**].

4. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada pelo** fato de que

(i) a primeira sequência está localizada entre as posições 14 e 17 do domínio CH3 da molécula de anticorpo; e/ou

(ii) em que a segunda sequência está localizada entre 91 e 99 do domínio CH3 da molécula de anticorpo; e

em que a numeração de resíduo de aminoácido está de acordo com o esquema de numeração IMGT.

5. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** compreender o domínio CH3 apresentado em SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**.

6. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** compreender a cadeia pesada e a cadeia leve de anticorpo:

(i) **FS22-172-003-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **134** e **17**, respectivamente;

(ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOs **137** e **28**, respectivamente;

(iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **140** e **33**, respectivamente;

(iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** apresentadas em SEQ ID NOs **143** e **17**, respectivamente;

- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** apresentadas em SEQ ID NOS **146** e **28**, respectivamente; ou
- (vi) **FS22-053-008-AA/G12v2** apresentadas em SEQ ID NOS **149** e **33**, respectivamente.

7. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** compreender a cadeia pesada e a cadeia leve apresentadas em SEQ ID NOS **134** e **17**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E12v2**].

8. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** ter sido modificada para reduzir ou anular a ligação do domínio CH2 da molécula de anticorpo para um ou mais receptores Fcγ.

9. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, sendo a molécula de anticorpo **caracterizada por** não se ligar a um ou mais receptores Fcγ.

10. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada pelo** fato de que a ligação da molécula de anticorpo a CD137 em uma célula imune e a PD-L1 ligado à superfície de célula tumoral causa o agrupamento de CD137 na célula imune.

11. Molécula ou moléculas de ácido nucleico **caracterizadas por** codificarem a molécula de anticorpo conforme definida em qualquer uma das reivindicações anteriores.

12. Vetor ou vetores **caracterizados por** compreenderem a molécula ou as moléculas de ácido nucleico conforme definidas na reivindicação 11.

13. Célula hospedeira recombinante **caracterizada por**

compreender a molécula (ou moléculas) de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 11 ou o vetor (ou vetores) conforme definido na reivindicação 12.

14. Método de produção da molécula de anticorpo conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 **caracterizado por** compreender cultivar a célula hospedeira recombinante conforme definida na reivindicação 13, sob condições para a produção da molécula de anticorpo.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** compreender adicionalmente isolar e/ou purificar a molécula de anticorpo.

16. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender a molécula de anticorpo conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

17. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada por** ser para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo.

18. Método de tratamento de câncer em um indivíduo **caracterizado por** compreender administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz da molécula de anticorpo conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

[illegible]

Figura 1A

[illegible]

Figura 1B

[illegible]

Figura 1C

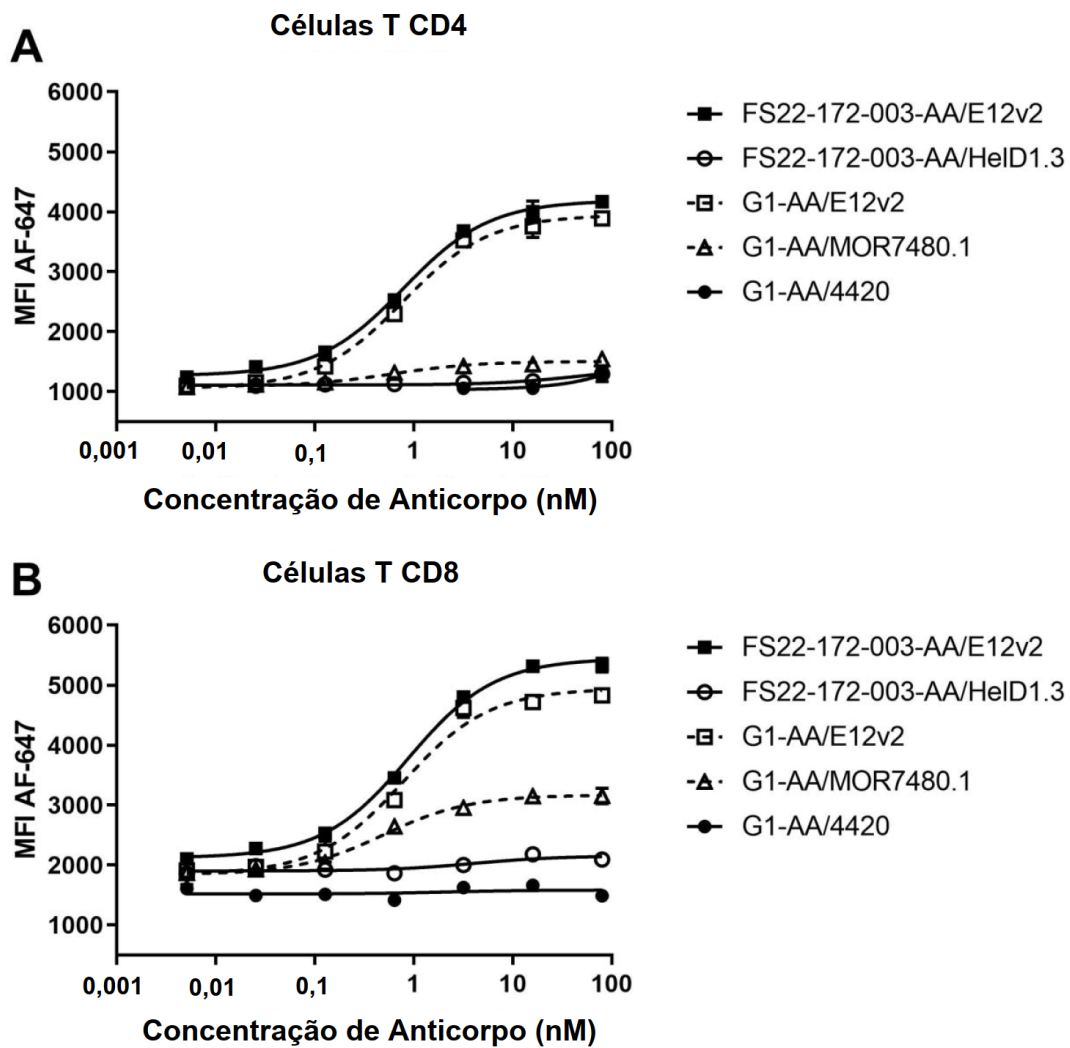


Figura 2

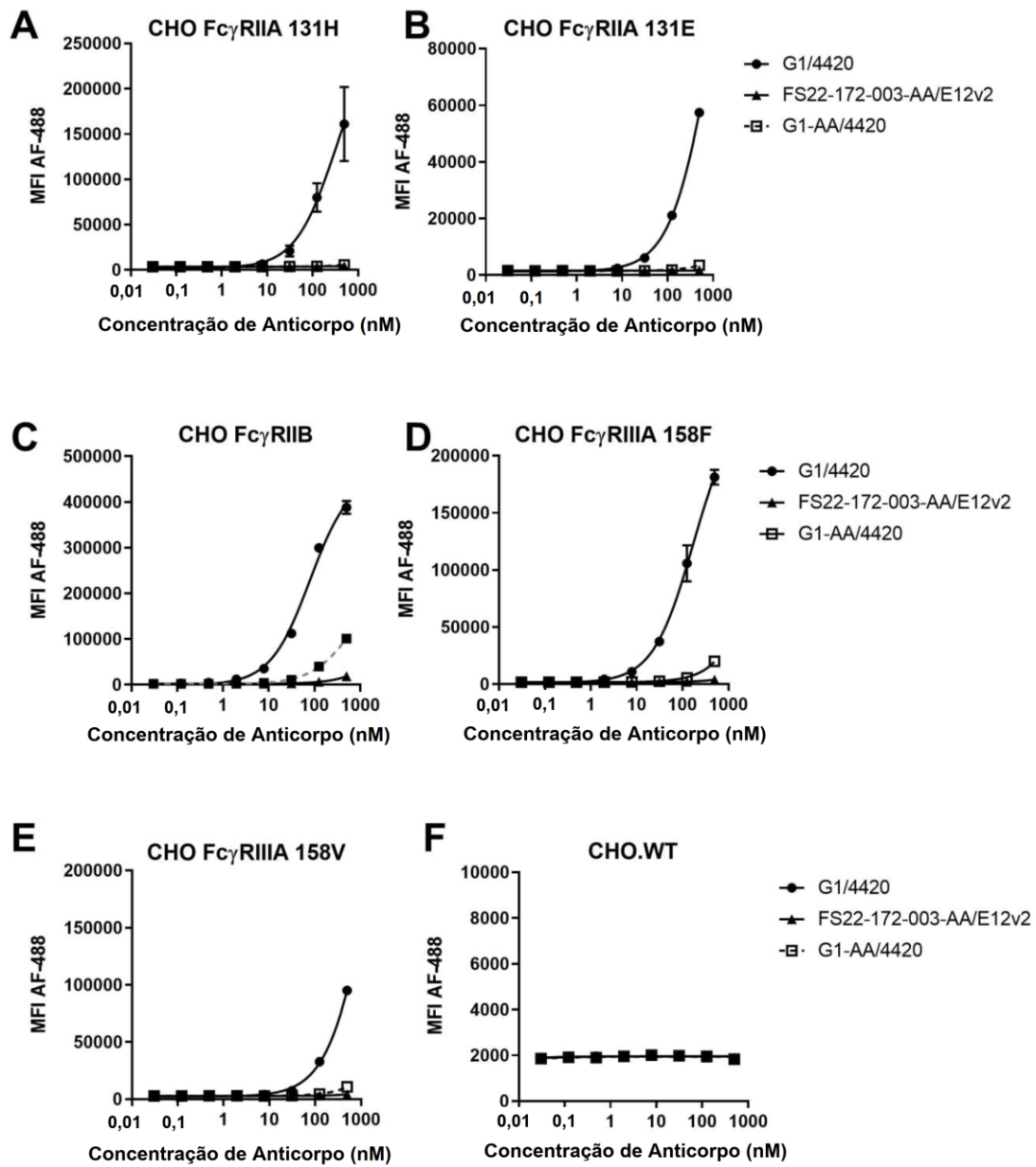


Figura 3

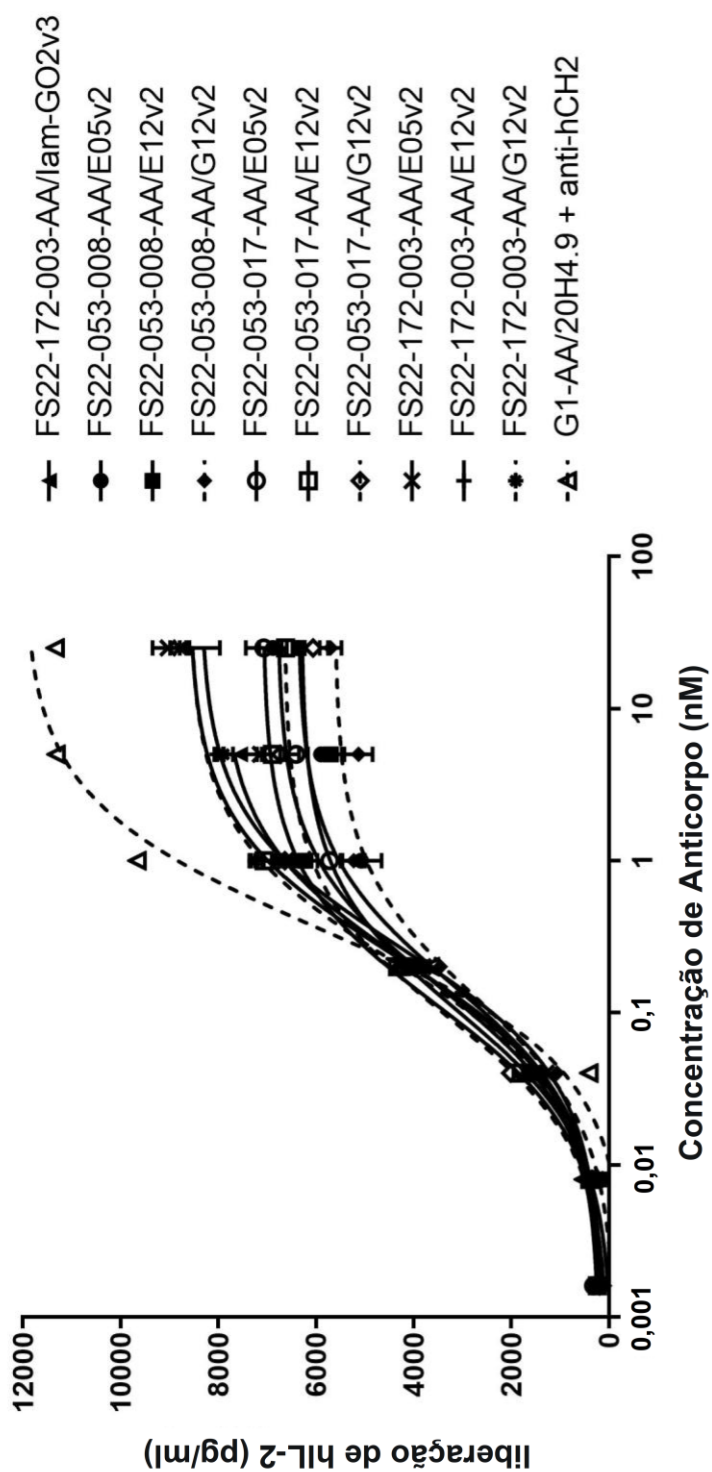


Figura 4

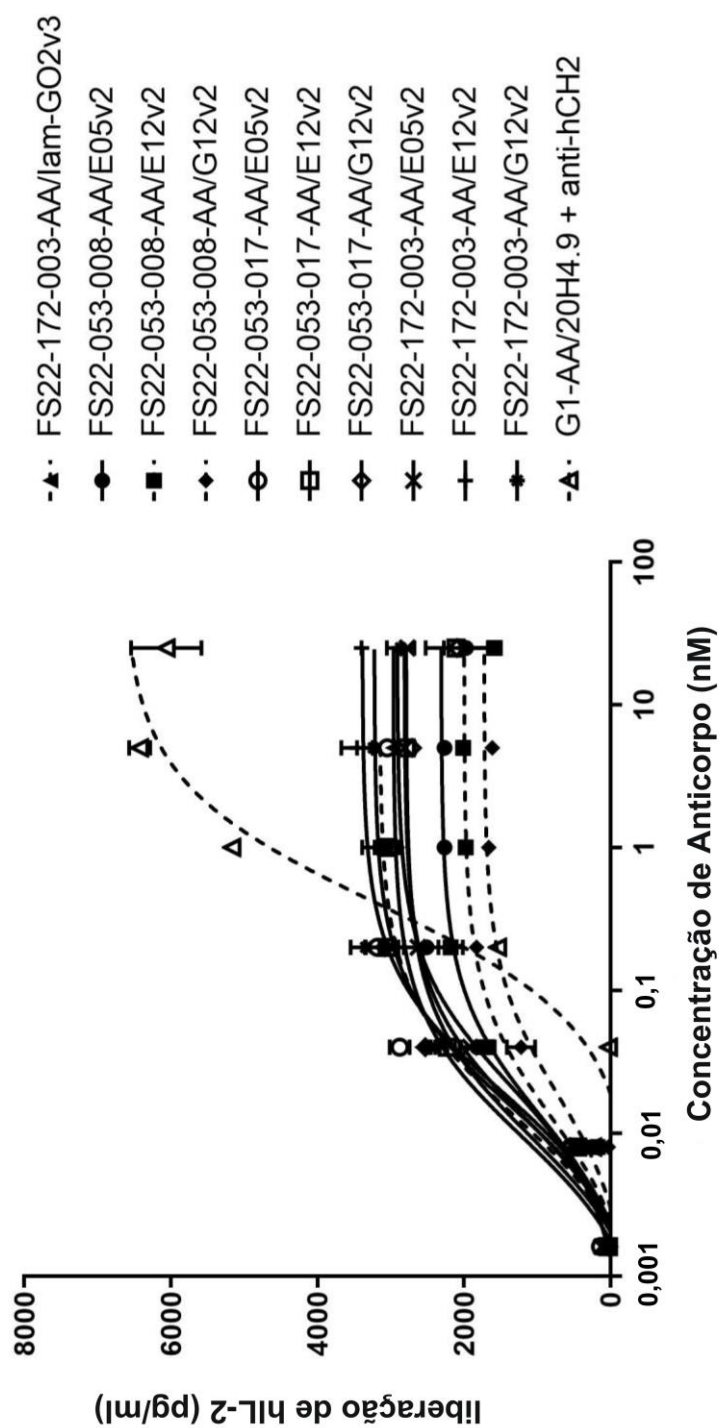


Figura 5

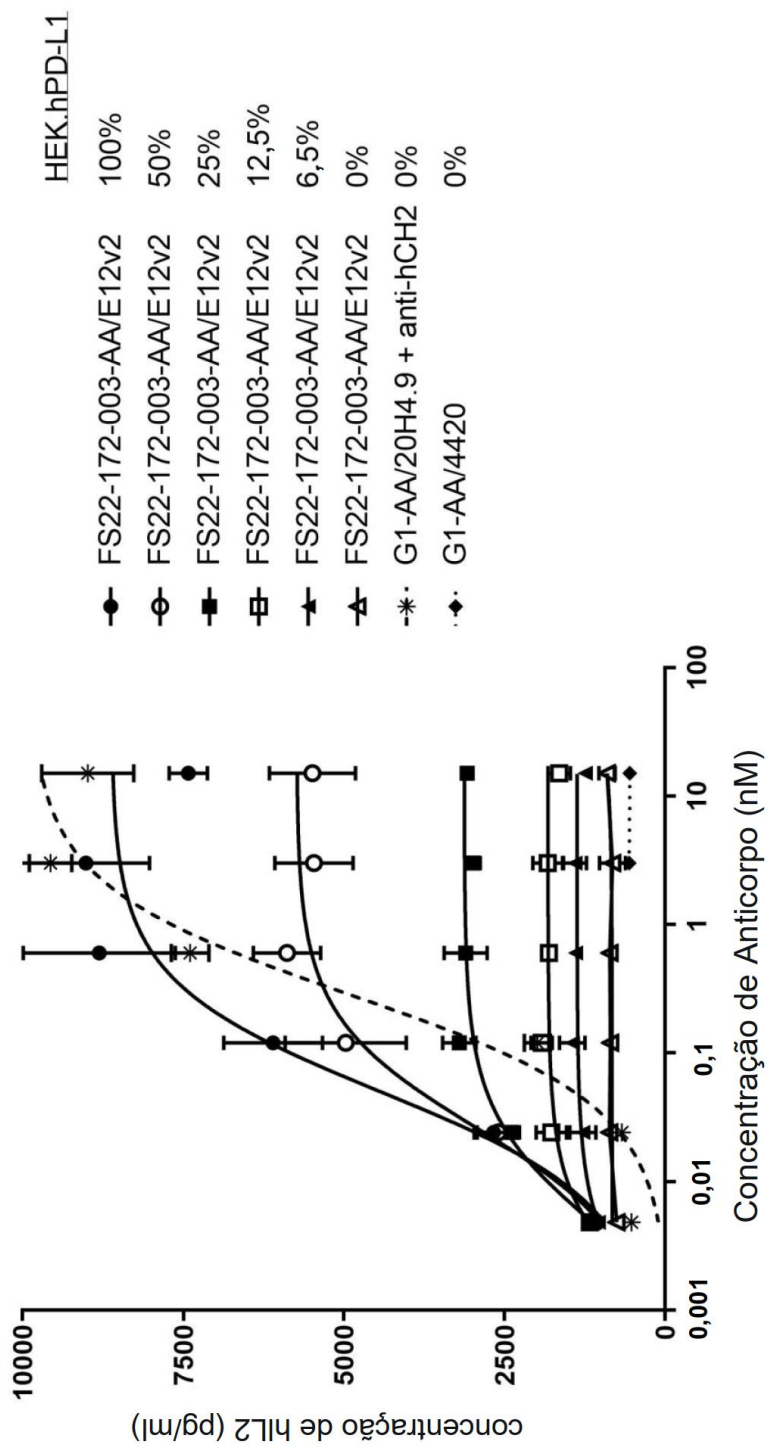


Figura 6

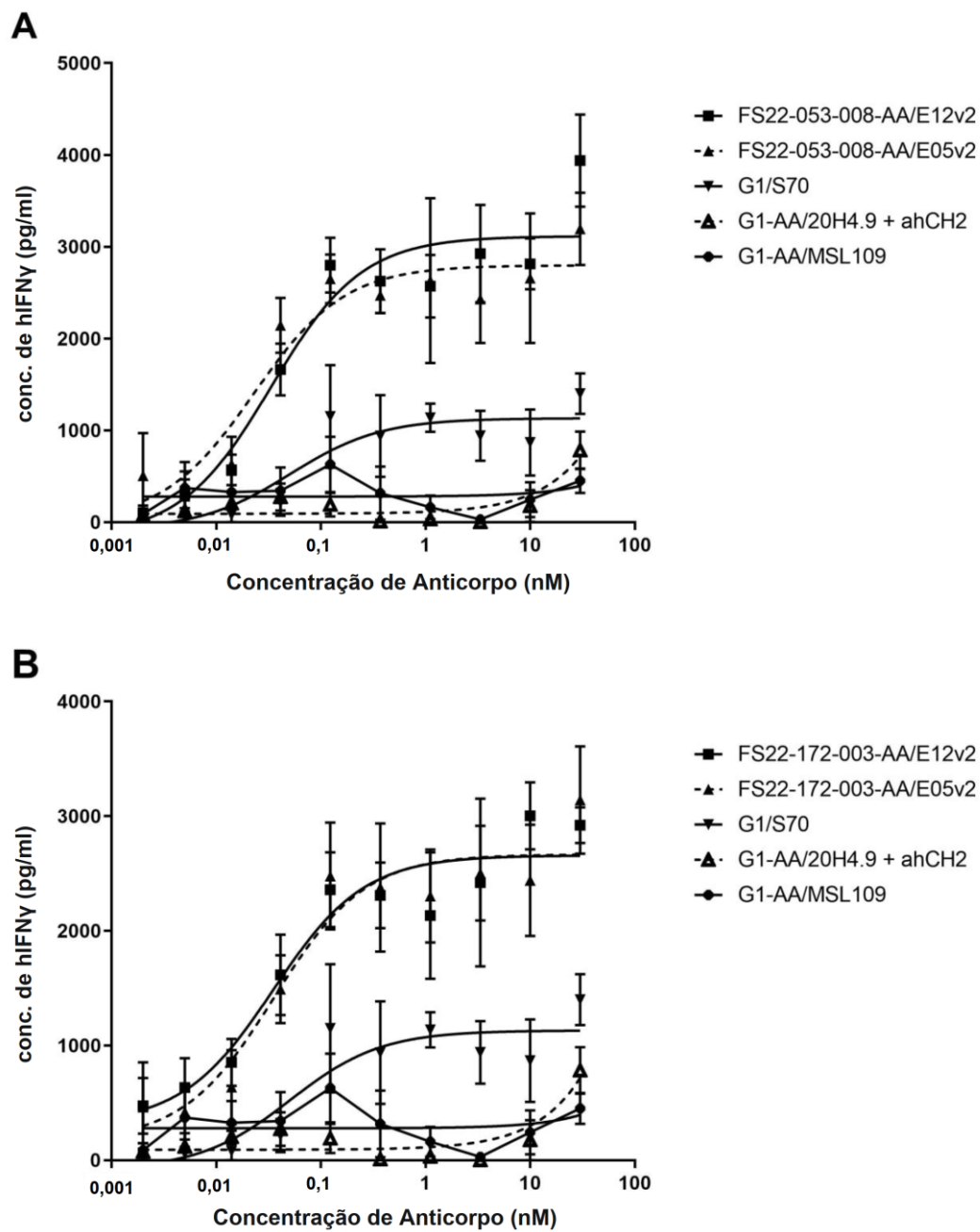


Figura 7

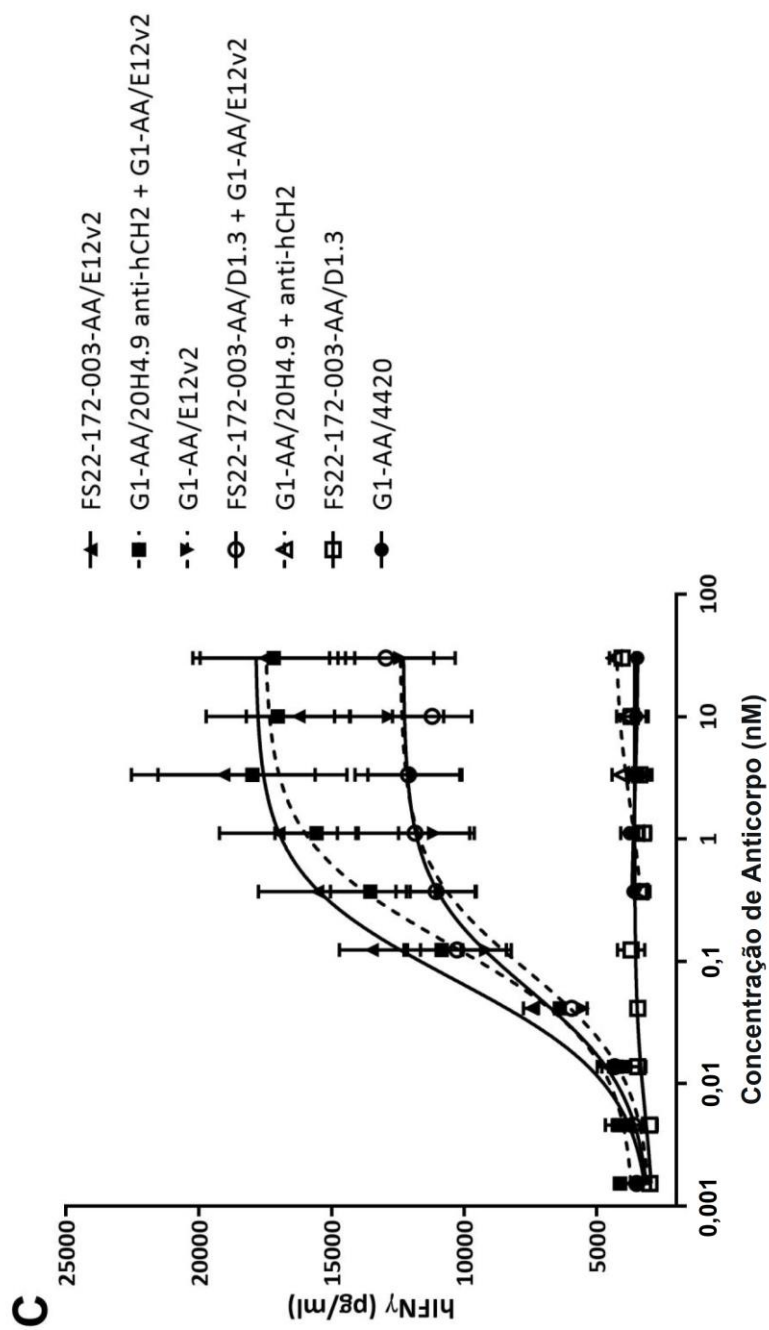


Figura 7 continuação

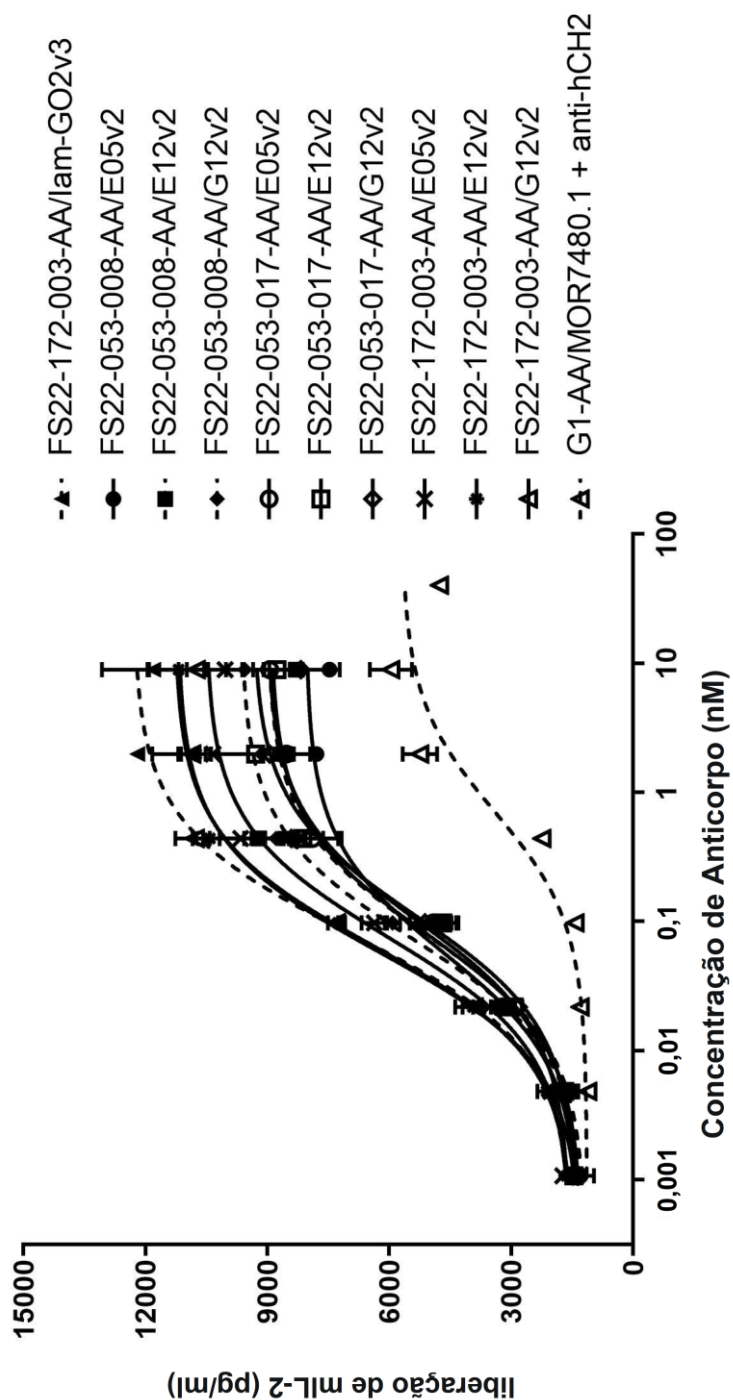


Figura 8

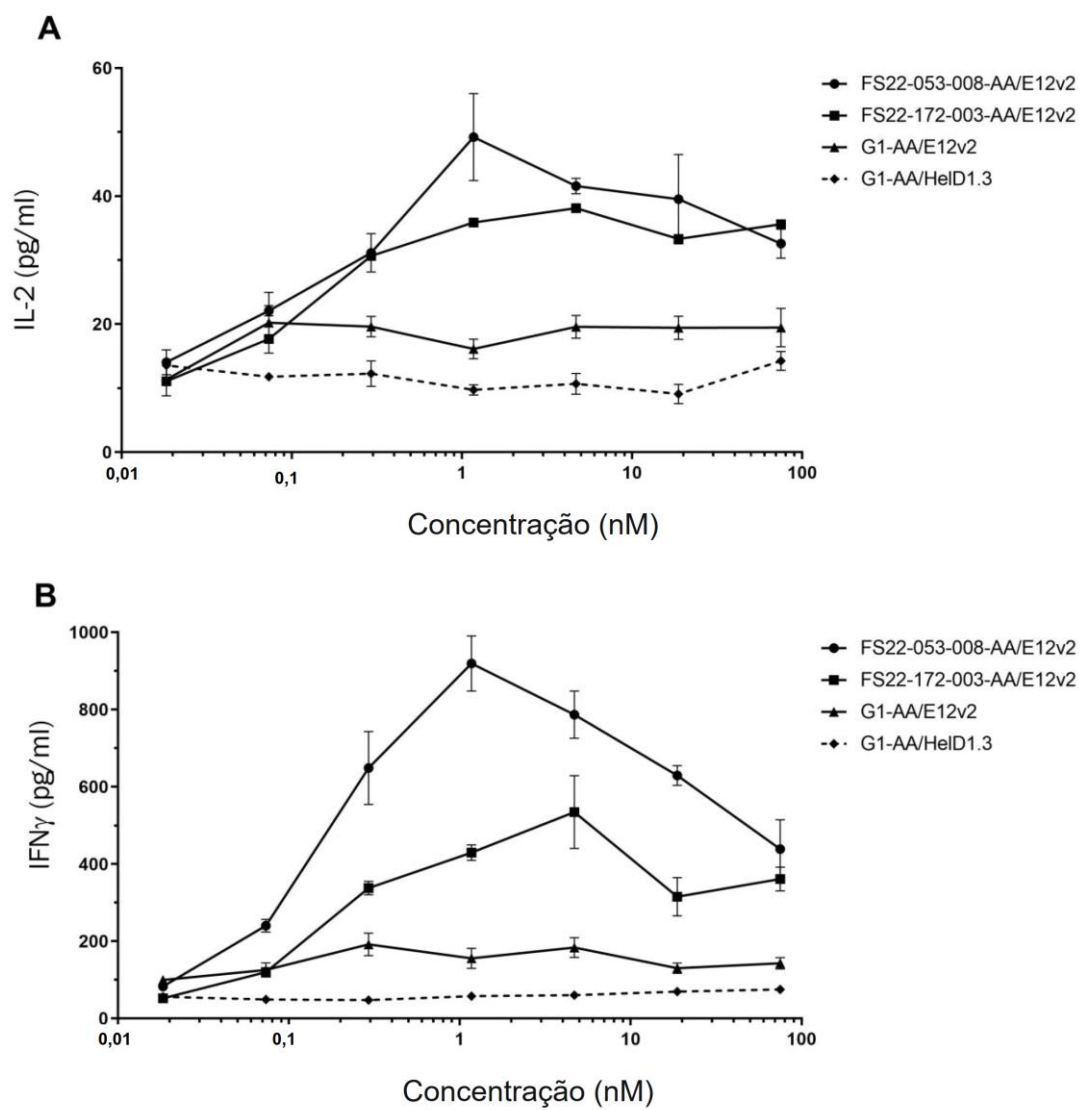


Figura 9

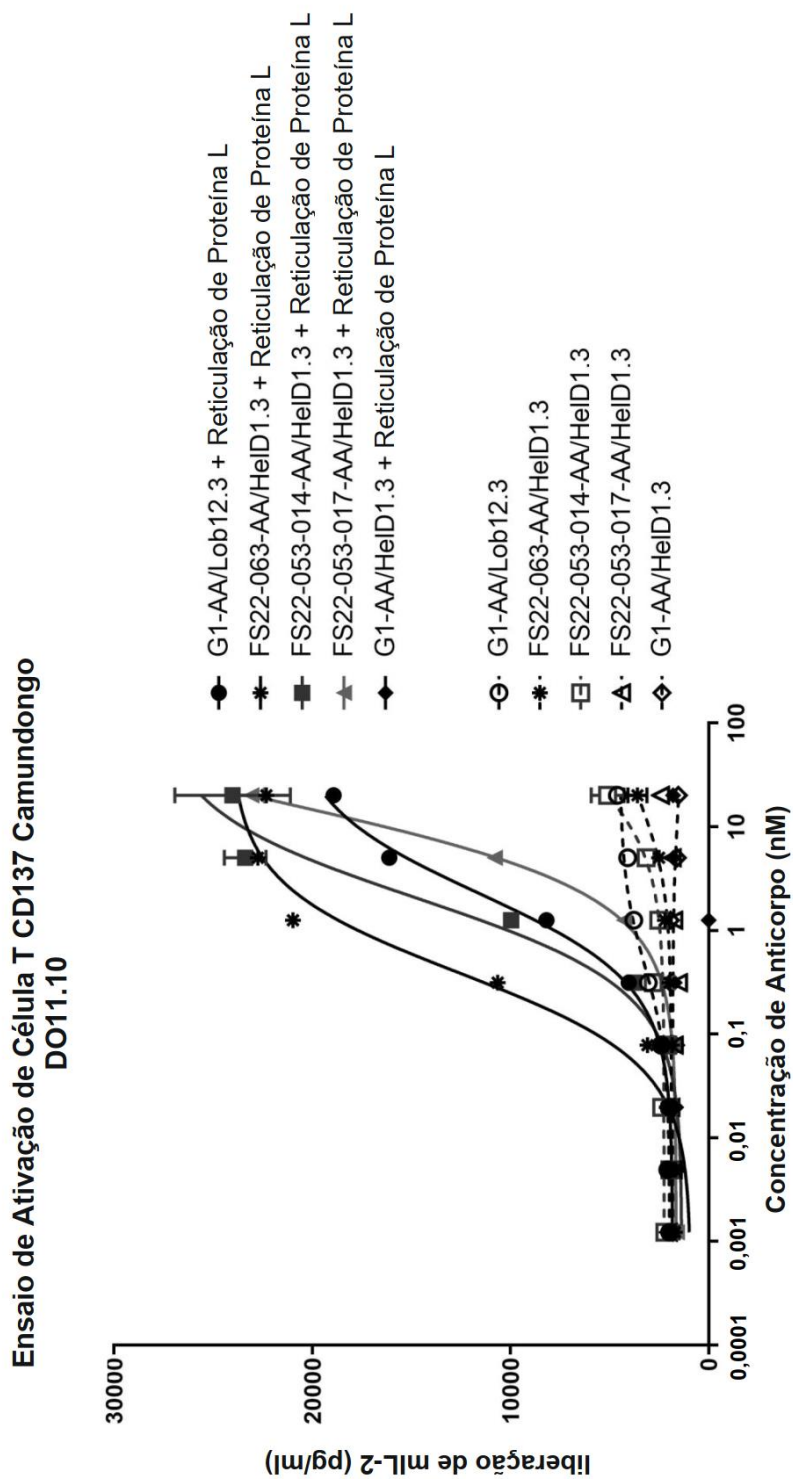


Figura 10

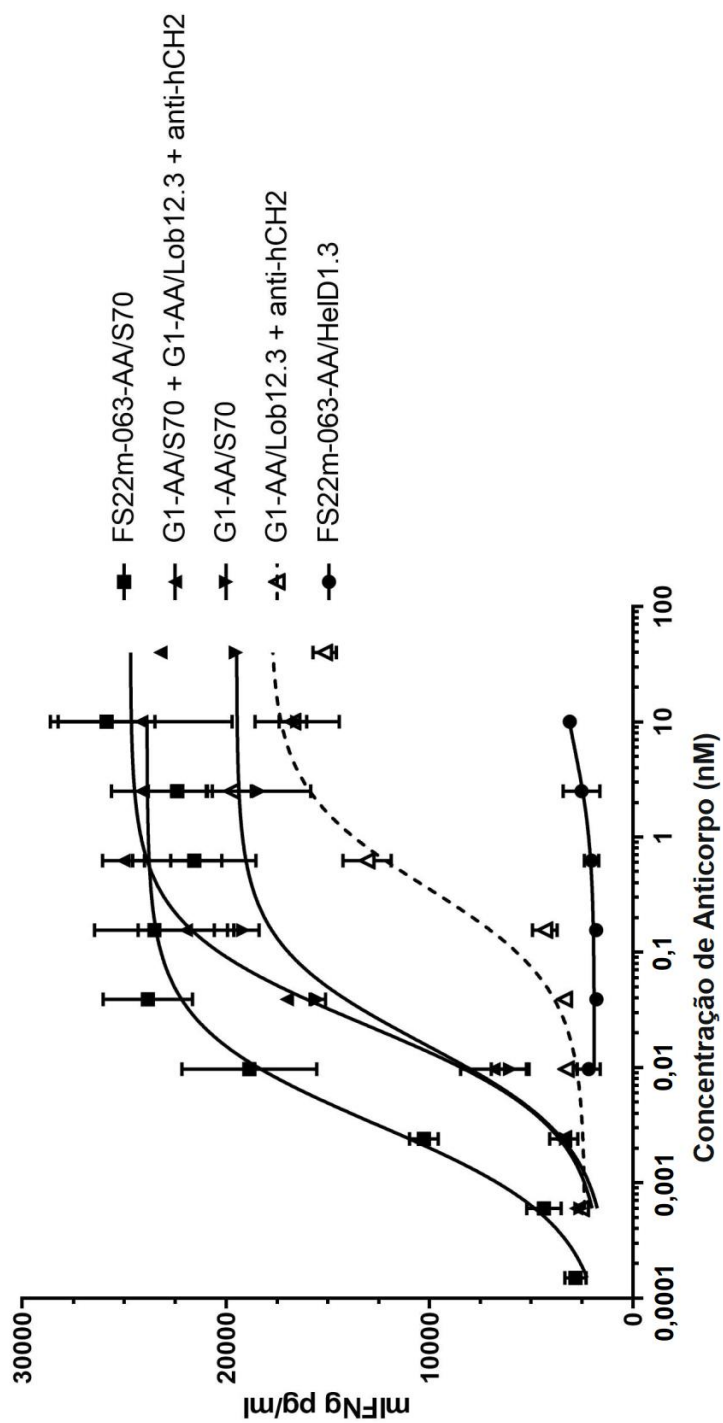


Figura 11

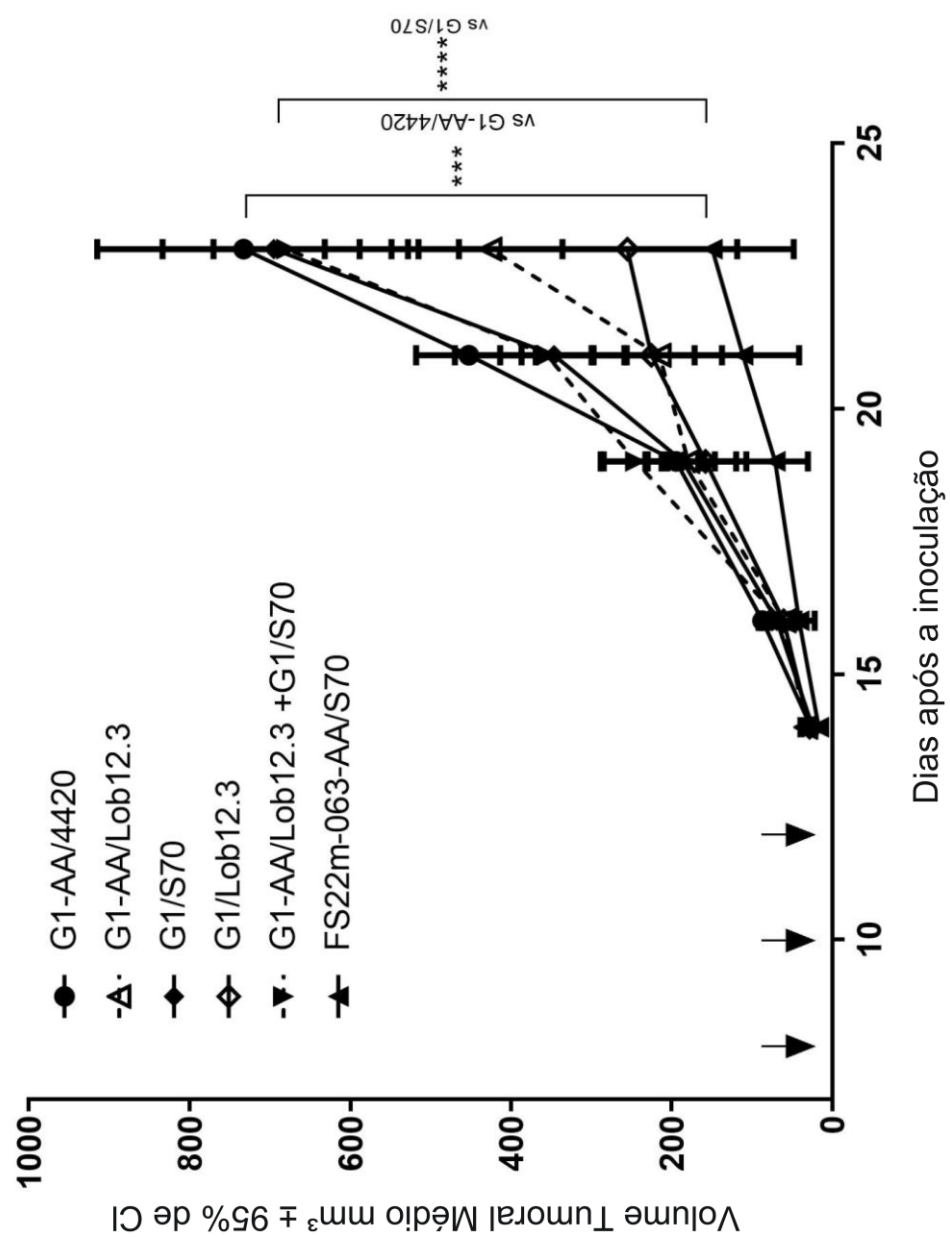


Figura 12

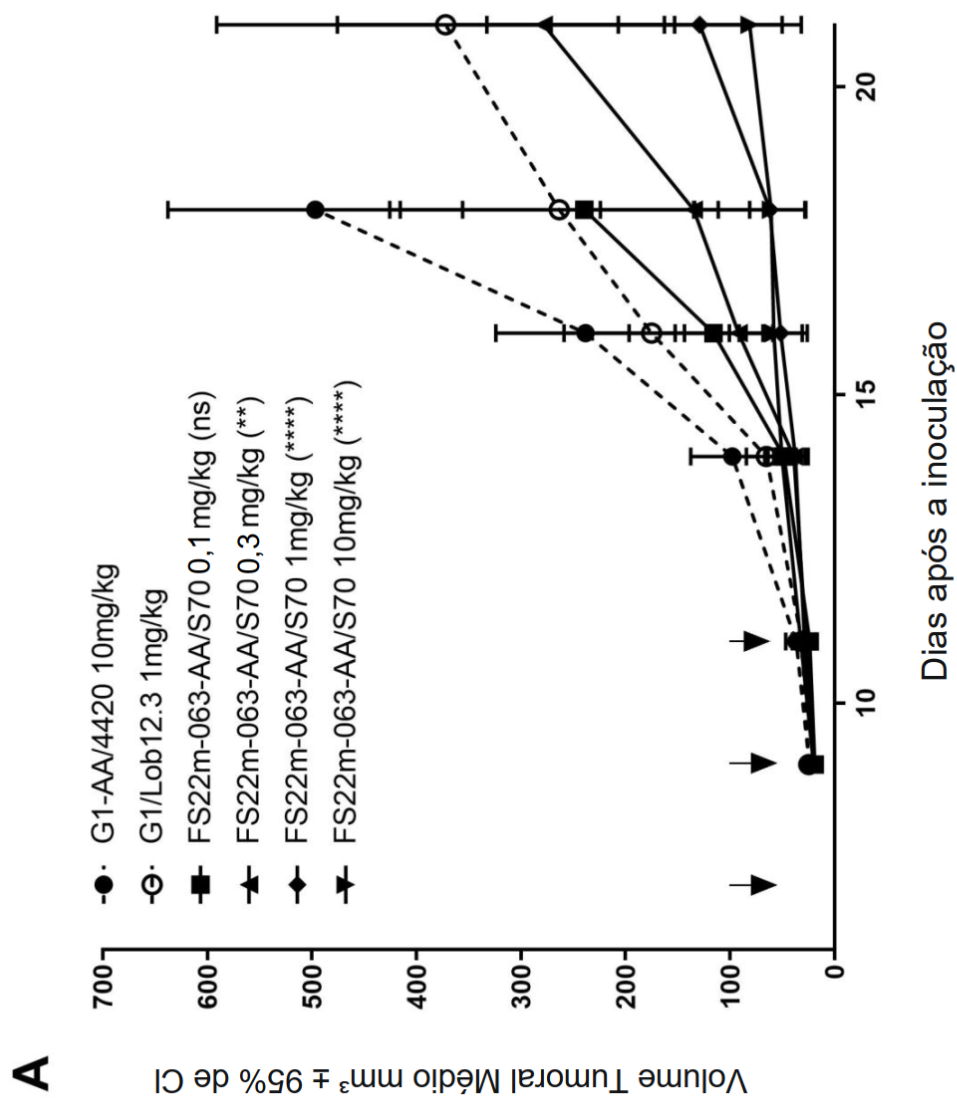


Figura 13

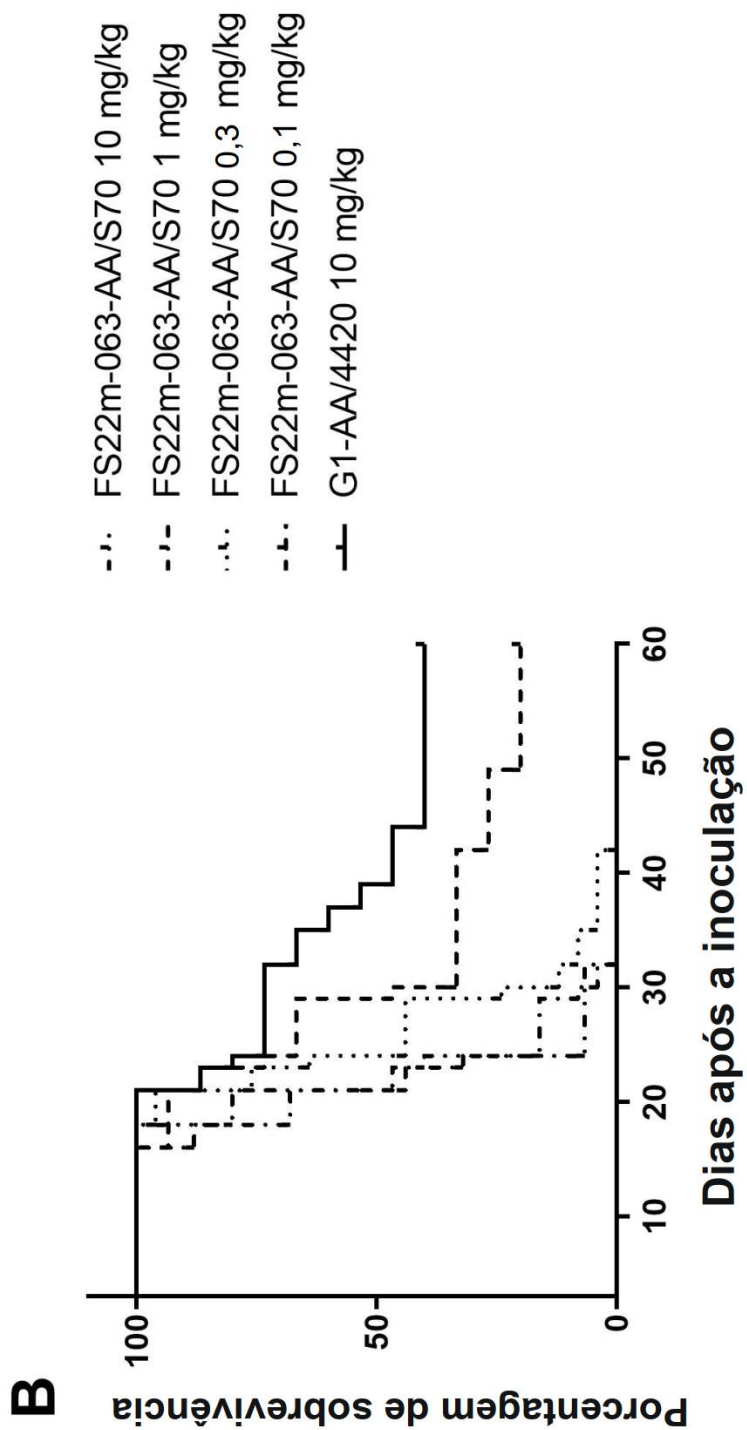


Figura 13 continuação

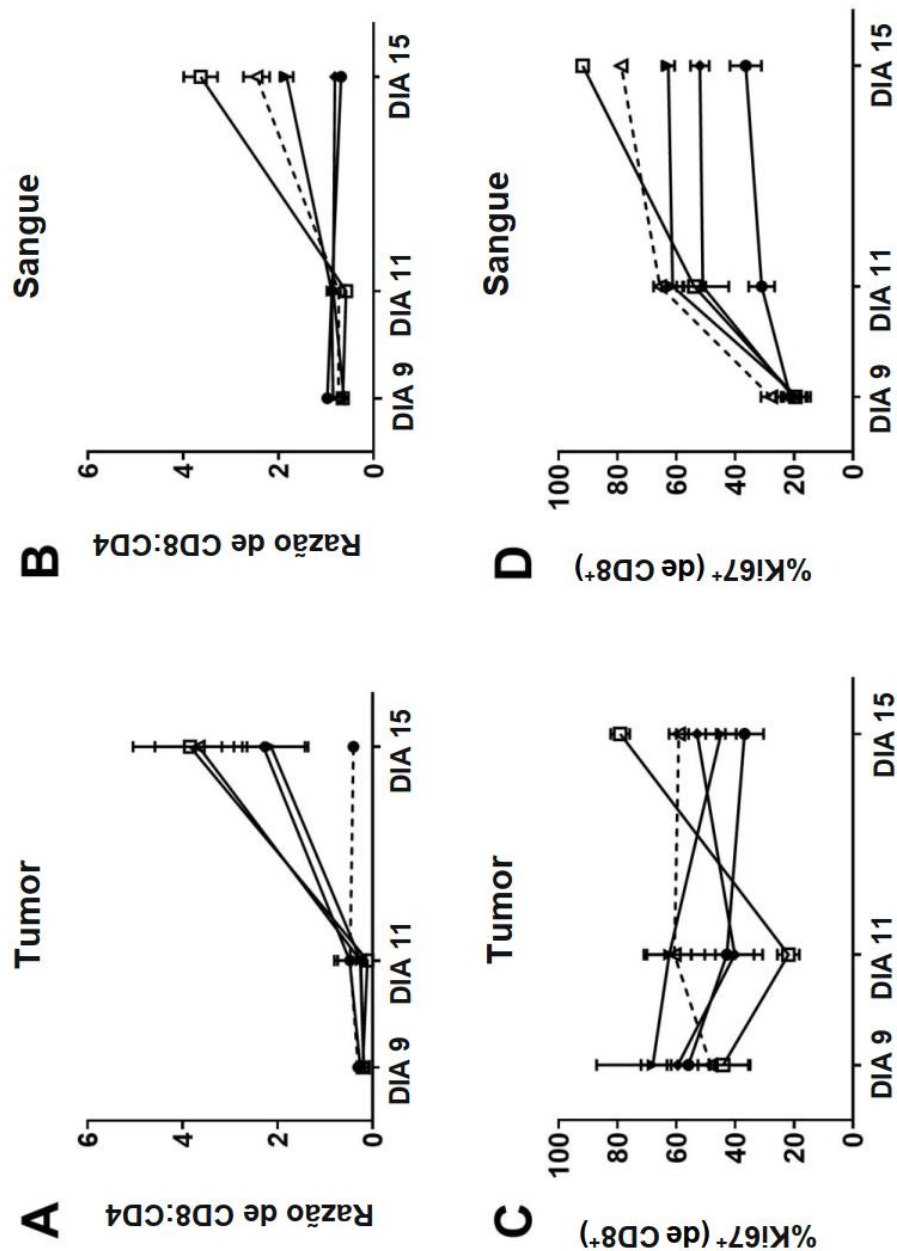


Figura 14

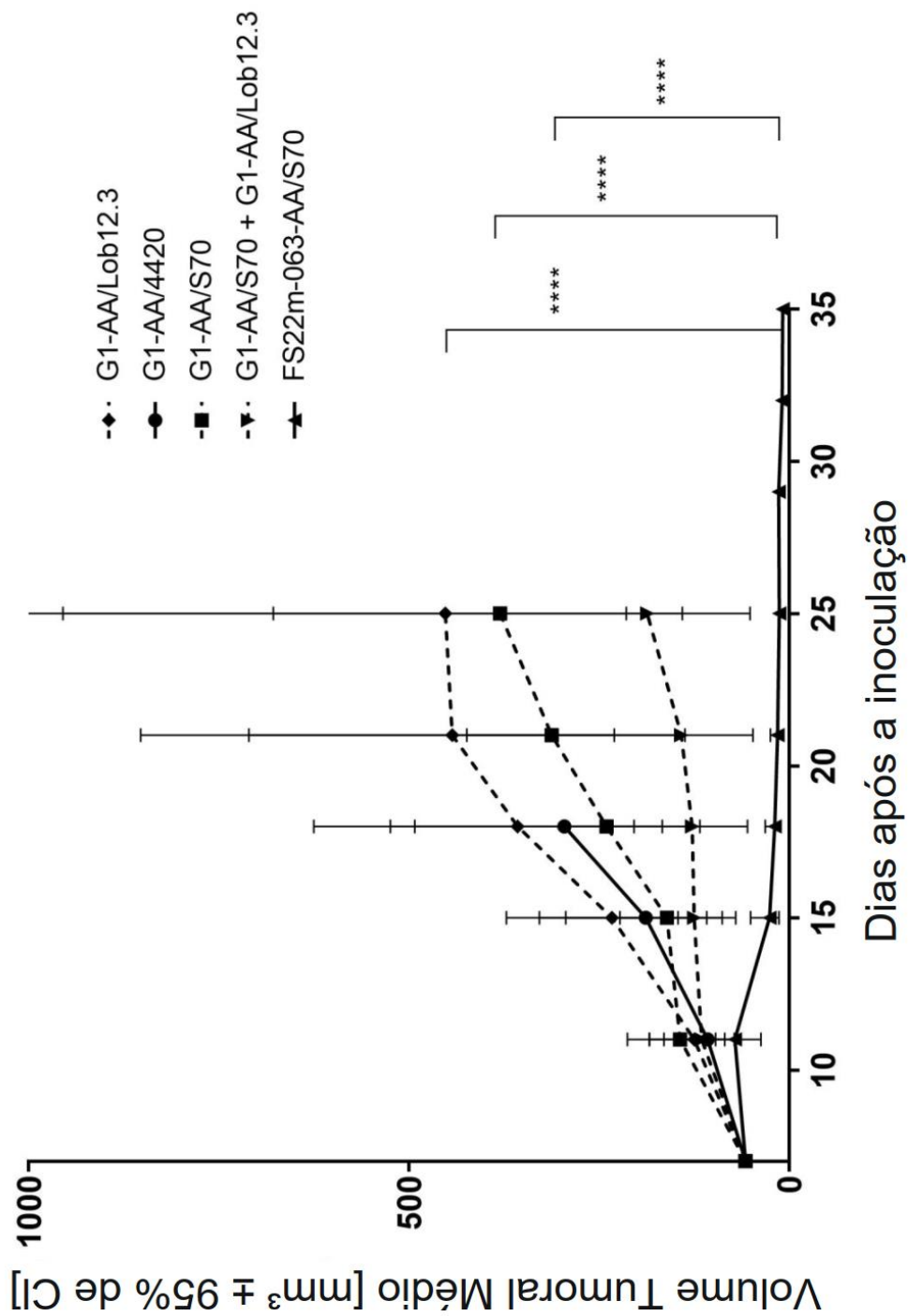


Figura 15

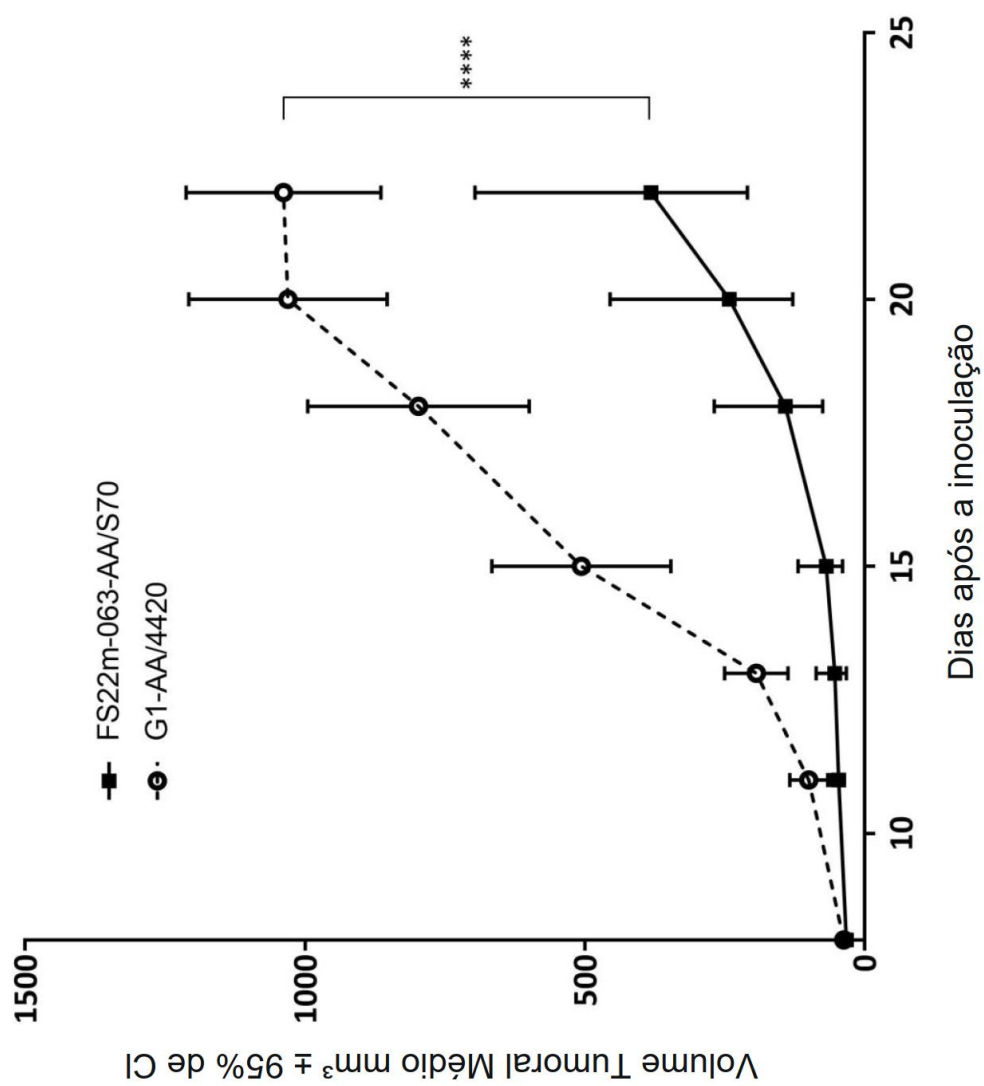


Figura 16

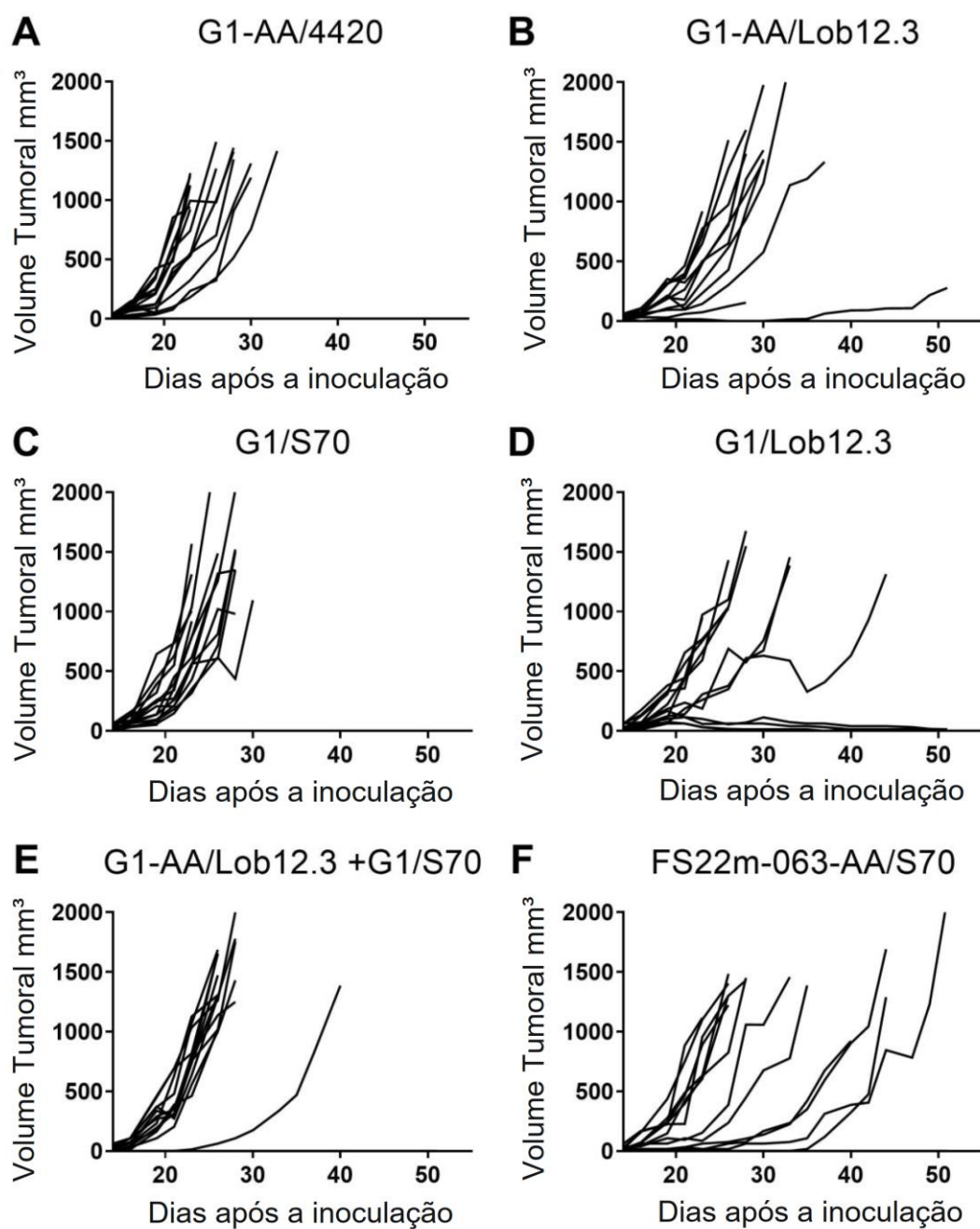


Figura 17

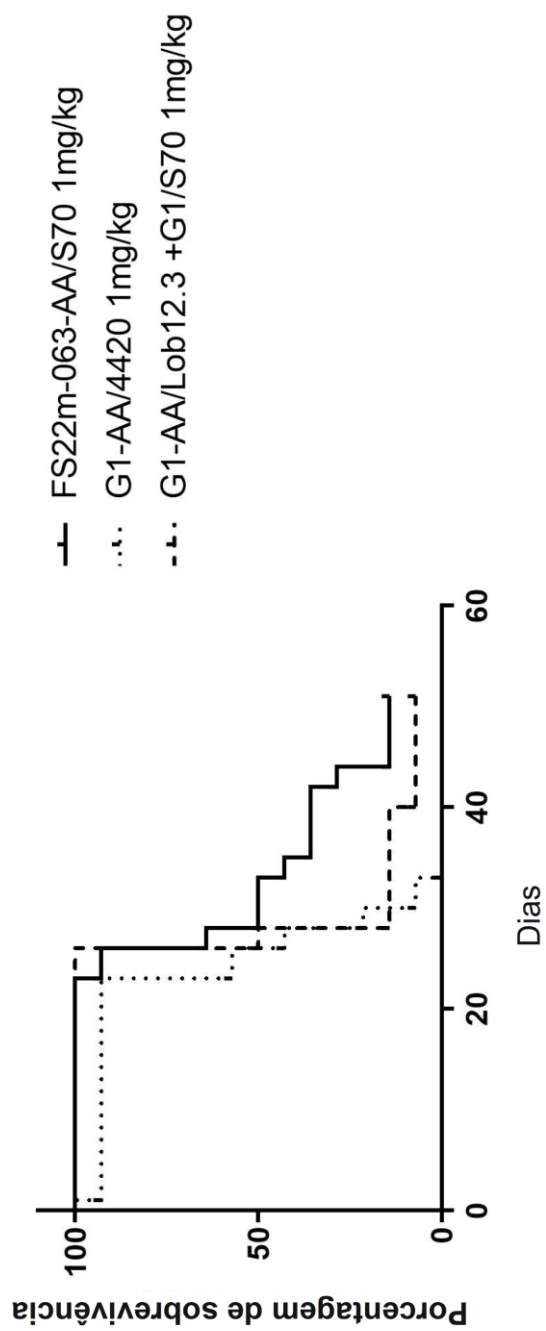


Figura 18

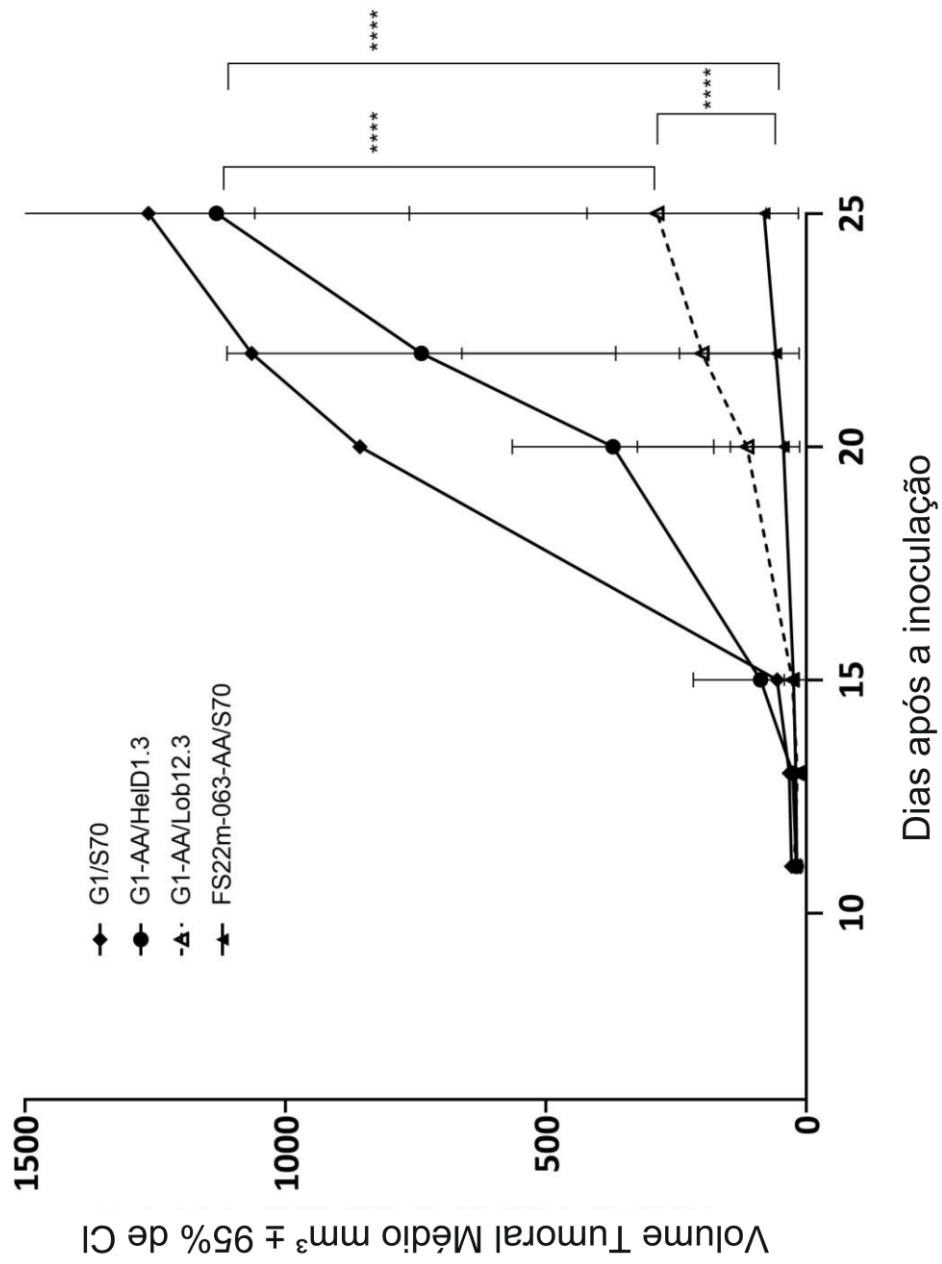


Figura 19

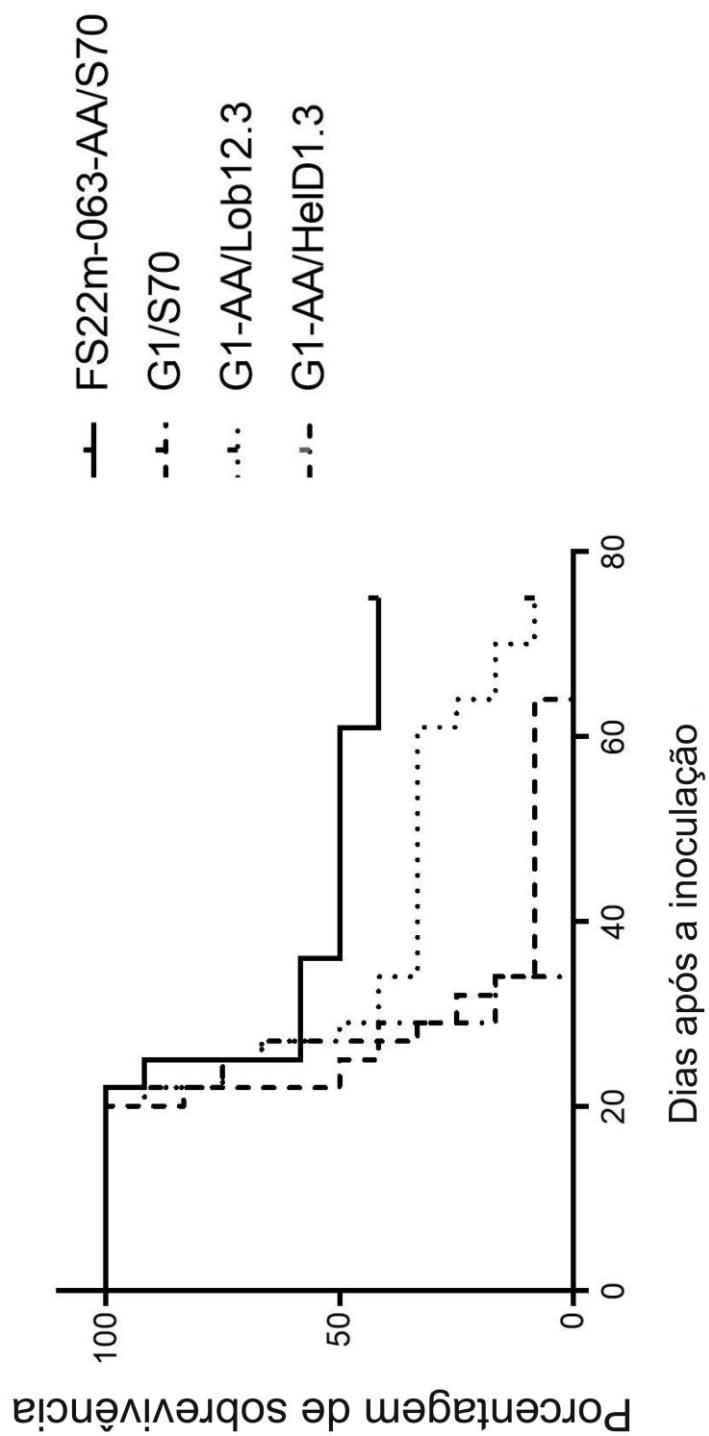


Figura 20

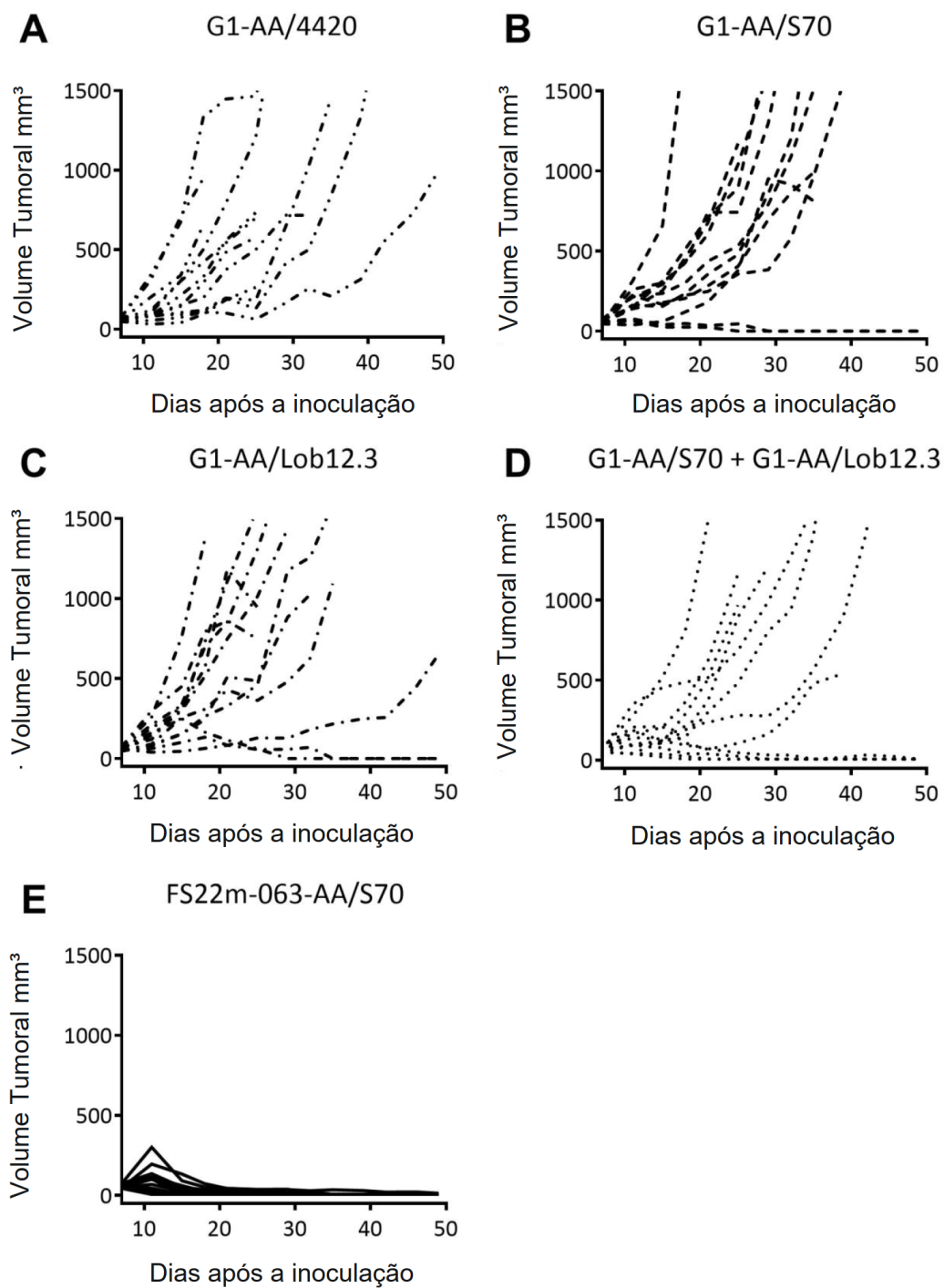


Figura 21

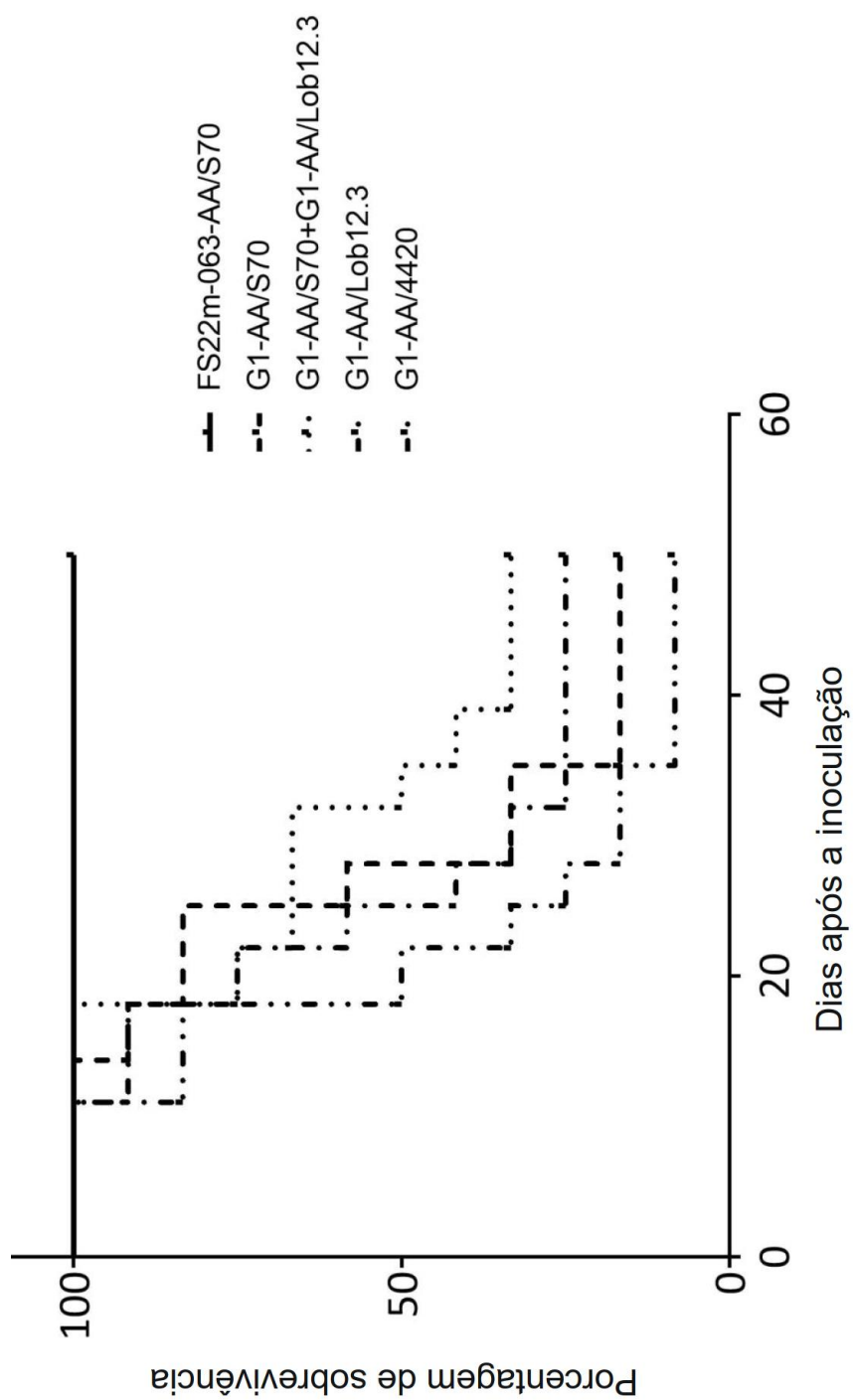


Figura 22

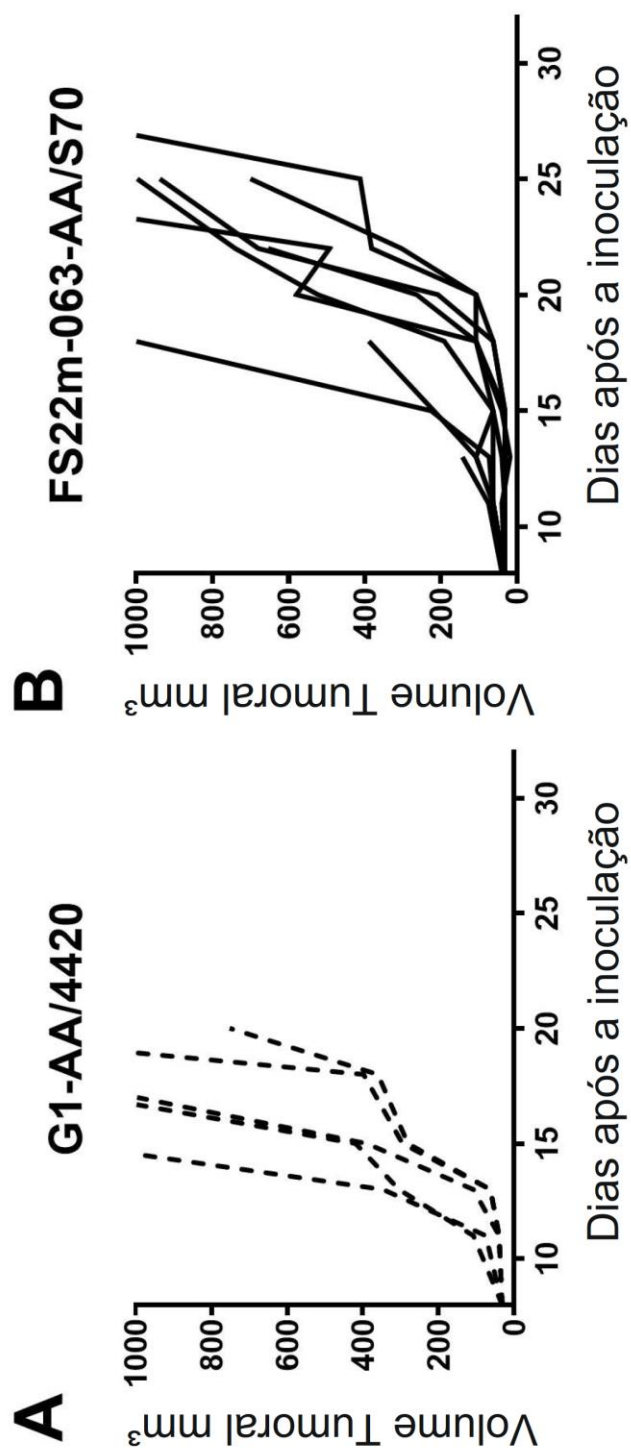


Figura 23

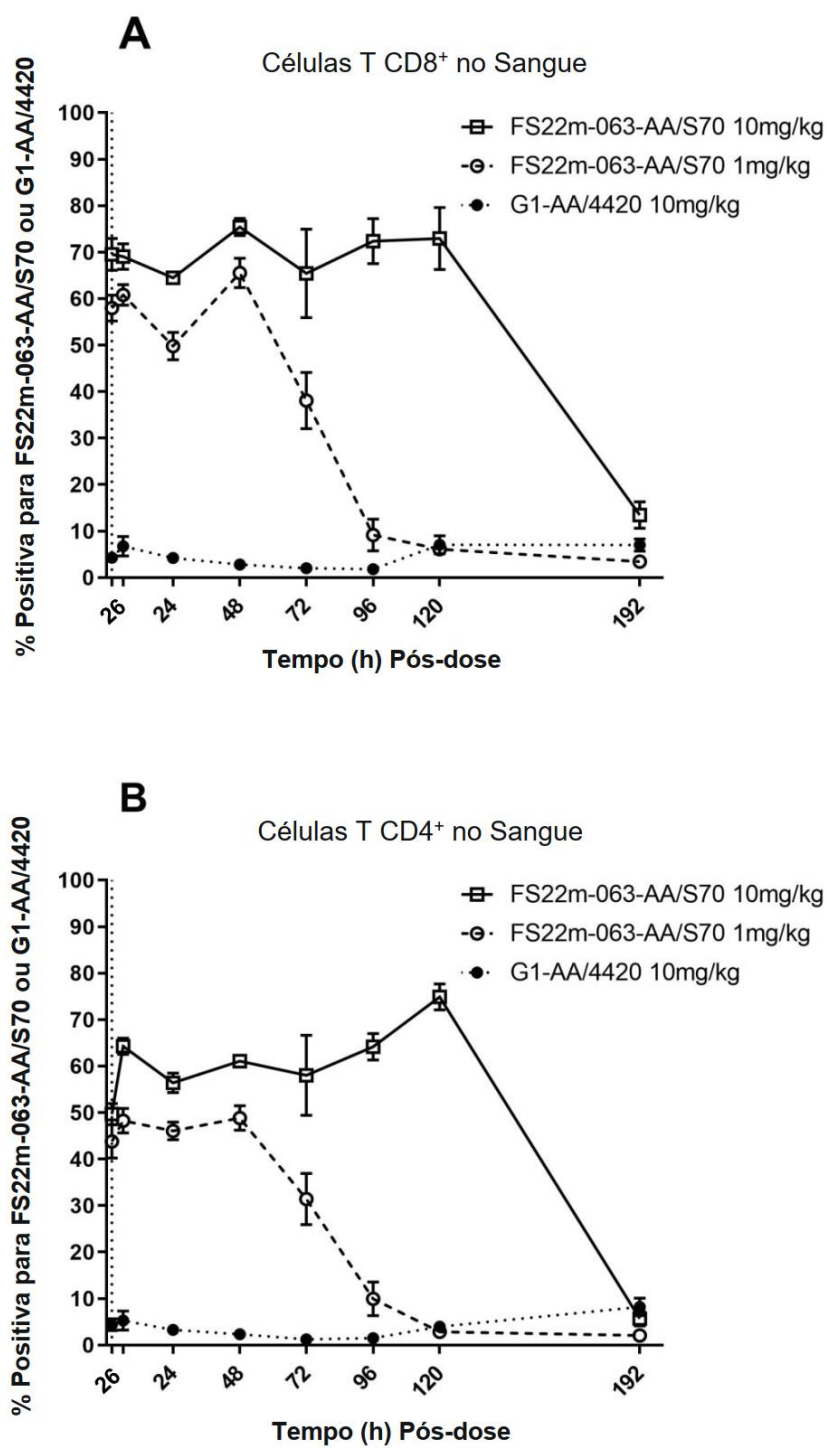


Figura 24

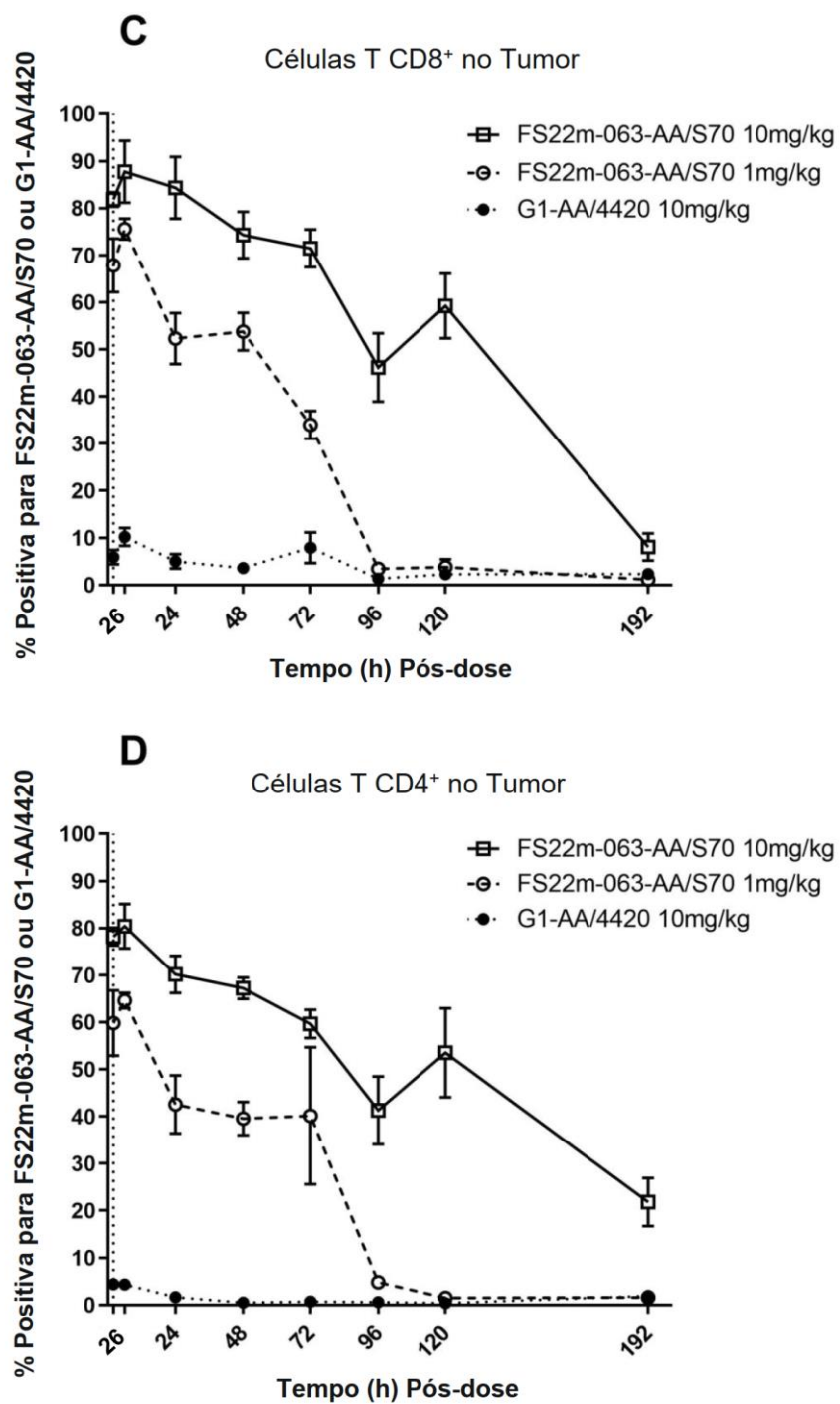


Figura 24 continuação

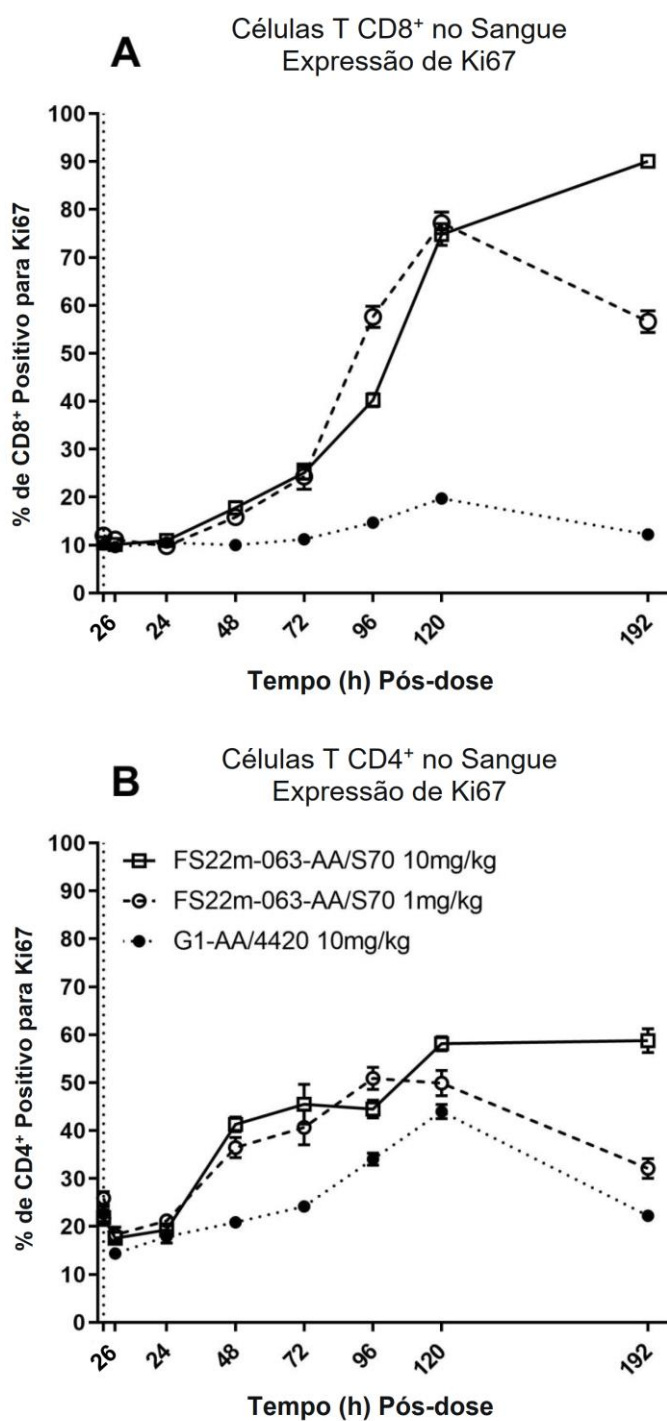


Figura 25

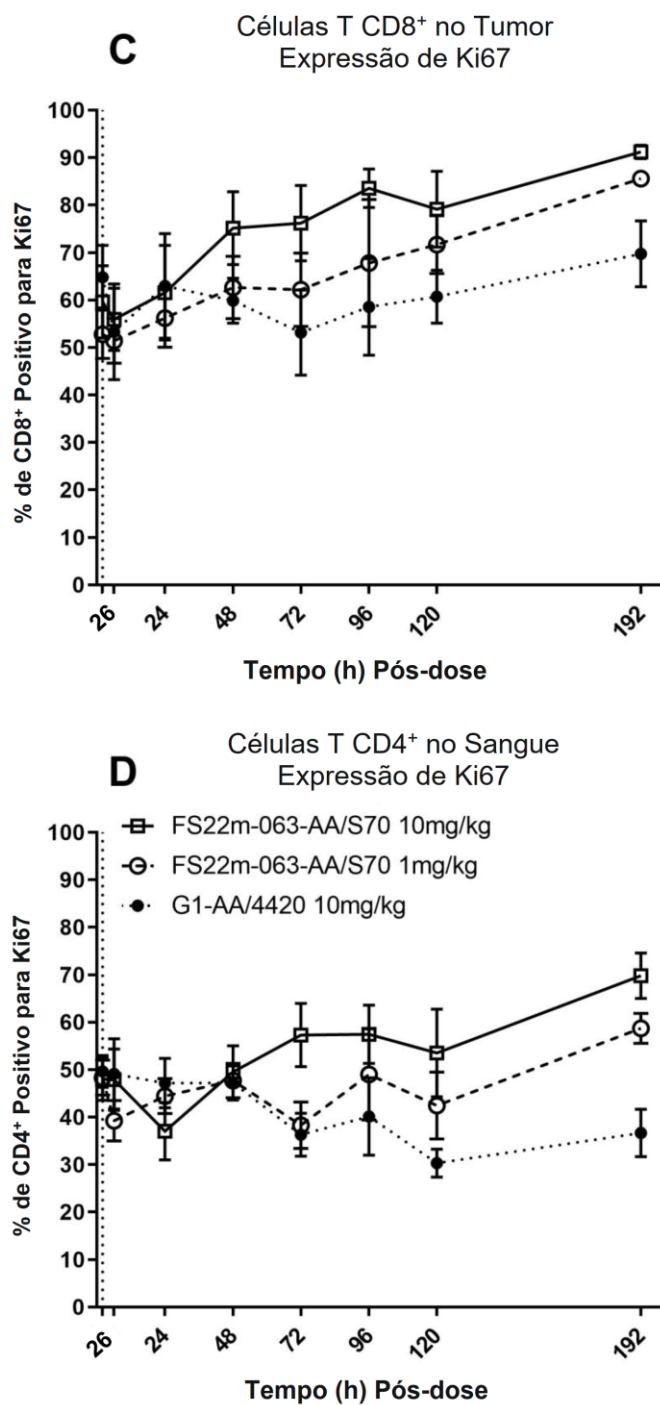


Figura 25 continuação

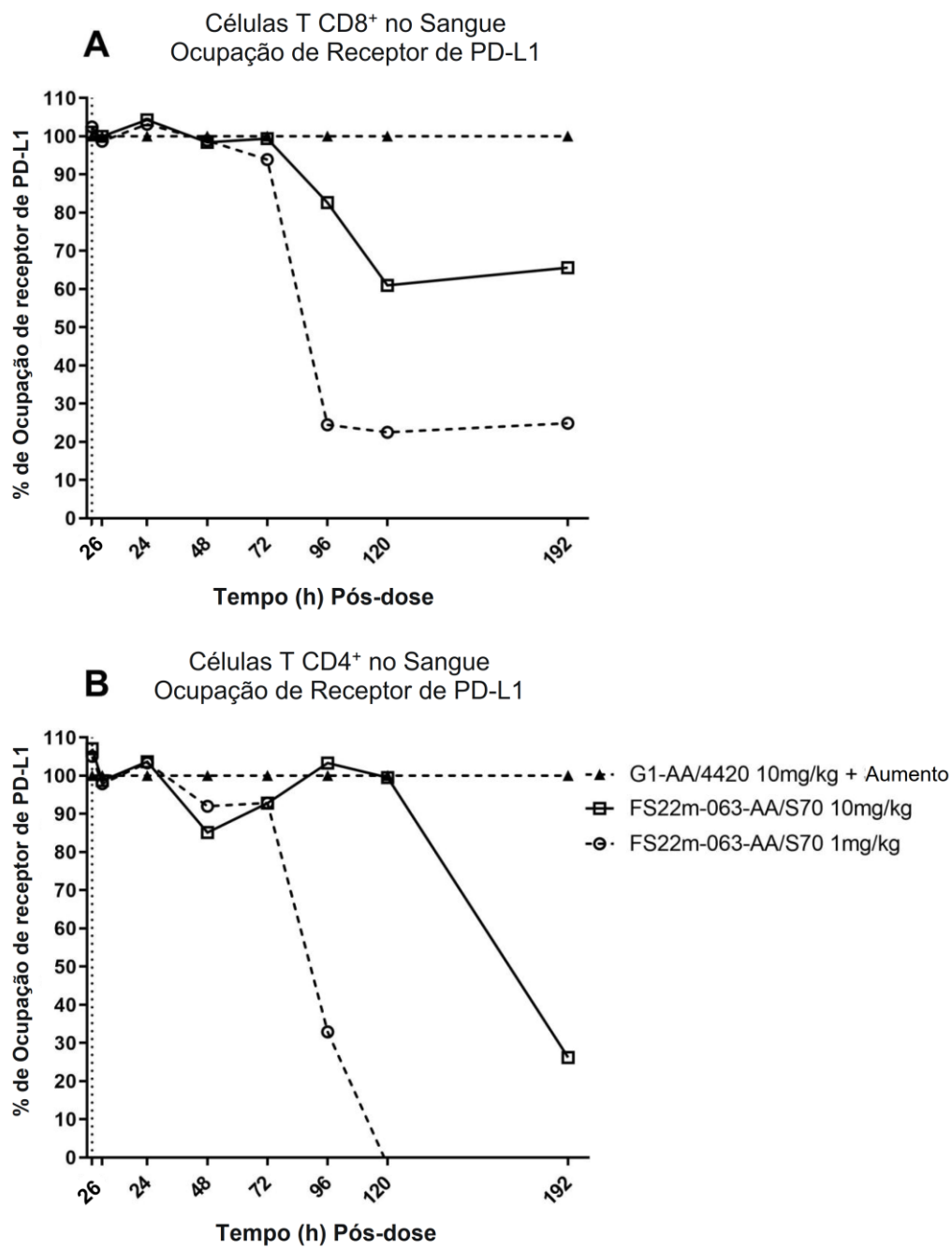


Figura 26

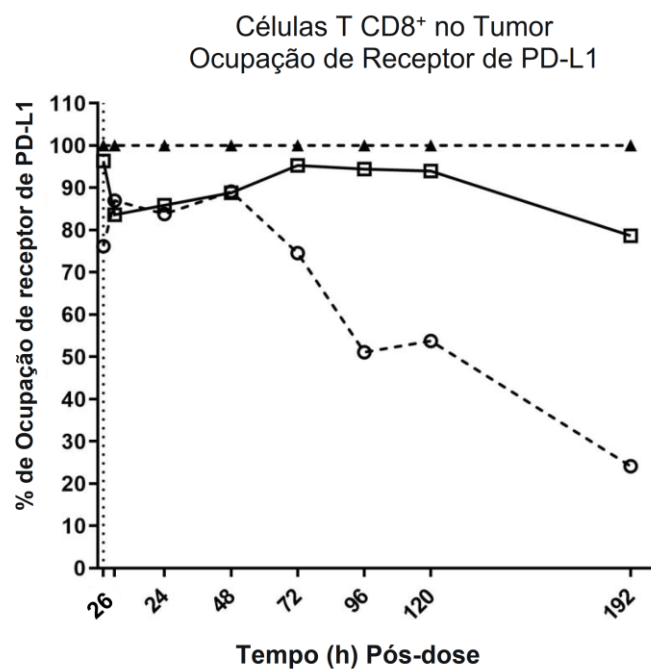
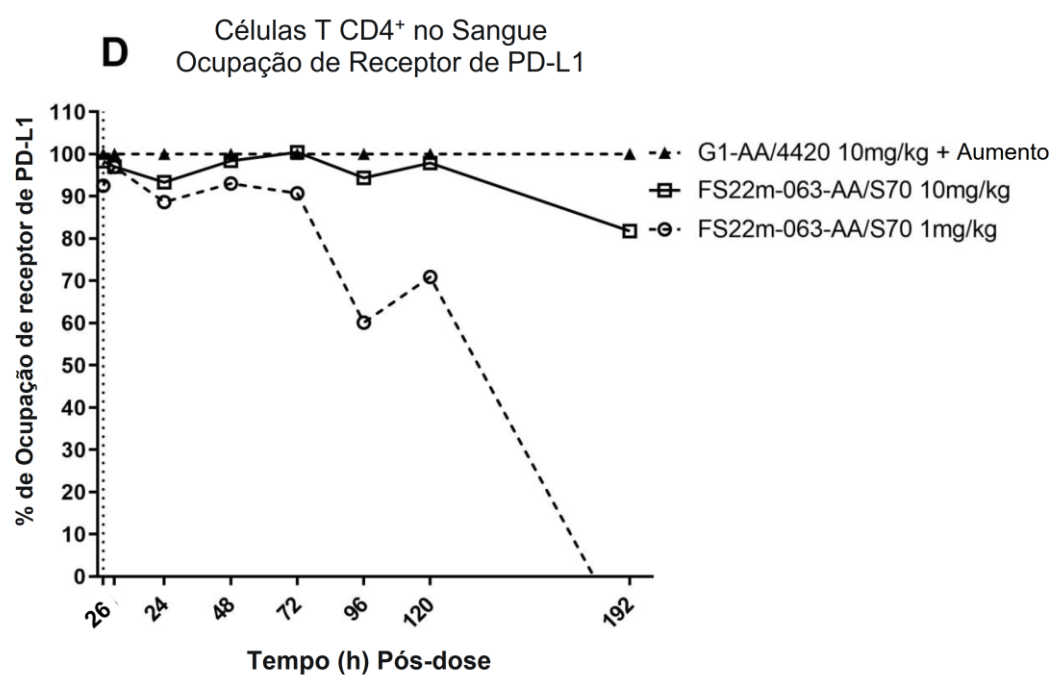
C**D**

Figura 26 continuação

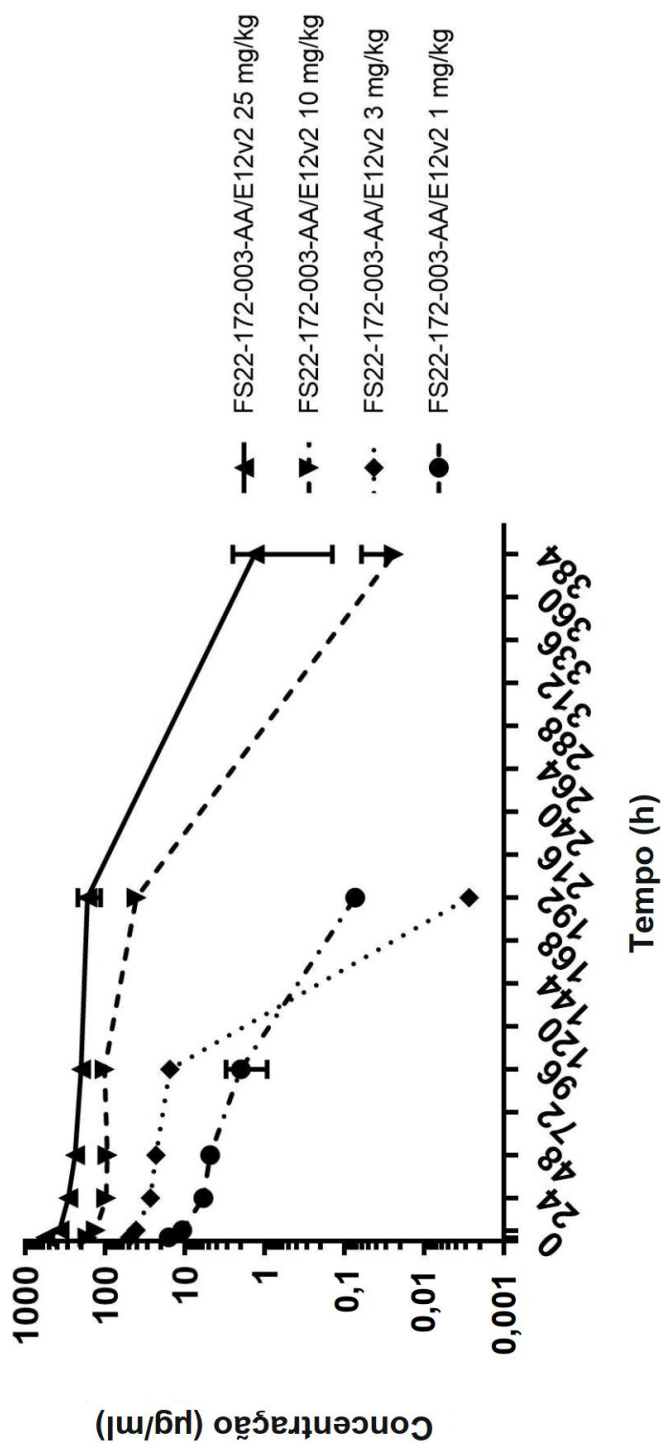


Figura 27

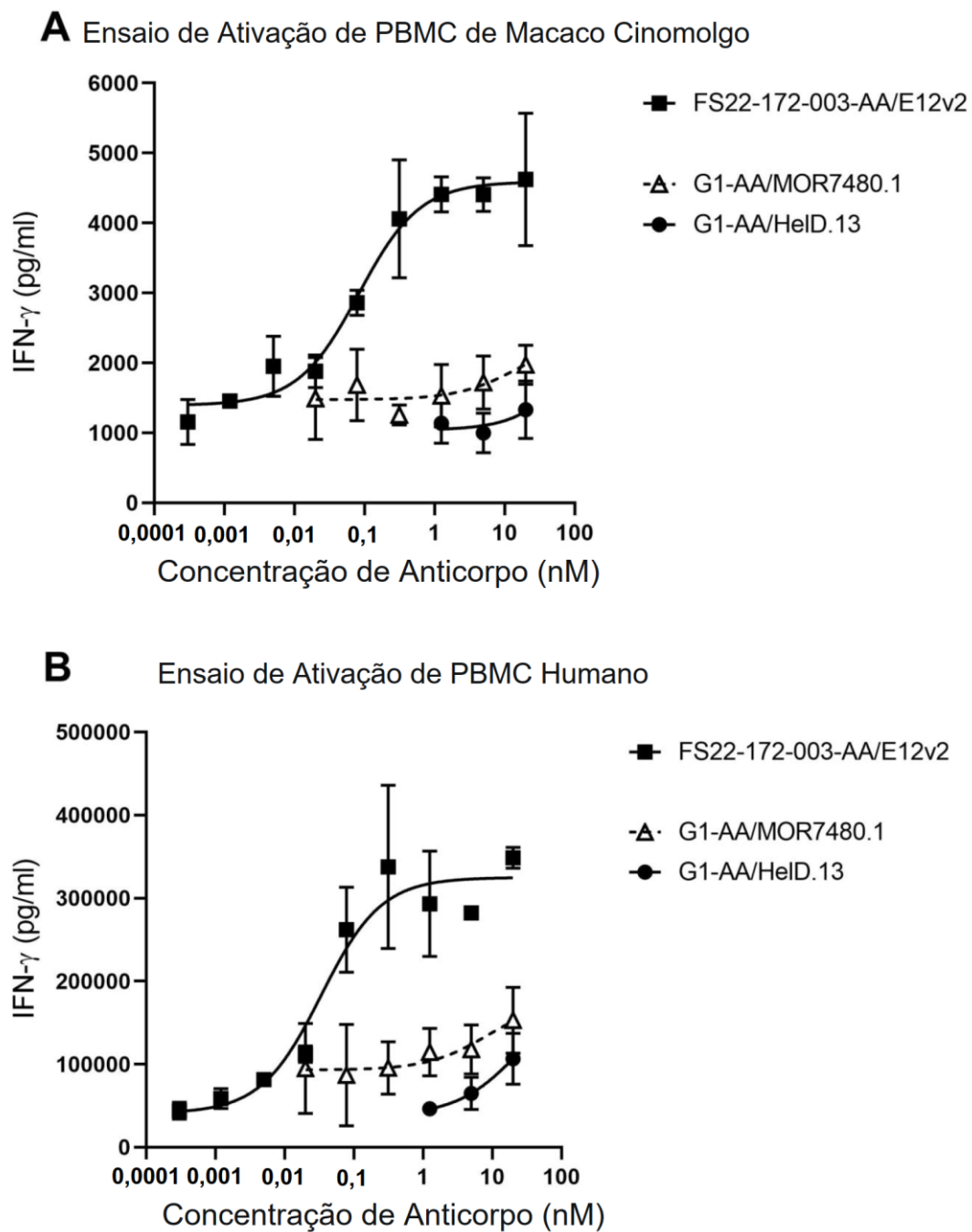


Figura 28

RESUMO**"MOLÉCULAS DE ANTICORPO QUE SE LIGAM A PD-L1 E CD137"**

O presente pedido se refere a moléculas de anticorpo que se ligam tanto a PD-L1 quanto a CD137 e são capazes de induzir agonismo de CD137. As moléculas de anticorpo compreendem um sítio de ligação com base em CDR para PD-L1, e um sítio de ligação a antígeno CD137 que está localizado em um domínio constante da molécula de anticorpo. As moléculas de anticorpo da invenção têm aplicação, por exemplo, no tratamento de doenças, como câncer.

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 Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 11/01/2021
- Hora de Geração do Código: 10:50:53
- Código de Controle:
 - Campo 1: 27398025F0024550
 - Campo 2: 286A9AA090A048FE