

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2006.06.30</b>	(73) Titular(es): <b>E. R. SQUIBB &amp; SONS, L.L.C.</b> <b>ROUTE 206 &amp; PROVINCE LINE ROAD</b> <b>PRINCETON, NJ 08540</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.07.01 US 696426 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.04.09</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2015.07.29</b> <b>198/2015</b>	(72) Inventor(es): <b>ALAN J. KORMAN</b> <b>US</b> <b>HAICHUN HUANG</b> <b>US</b> <b>CHANGYU WANG</b> <b>US</b> <b>MOHAN SRINIVASAN</b> <b>US</b> <b>MARK J. SELBY</b> <b>US</b>
	(74) Mandatário: <b>JOÃO LUÍS PEREIRA GARCIA</b> <b>RUA CASTILHO, 167 2º 1070-050 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA O LIGANDO 1 DE MORTE PROGRAMADA (PD-L1)**

(57) Resumo:

A PRESENTE DIVULGAÇÃO PROPORCIONA ANTICORPOS MONOCLONAIS ISOLADOS, PARTICULARMENTE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS QUE SE LIGAM ESPECIALMENTE A PD-L1 COM AFINIDADE ELEVADA. MOLÉCULAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM OS ANTICORPOS DA PRESENTE DIVULGAÇÃO, VETORES DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS PARA EXPRESSAR OS ANTICORPOS DA PRESENTE DIVULGAÇÃO TAMBÉM SÃO PROPORCIONADOS. IMUNOCONJUGADOS, MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO TAMBÉM SÃO PROPORCIONADOS. A DIVULGAÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA MÉTODOS PARA DETEÇÃO DE PD-L1, BEM COMO MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE VÁRIAS DOENÇAS, INCLUINDO CANCRO E DOENÇAS INFECIOSAS, UTILIZANDO ANTICORPOS ANTI-PD-L1.

## **RESUMO**

### **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA O LIGANDO 1 DE MORTE PROGRAMADA (PD-L1)**

A presente divulgação proporciona anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos que se ligam especialmente a PD-L1 com afinidade elevada. Moléculas de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da presente divulgação, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressar os anticorpos da presente divulgação também são proporcionados. Imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos da invenção também são proporcionados. A divulgação também proporciona métodos para detecção de PD-L1, bem como métodos para o tratamento de várias doenças, incluindo cancro e doenças infecciosas, utilizando anticorpos anti-PD-L1.

## DESCRIÇÃO

### ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA O LIGANDO 1 DE MORTE PROGRAMADA (PD-L1)

#### Antecedentes

Morte programada 1 (PD-1) é um membro da família de recetores CD28, que inclui CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, e BTLA. Os membros iniciais da família, CD28 e ICOS, foram descobertos através do efeito funcional no aumento da proliferação de células T após a adição de anticorpos monoclonais (Hutloff *et al.*, (1999) *Nature* 397:263266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenics* 10:247-260). Dois ligandos da superfície celular para PD-1 foram identificados, PD-L1 e PD-L2, e foi demonstrado que regulam a ativação de células T e a secreção de citocinas após a ligação a PD-1 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43; Ohigashi *et al.* (2005) *Clin Cancer Res* 11:294753). Ambos PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC) são homólogos de B7 que se ligam a PD-1, mas que não se ligam a outros membros da família CD28 (Blank *et al.* (2004). Também foi mostrado que a expressão de PD-L1 na superfície celular é regulada positivamente através da estimulação de IFN- $\gamma$ .

A expressão de PD-L1 foi verificada em vários cancros murinos e humanos, incluindo carcinoma pulmonar, ovárico e do cólon humano e vários mielomas (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi *et al.* (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). Foi sugerido que o PD-L1 desempenha um papel na imunidade tumoral através do aumento da apoptose de clones de células T específicos de antígeno (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:793-800). Também foi sugerido que o PD-L1 pode estar envolvido na inflamação da mucosa intestinal e a inibição do PD-L1 suprime a doença debilitante associada

com colite (Kanai *et al.* (2003) *J Immunol* 171:4156-63).

Koga *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:2057-2062, 2004 relata que o bloqueio da interação entre PD-1 e PD-L1 acelera a doença arterial por enxerto nos aloenxertos cardíacos. Blank *et al.*, *Cancer Research* 64, 1140-1145, 2004 relata que PD-L1/B7H-1 inibe a fase efetora da rejeição tumoral através de células T CD8+ transgênicas de Recetor de Células T (TCR).

O documento EP1537878 A1 refere-se a composições imunopotenciadoras que compreendem um inibidor de sinal imunossupressor de PD-1, PD-L1 ou PD-L2. O inibidor pode ser um anticorpo.

Barber *et al.* *Nature* 439, 682-687, 2006 descreve o restauro da função em células T CD8 exaustas durante a infecção viral crônica. A administração *in vivo* de anticorpos que bloqueiam a interação entre PD-1 e PD-L1 potenciaram as respostas de células T. Brown *et al.*, *J. Immunol.* 170(3), 1257-1266 relata que o bloqueio de ligandos de PD-1 nas células dendríticas potencia a ativação de células T e produção de citocinas.

### **Sumário**

A presente invenção proporciona anticorpos monoclonais isolados, em particular anticorpos monoclonais humanos que se ligam a PD-L1 e exibem numerosas propriedades desejáveis. Estas propriedades incluem uma ligação de alta afinidade a PD-L1 humano. Ainda adicionalmente, foi demonstrado que os anticorpos da invenção aumentam a proliferação de células T, secreção de IFN- $\gamma$ , e secreção de IL-2 numa reação linfocitária mista.

Consequentemente, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:22;

- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:32;
- (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:42;
- (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 52;
- (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:62; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:72.

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

Em formas de realização particulares, o anticorpo liga-se a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M ou menos, liga-se a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos, liga-se a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M ou menos, liga-se a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M ou menos, ou liga-se a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de entre  $1 \times 10^{-8}$  M e  $1 \times 10^{-10}$  M.

Numa forma de realização preferida, os anticorpos compreendem adicionalmente pelo menos uma das seguintes propriedades:

- (a) o anticorpo aumenta a proliferação de células T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (b) o anticorpo aumenta a produção de interferon- $\gamma$  num ensaio de MLR; ou
- (c) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 num ensaio de MLR.

Um anticorpo preferido da invenção, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, compreende:

- (a) uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2;
- e
- (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12.

Os anticorpos podem ser, por exemplo, anticorpos de comprimento completo, por exemplo de um isotipo IgG1 ou IgG4. Alternativamente, os anticorpos podem ser fragmentos de anticorpos, tais como fragmentos Fab ou Fab'2, ou anticorpos de cadeia curta.

A invenção também proporciona um imunocombinado que compreende um anticorpo monoclonal da invenção, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, ligado a um agente terapêutico, tal como uma citotoxina ou um isótopo radioativo. A invenção também proporciona uma molécula biespecífica que compreende um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, da invenção, ligado a uma segunda fração funcional tendo uma especificidade diferente do que o dito anticorpo, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo.

Composições que compreendem um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, ou imunocombinado ou molécula biespecífica da invenção e um portador farmacologicamente aceitável também são proporcionados.

Moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos, ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, da invenção estão também englobadas pela presente invenção, bem como vetores de expressão que compreendem tais moléculas de ácido nucleico e células hospedeiras que compreendem tais vetores de expressão. Além disso, a invenção proporciona um ratinho transgênico que compreende transgenes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina

humana, em que o ratinho expressa um anticorpo monoclonal da invenção, bem como hibridomas preparados a partir de tal ratinho, em que o hibridoma produz o anticorpo da invenção.

Ainda noutro aspeto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção para utilização num método de modulação de uma resposta imunitária num sujeito. Preferivelmente, o anticorpo da invenção potencia, estimula ou aumenta a resposta imunitária no sujeito.

Num aspeto adicional, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção para utilização num método de inibição do crescimento de células tumorais num sujeito. Outros anticorpos anti-PD-L1 podem ser utilizados em combinação com um anticorpo anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, um anticorpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado ou completamente humano pode ser utilizado no método de inibição do crescimento tumoral.

Num aspeto adicional, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção para utilização num método de tratamento de uma doença infecciosa num sujeito. Outros anticorpos anti-PD-L1 podem ser utilizados em combinação com um anticorpo anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, um anticorpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado ou completamente humano pode ser utilizado no método de tratamento de uma doença infecciosa.

Ainda adicionalmente, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção e um antigénio para utilização num método de potenciação de uma resposta imunitária contra um antigénio num sujeito. O antigénio pode ser, por exemplo, um antigénio tumoral, um antigénio viral, um antigénio bacteriano ou um antigénio a partir de um agente patogénico. Outros anticorpos anti-PD-L1 podem ser

utilizados em combinação com um anticorpo anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, um anticorpo anti-PD-L1 quimérico, humanizado ou completamente humano pode ser utilizado no método de potenciação de uma resposta imunitária contra um antígeno num sujeito.

#### **Breve Descrição dos Desenhos**

A Figura 4a mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:81) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:1) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 3G10. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:31) e CDR3 (SEQ ID NO:41) estão delineadas e as derivações da linha germinal V, D e J estão indicadas.

A Figura 4a mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:91) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:11) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 3G10. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:61) e CDR3 (SEQ ID NO:71) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 2A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:82) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:2) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 12A4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:22), CDR2 (SEQ ID NO:32) e CDR3 (SEQ ID NO:42) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 2B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:92) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:12) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12A4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:52), CDR2 (SEQ ID NO:62) e CDR3 (SEQ ID NO:72) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 3A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:83) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:3) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 10A5. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:23), CDR2 (SEQ ID NO:33) e CDR3 (SEQ ID NO:43) estão delineadas e as derivações de

linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 3B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:93) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano IOA5. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:53), CDR2 (SEQ ID NO:63) e CDR3 (SEQ ID NO:73) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 4A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:84) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:4) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 5F8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:24), CDR2 (SEQ ID NO:34) e CDR3 (SEQ ID NO:44) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 4B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:94) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 5F8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:64) e CDR3 (SEQ ID NO:74) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 5A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:85) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:5) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 10H10. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:25), CDR2 (SEQ ID NO:35) e CDR3 (SEQ ID NO:45) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 5B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:95) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:15) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 10H10. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:55), CDR2 (SEQ ID NO:65) e CDR3 (SEQ ID NO:75) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 6A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:86) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:6) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 1B12. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:26), CDR2 (SEQ ID NO:36)

e CDR3 (SEQ ID NO:46) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 6B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:96) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:16) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 1B12. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:56), CDR2 (SEQ ID NO:66) e CDR3 (SEQ ID NO:76) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 7A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:87) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:7) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 7H1. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:27), CDR2 (SEQ ID NO:37) e CDR3 (SEQ ID NO:47) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 7B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:97) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 7H1. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:57), CDR2 (SEQ ID NO:67) e CDR3 (SEQ ID NO:77) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 8A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:88) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:8) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 11 E6. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:38) e CDR3 (SEQ ID NO:48) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 8B mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:98) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 11 E6. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:58), CDR2 (SEQ ID NO:68) e CDR3 (SEQ ID NO:78) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 9A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:89) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:9) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano

12B7. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:29), CDR2 (SEQ ID NO:39) e CDR3 (SEQ ID NO:49) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 9B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:99) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:19) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 12B7. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:59), CDR2 (SEQ ID NO:69) e CDR3 (SEQ ID NO:79) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 10A mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:90) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:10) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 13G4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:40) e CDR3 (SEQ ID NO:50) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 10B mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:100) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:20) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 13G4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:60), CDR2 (SEQ ID NO:70) e CDR3 (SEQ ID NO: 80) estão delineadas e as derivações de linha germinal V e J estão indicadas.

A Figura 11 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 3G10 (SEQ ID NO:1) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-18 de linha germinal humana (SEQ ID:101).

A Figura 12 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12A4 (SEQ ID NO:2) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-69 de linha germinal humana (SEQ ID:102).

A Figura 13 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 10A5 (SEQ ID NO:3) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-3 de linha germinal humana (SEQ ID:103).

A Figura 14 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 5F8

(SEQ ID NO:4) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-69 de linha germinal humana (SEQ ID:102).

A Figura 15 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 10H10 (SEQ ID NO:5) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 3-9 de linha germinal humana (SEQ ID:104).

A Figura 16 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 1 B12 (SEQ ID NO:6) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-69 de linha germinal humana (SEQ ID:102).

A Figura 17 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 7H1 (SEQ ID NO:7) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-69 de linha germinal humana (SEQ ID:102).

A Figura 18 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 11 E6 (SEQ ID NO:8) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-69 de linha germinal humana (SEQ ID:102).

A Figura 19 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12B7 (SEQ ID NO:9) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 1-69 de linha germinal humana (SEQ ID:102).

A Figura 20 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 13G4 (SEQ ID NO: 10) com a sequência de aminoácidos V<sub>H</sub> 3-9 de linha germinal humana (SEQ ID NO:104).

A Figura 21 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 3G10 (SEQ ID NO:11) com a sequência de aminoácidos V<sub>k</sub> L6 de linha germinal humana (SEQ ID:105).

A Figura 22 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12A4 (SEQ ID NO:12) com a sequência de aminoácidos V<sub>k</sub> L6 de linha germinal humana (SEQ ID:105).

A Figura 23 mostra o alinhamento da sequência de

aminoácidos da região variável de cadeia leve de 10A5 (SEQ ID NO:13) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  L15 de linha germinal humana (SEQ ID:106).

A Figura 24 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 5F8 (SEQ ID NO:14) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  A27 de linha germinal humana (SEQ ID:107).

A Figura 25 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 10H10 (SEQ ID NO:15) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  L15 de linha germinal humana (SEQ ID:106).

A Figura 26 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 1 B12 (SEQ ID NO:16) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  L6 de linha germinal humana (SEQ ID:105).

A Figura 27 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 7H1 (SEQ ID NO: 17) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  L6 de linha germinal humana (SEQ ID NO:105).

A Figura 28 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 11 E6 (SEQ ID NO:18) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  A27 de linha germinal humana (SEQ ID:107).

A Figura 29 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 11 E6a (SEQ ID NO:109) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  A27 de linha germinal humana (SEQ ID:107).

A Figura 30 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12B7 (SEQ ID NO:19) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  L6 de linha germinal humana (SEQ ID:105).

A Figura 31 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 13G4 (SEQ ID NO:20) com a sequência de aminoácidos  $V_k$  L18 de linha germinal humana (SEQ ID:108).

As Figuras 32A-C mostram os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5, e 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, se ligam à superfície celular em células CHO transfetadas com PD-L1 humano de comprimento completo. (A) Gráfico de citometria de fluxo para 3G10 (B) Gráfico de citometria de fluxo para 10A5 (C) Gráfico de citometria de fluxo para 12A4.

A Figura 33 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5, e 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, se ligam à superfície celular em células CHO transfetadas com PD-L1 humano de comprimento completo de uma forma dependente da concentração.

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

A Figura 35 mostra os resultados de experiências demonstrando a titulação de HuMab em células T CD4+ humanas estimuladas. A Figura 36 mostra os resultados de experiências demonstrando a titulação de HuMab em PMBC de cinomolgo estimuladas. As Figuras 37A-C mostram os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5, e 12A4, dirigidos contra PD-L1 humano, se ligam a PD-L1 na superfície celular de células T ativadas. (A) Gráfico de citometria de fluxo para 3G10 (B) Gráfico de citometria de fluxo para 10A5 (C) Gráfico de citometria de fluxo para 12A4. A Figura 38 demonstra a ligação de HuMabs a células ES-2.

As Figuras 39A-D mostram os resultados de experiências demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos contra PD-L1 humano promovem a proliferação de células T, secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2 num ensaio de reação linfocítica

mista. A Figura 39A é um gráfico de barras mostrando a proliferação dependente da concentração de células T utilizando o HuMab 10A5; A Figura 39B é um gráfico de barras mostrando a secreção dependente da concentração de IFN- $\gamma$  utilizando o HuMab 10A5; A Figura 39C é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN- $\gamma$  utilizando os HuMAbs 3G10 e 12A4; A Figura 39D é um gráfico de barras mostrando a secreção dependente da concentração de IL-2 utilizando o HuMab 10A5.

A Figura 40 demonstra o efeito do anticorpo humano anti-PD-L1 na proliferação e secreção de IFN- $\gamma$  no MLR utilizando células T (células T efetoras CD4+) e células dendríticas alogêneas.

As Figuras 41A-B mostram os resultados de experiências demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos contra PD-L1 humano promovem a proliferação de células T e secreção de IFN- $\gamma$  em MLR contendo células T reguladoras. A Figura 41A é um gráfico de barras mostrando a proliferação dependente da concentração de células T utilizando o HuMab 10A5; A Figura 41B é um gráfico de barras mostrando a secreção dependente da concentração de IFN- $\gamma$  utilizando o HuMab 10A5.

A Figura 42 demonstra os resultados de anticorpos anti-PD-L1 na proliferação celular numa Reação Linfocítica Mista na presença de células T reguladoras.

A Figura 43 demonstra os resultados de anticorpos anti-PD-L1 na produção de citocinas numa Reação Linfocítica Mista na presença de células T reguladoras.

A Figura 44 demonstra os resultados de anticorpos anti-PD-L1 em secreção de IFN- $\gamma$  de PBMC humanas estimuladas com lisado de CMV. A Figura 45 mostra os resultados de experiências de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais contra o PD-L1 humano bloqueiam a ligação de PD-L1 a células CHO transfetadas expressando PD-L1.

A Figura 46 mostra que os anticorpos anti-PD-L1 bloqueiam a ligação PD-L1 a células ES-2 tratadas com IFN- $\gamma$ .

A Figura 47 mostra o efeito de anticorpos anti-PD-L1 no crescimento tumoral *in vivo*.

### **Descrição Detalhada**

Num aspeto, a presente divulgação refere-se a anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente a PD-L1. Em determinadas formas de realização, os anticorpos da invenção exibem um ou mais propriedades funcionais desejáveis, tais como ligação de alta afinidade a PD-L1, a capacidade de aumentar a proliferação de células T, secreção de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2 em reações linfocíticas mistas, a capacidade para inibir a ligação de PD-L1 ao recetor de PD-L1, a capacidade de estimular respostas de anticorpos e/ou a capacidade para inverter a função supressora de células T reguladoras. Adicionalmente ou alternativamente, os anticorpos da invenção são derivados a partir de sequências da linha germinal de cadeia pesada e leve particulares e/ou compreendem características estruturais particulares tais como regiões CDR que compreendem sequências de aminoácidos particulares.

A presente divulgação proporciona, por exemplo, anticorpos isolados, métodos de fabrico de tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas que compreendem tais anticorpos e composições farmacêuticas contendo os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção.

Os anticorpos anti-PD-L1 podem ser utilizados para inibir o crescimento de células tumorais num sujeito, para modificar uma resposta imunitária, bem como para tratar doenças tais como cancro ou doença infecciosa, ou para estimular uma resposta imunitária protetora ou para estimular respostas imunitárias específicas de antígeno (por exemplo, através da coadministração de anti-PD-L1 com

um antígeno de interesse).

De modo a que a presente divulgação seja mais prontamente compreendida, determinados termos são primeiramente definidos. Definições adicionais são estabelecidas ao longo da descrição detalhada. O termo "resposta imunitária" refere-se à ação de, por exemplo, linfócitos, células apresentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulócitos e macromoléculas solúveis produzidas pelas células anteriores ou pelo fígado (incluindo anticorpos, citocinas, e complemento) que resulta no dano seletivo a, destruição de, ou eliminação do corpo humano de agentes patogénicos invasores, células ou tecidos infetados com agentes patogénicos, células cancerosas, ou, nos casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células ou tecidos humanos normais.

Uma "via de transdução de sinal" refere-se à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal a partir de uma porção até outra porção de uma célula. Conforme utilizado no presente documento, a frase "recetor de superfície celular" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão de tal sinal através de uma membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "recetor de superfície celular" da presente invenção é o recetor PD-L1.

O termo "anticorpo" conforme referido no presente documento, inclui anticorpos completos e qualquer fragmento de ligação a antígeno (isto é, "porção de ligação a antígeno") ou cadeias simples dos mesmos. Um "anticorpo" refere-se a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações de dissulfeto, ou uma porção de ligação a antígeno da mesma. Cada cadeia pesada está compreendida por uma região variável de cadeia pesada (abreviada no presente documento como  $V_H$ ) e uma região

constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada está compreendida por três domínios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ . Cada cadeia leve está compreendida por uma região variável de cadeia pesada (abreviada no presente documento como  $V_d$ ) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve está compreendida por um domínio,  $C_L$ . As regiões  $V_H$  e  $V_L$  podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada  $V_H$  e  $V_L$  está composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas desde o término amino até ao término carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunitário (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema do complemento clássico.

O termo "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), conforme utilizado no presente documento, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligarem especificamente a um antígeno (por exemplo, PD-L1). Foi demonstrado que a função de ligação a antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento completo. Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro do termo "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  e  $C_H$ ; (ii) um fragmento  $F(ab')_2$ , um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd consistindo dos domínios  $V_H$  e  $C_H$ ; (iv) um fragmento Fv que

consiste nos domínios  $V_L$  e  $V_H$  de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste num domínio  $V_H$ ; e (vi) uma região de determinação de complementaridade (CDR) isolada. Além disso, embora os dois fragmentos do fragmento Fv,  $V_L$  e  $V_H$ , sejam codificados por genes diferentes, eles podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, através de um ligante sintético que lhes permite serem feitos como uma cadeia de proteína simples na qual as regiões  $V_L$  e  $V_H$  se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); veja-se, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples também se destinam a ser englobados dentro do termo "porção de ligação a antigénio" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpos são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas para aqueles peritos na especialidade, e os fragmentos são rastreados em relação à utilidade da mesma forma que os anticorpos intactos.

Um anticorpo "isolado", conforme utilizado no presente documento, destina-se a referir-se a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos tendo diferentes especificidades antigénicas (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-L1 é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antigénios que não sejam PD-L1). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-L1 pode, no entanto, possuir reatividade cruzada com outros antigénios, tais como moléculas de PD-L1 a partir de outras espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente livre de outro material celular e/ou químicos.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme utilizados no presente

documento, referem-se a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal apresenta uma única especificidade e afinidade de ligação para um epítipo particular.

O termo "anticorpo humano", conforme utilizado no presente documento, destina-se a incluir anticorpos tendo regiões variáveis nas quais ambas as regiões CDR e estruturais são derivadas a partir de sequências de imunoglobulinas de linha germinativa humana. Além disso, se o anticorpo contém uma região constante, a região constante também é derivada a partir de sequências de imunoglobulinas de linha germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulinas de linha germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*, Contudo, o termo "anticorpo humano", conforme utilizado no presente documento, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências CDR derivadas a partir da linha germinal de outra espécie de mamífero, tal como um ratinho, tenham sido enxertadas em sequências estruturais humanas.

O termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos que apresentam uma única especificidade de ligação que têm regiões variáveis nas quais ambas as regiões CDR e estruturais são derivadas a partir de sequências de imunoglobulinas de linha germinal humana. Numa forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal não humano transgênico, por exemplo, um ratinho transgênico, tendo um genoma que compreende um transgene de cadeia pesada e um transgene de cadeia leve fusionado a uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo humano recombinante", conforme utilizado no presente documento, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados

através de meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um ratinho) que é transgênico ou transcrômossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir do mesmo (descrito mais abaixo), (b) anticorpos isolados a partir de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo humano, por exemplo, a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpos humanos recombinante, combinatória, e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados através de quaisquer outros meios que envolvem *splicing* de sequências gênicas de imunoglobulina humana para outras sequências de ADN. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis nas quais as regiões CDR e estruturais são derivadas a partir de sequências de imunoglobulinas de linha germinativa humana. Em determinadas formas de realização, no entanto, tais anticorpos recombinantes podem ser submetidos a mutagenese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humana é utilizado, mutagenese somática *in vivo*) e, portanto, as sequências de aminoácidos das regiões V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> dos anticorpos recombinantes são sequências que, enquanto são derivadas a partir de e relacionadas com sequências de V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de linha germinal humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinal de anticorpos humanos *in vivo*. Conforme utilizado no presente documento, "isotopo" refere-se à classe do anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificada pelos genes de região constante de cadeia pesada.

As frases "um anticorpo que reconhece um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são utilizadas indistintamente no presente documento como termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno".

O termo "derivado de anticorpo humano" refere-se a qualquer forma modificada do anticorpo humano, por exemplo,

um conjugado do anticorpo e outro agente ou anticorpo.

O termo "anticorpo humanizado" destina-se a referir-se a anticorpos nos quais as sequências CDR derivadas a partir da linha germinal de outra espécie de mamífero, tal como um ratinho, tenham sido enxertadas em sequências estruturais humanas. Modificações adicionais das regiões estruturais podem ser feitas dentro das sequências estruturais humanas.

O termo "anticorpo quimérico" destina-se a referir-se a anticorpos nos quais as sequências de região variável são derivadas a partir de uma espécie e as sequências de região constante são derivadas a partir de outra espécie, tal como um anticorpo no qual as sequências de região variável são derivadas a partir de um anticorpo de ratinho e as sequências de região constante são derivadas a partir de um anticorpo humano.

Conforme utilizado no presente documento, um anticorpo que "se liga especificamente a PD-L1 humano" destina-se a referir-se a um anticorpo que se liga a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M ou menos, mais preferivelmente  $5 \times 10^{-8}$  M ou menos, mais preferivelmente  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos, mais preferivelmente  $5 \times 10^{-9}$  M ou menos, ainda mais preferivelmente entre  $1 \times 10^{-8}$  M e  $1 \times 10^{-10}$  M ou menos.

O termo " $K_{assoc}$ " ou " $K_a$ ", conforme utilizado no presente documento, destina-se a referir-se à taxa de associação de uma interação de anticorpo-antígeno particular, enquanto o termo " $K_{dis}$ " ou " $K_d$ ", conforme utilizado no presente documento, destina-se a referir-se à taxa de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. O termo " $K_D$ ," conforme utilizado no presente documento, destina-se a referir-se à constante de dissociação, que é obtida a partir da razão de  $K_d$  para  $K_a$  (isto é,  $K_d/K_a$ ) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores de  $K_D$  para anticorpos podem ser determinados utilizando métodos bem estabelecidos na técnica. Um método preferido para a determinação da  $K_D$  de um anticorpo é através da utilização

de ressonância de plasmón de superfície, preferivelmente utilizando um sistema biossensor tal como um sistema Biacore®.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "alta afinidade" para um anticorpo IgG refere-se a um anticorpo tendo uma  $K_D$  de  $10^{-8}$  M ou menos, mais preferivelmente  $10^{-9}$  M ou menos e ainda mais preferivelmente  $10^{-10}$  M ou menos para um antígeno alvo. Contudo, ligação de "alta afinidade" pode variar para outros isotipos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "alta afinidade" para um isotipo de IgM refere-se a um anticorpo tendo uma  $K_D$  de  $10^{-7}$  M ou menos, mais preferivelmente  $10^{-8}$  M ou menos, ainda mais preferivelmente  $10^{-9}$  M ou menos.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "sujeito" inclui um animal humano ou não humano. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, *por exemplo*, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

Vários aspetos da divulgação são descritos em maior detalhe nas seguintes subsecções.

#### Anticorpos Anti-PD-L1

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

- (a) liga-se a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M ou menos;
- (b) aumenta a proliferação de células T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (c) aumenta a produção de interferão- $\gamma$  num ensaio de MLR;

- (c) aumenta a secreção de IL-2 num ensaio de MLR;
- (e) estimula respostas de anticorpos; e/ou
- (f) inverte o efeito de células T reguladoras em células T efectoras e/ou células dendríticas.

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

Ensaio padrão para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos para PD-L1 são conhecidos na técnica, incluindo por exemplo, ELISAs, Western blots e RIAs. Ensaio adequado são descritos em detalhe nos Exemplos. A cinética de ligação (por exemplo, afinidade de ligação) dos anticorpos também pode ser avaliada através de ensaios padrão conhecidos na técnica, tal como análise Biacore®.

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

Um anticorpo preferido da invenção é o anticorpo monoclonal humano 12A4. Este anticorpo e os anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7R1, 11E6, 12B7 e 13G4 que não formam parte da invenção foram isolados e caracterizados estruturalmente conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. As sequências de aminoácidos VH de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1 B12, 7H1, 11 E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10, respetivamente. As sequências de aminoácidos VL de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, e 20, respetivamente.

Uma combinação de cadeia pesada e leve preferida de um anticorpo monoclonal, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção é (a) uma região variável de cadeia

pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2; e (b) uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:12.

São portanto divulgados anticorpos que compreendem as CDR1s, CDR2s e CDR3s de cadeia leve e cadeia pesada de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4, ou combinações dos mesmos. As sequências de aminoácidos das CDR1s de  $V_H$  de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR2s de  $V_H$  de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, e 40, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR3s de  $V_H$  de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, e 50, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR1s de  $V_K$  de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, e 60, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR2s de  $V_K$  de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, e 70, respectivamente. As sequências de aminoácidos das CDR3s de  $V_K$  de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 são mostradas nas SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, e 80, respectivamente. As regiões CDR são delineadas utilizando o sistema de Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH N.º 91-3242).

Em adição aos anticorpos de acordo com a invenção, portanto, também são divulgados anticorpos que se ligam especificamente a PD-L1, preferivelmente PD-L1 humano, e

que compreendem:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:21;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:31;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:41;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:51;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:61; e
  - (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:71;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:23;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:33;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:43;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:53;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:63; e
  - (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:73;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:24;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:34;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:44;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:54;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:64; e

- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:74;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:25;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:35;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:45;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:55;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:65; e
  - (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:75;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:26;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:36;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:46;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:56;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:66; e
  - (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:76;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:27;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:37;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:47;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:57;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que

- compreende a SEQ ID NO:67; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:77;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:28;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:38;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:48;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:58;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:68; e
  - (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:78;
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:29;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:39;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:49;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:59;
  - (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:69; e
  - (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:79; e
- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:30;
  - (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:40;
  - (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO:50;
  - (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:60;

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

(f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO:80.

#### Anticorpos que têm Sequências de Linha Germinal Particulares

Em determinadas formas de realização, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada a partir de um gene de imunoglobulina de cadeia pesada de linha germinal particular e/ou uma região variável de cadeia leve a partir de um gene de imunoglobulina de cadeia leve de linha germinal particular. Além disso, é divulgado no presente documento um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a PD-L1 e que compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_H$  1-18 humano, uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_H$  1-69 humano, uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_H$  1-3 humano, uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_H$  3-9 humano, uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_K$  L6 humano, uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_K$  L15 humano, uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_K$  A27 humano, ou uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_K$  L18 humano.

É divulgado um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo:

(a) compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_H$  1-18, 1-69, 1-3 ou 3-9 humano (que codifica as sequências de

aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs:101, 102, 103 e 104, respetivamente);

(b) compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto de, ou é derivada a partir de, um gene  $V_K$  L6, L15, A27 ou L18 (que codifica as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs:105, 106, 107 e 108, respetivamente); e

(c) se liga especificamente a PD-L1, preferivelmente PD-L1 humano.

Um exemplo de um anticorpo tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  1-18 e  $V_K$  L6, respetivamente, é 3G10. Exemplos de anticorpos tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  1-69 e  $V_K$  L6, respetivamente, 12A4, 1B12, 7H1, e 12B7. Um exemplo de um anticorpo tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  1-3 e  $V_K$  L15, respetivamente, é 10A5. Exemplos de anticorpos tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  1-69 e  $V_K$  A27, respetivamente, são 5F8, 11E6 e 11E6a. Um exemplo de um anticorpo tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  3-9 e  $V_K$  L15, respetivamente, é 10H10. Um exemplo de um anticorpo tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  1-3 e  $V_K$  L15, respetivamente, é 10A5. Um exemplo de um anticorpo tendo  $V_H$  e  $V_K$  de  $V_H$  3-9 e  $V_K$  L18, respetivamente, é 13G4.

Conforme utilizado no presente documento, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que são "o produto de ou "derivadas a partir de" uma sequência de linha germinal particular se as regiões variáveis do anticorpo são obtidas a partir de um sistema que utiliza genes de imunoglobulina de linha germinal humana. Tais sistemas incluem a imunização de um ratinho transgénico que carrega genes de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou rastreio de uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana apresentada em fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado a partir de" uma sequência de imunoglobulina de linha germinal humana pode identificado como tal através da comparação da sequência de aminoácidos do anticorpo humano com as sequências de aminoácidos das

imunoglobulinas de linha germinal humana e selecionando a sequência de imunoglobulina de linha germinal humana que é mais próxima em sequência (isto é, com maior % de identidade) à sequência do anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado a partir de" uma sequência de imunoglobulina de linha germinal humana particular pode conter diferenças de aminoácidos quando comparado com a sequência da linha germinal, devido a, por exemplo, mutações somáticas de ocorrência natural ou introdução intencional de mutação sítio-dirigida. Contudo, um anticorpo humano selecionado é geralmente pelo menos 90% idêntico na sequência de aminoácidos com uma sequência de aminoácidos codificada por um gene de imunoglobulina de linha germinal humana e contém resíduos de aminoácidos que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as sequências de aminoácidos de imunoglobulina de linha germinal de outras espécies (por exemplo, sequências de linha germinal murina). Em determinados casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95%, ou mesmo pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntico na sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal. Em determinadas formas de realização, um anticorpo humano derivado a partir de uma sequência de linha germinal humana particular irá exibir não mais do que 10 diferenças de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal humana. Em determinadas outras formas de realização, o anticorpo humano pode exibir não mais do que 5, ou mesmo não mais do que 4, 3, 2, ou 1 diferença de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos codificada pelo gene de imunoglobulina de linha germinal.

#### Anticorpos homólogos

Ainda noutra forma de realização, um anticorpo da invenção compreende regiões variáveis de cadeia pesada e

leve que compreendem sequências que são homólogas às sequências de aminoácidos dos anticorpos preferidos descritos no presente documento, e em que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-PD-L1 da invenção.

Por exemplo, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que:

- (a) a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- (b) a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:12;
- (c) o anticorpo se liga a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M ou menos;
- (d) o anticorpo aumenta a proliferação de células T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (e) o anticorpo aumenta a produção de interferão- $\gamma$  num ensaio de MLR;
- (f) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 num ensaio de MLR,
- (g) o anticorpo estimula respostas de anticorpos; e
- (h) inverte o efeito de células T reguladoras em células T efectoras e/ou células dendríticas.

Noutras formas de realização, as sequências de aminoácidos de  $V_H$  e/ou  $V_L$  podem ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogas às sequências estabelecidas acima. Um anticorpo tendo regiões  $V_H$  e  $V_L$  tendo alta homologia (isto é, 80% ou mais) com as regiões  $V_H$  e  $V_L$  das sequências estabelecidas acima, pode ser obtido por mutagénese (por exemplo, mutagénese sítio-dirigida ou mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codificam as SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 29, e 30, seguida

por testagem do anticorpo alterado codificado em relação à função retida (isto é, a funções estabelecidas em (c) a (h) acima) utilizando os ensaios funcionais descritos no presente documento.

Conforme utilizado no presente documento, a percentagem de homologia entre as duas sequências de aminoácidos é equivalente à percentagem de identidade entre as duas sequências. A percentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (isto é, % homologia =  $n.^{\circ}$  de posições idênticas/ $n.^{\circ}$  total de posições  $\times 100$ ), tomando em conta o número de lacunas, e o comprimento de cada lacuna, que têm de ser introduzidas para um alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação de sequências e determinação da percentagem de identidade entre as duas sequências pode ser alcançada utilizando um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos não limitantes abaixo.

A percentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), utilizando um quadro de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Adicionalmente, a percentagem de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em [www.gcg.com](http://www.gcg.com)) utilizando uma matriz Blossom 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

Em determinadas instâncias, as sequências proteicas da presente divulgação podem ser adicionalmente utilizadas como uma "sequência de busca" para realizar uma pesquisa em

bases de dados públicas para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Tais pesquisas podem ser realizadas utilizando o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. As pesquisas de proteínas BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de anticorpo da presente invenção. Para obter alinhamentos com lacunas para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado conforme descrito em Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Quando se utilizam os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros predefinidos dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser utilizados. Veja-se [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

#### Anticorpos Manipulados e Modificados

Um anticorpo da invenção pode ser adicionalmente preparado utilizando um anticorpo tendo uma ou mais das sequências de  $V_H$  e/ou  $V_L$  divulgadas no presente documento como material de partida para manipular um anticorpo modificado, anticorpo modificado o qual pode ter propriedades alteradas em relação ao anticorpo de partida. Um anticorpo pode ser manipulado modificando um ou mais resíduos dentro de uma ou ambas as regiões variáveis (isto é,  $V_H$  e/ou  $V_L$ , por exemplo dentro de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões estruturais. Adicionalmente ou alternativamente, um anticorpo pode ser manipulado modificando resíduos dentro da(s) região(ões) constante(s), por exemplo para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo.

Um tipo de manipulação de região variável que pode ser realizada é o enxerto de CDR. Os anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada e leve. Por este motivo, as sequências de aminoácidos dentro

das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que as sequências fora das CDRs. Uma vez que as sequências CDR são responsáveis pela maioria das interações de anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitam as propriedades de anticorpos de ocorrência natural específicos através da construção de vetores de expressão que incluem sequências CDR a partir do anticorpo de ocorrência natural específico enxertado em sequências estruturais a partir de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (veja-se, por exemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 86:10029-10033; documento de Patente U.S. N.º 5.225.539 para Winter, e documentos de Patente U.S. N.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al.)

Consequentemente, outra forma de realização da invenção refere-se a um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo sequências CDR1, CDR2, e CDR3 que compreendem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:32, e SEQ ID NO:42, respectivamente, e uma região variável de cadeia leve compreendendo sequências CDR1, CDR2, e CDR3 que compreendem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:62, e SEQ ID NO:72, respectivamente. Assim, tais anticorpos contêm as sequências de CDR de  $V_H$  e  $V_L$  do anticorpo monoclonal 12A4 mas podem conter sequências estruturais diferentes a partir destes anticorpos.

Tais sequências estruturais podem ser obtidas a partir de bases de dados de ADN públicas ou referências publicadas que incluem sequências gênicas de anticorpos de linha germinal. Por exemplo, sequências de ADN de linha germinal

para genes de região variável de cadeia pesada e leve humanos podem ser encontradas na base de dados de linha germinal humana "VBase" (disponível na Internet em [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), bem como em Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH N.º 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hyper-variable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; e Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836.

Sequências proteicas de anticorpos são comparadas contra uma base de dados de sequências proteicas compiladas utilizando um dos métodos de pesquisa de semelhança de sequências designado Gapped BLAST (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402), que é bem conhecido para os peritos na especialidade. BLAST é um algoritmo de heurística no sentido em que é provável que um alinhamento estatisticamente significativo entre a sequência de anticorpo e a sequência da base de dados contenha pares de segmentos de elevada pontuação (HSP) de palavras alinhadas. Os pares de segmentos cujas pontuações não podem ser melhoradas por extensão ou corte designa-se um acerto. De forma breve, as sequências de nucleótidos com origem em VBASE ([vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaselllist2.php](http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaselllist2.php)) são traduzidas e a região entre, e incluindo a região estrutural de FR1 a FR3 é retida. As sequências da base de dados têm um comprimento médio de 98 resíduos. Sequências duplicadas que são correspondências exatas ao longo do comprimento total da proteína são removidas. Uma pesquisa BLAST por proteínas utilizando o programa blastp com parâmetros padrão predefinidos, exceto o filtro de baixa complexidade que é desativado e a matriz de substituição de

BLOSUM62, filtra os 5 primeiros acertos dando as correspondências de sequência. As sequências nucleotídicas são traduzidas em todas as seis grelhas e a grelha sem codões de terminação no segmento de correspondência da sequência da base de dados é considerada o acerto potencial. Isto é, por sua vez, confirmado utilizando o programa BLAST tblastx. Isto traduz a sequência de anticorpo em todas as seis grelhas e compara essas traduções com as sequências de nucleótidos da VBASE dinamicamente traduzidas em todas as seis grelhas.

As identidades são correspondências exatas de aminoácidos entre a sequência de anticorpo e a base de dados de proteínas ao longo do comprimento completo da sequência. Os positivos (identidades + correspondência de substituição) não são idênticos mas sim substituições de aminoácidos orientadas pela matriz de substituição BLOSUM62. Se a sequência de anticorpo corresponde a duas das sequências da base de dados com a mesma identidade, seria decidido que o acerto com maior número de positivos seria o acerto de sequência correspondente.

Sequências estruturais preferidas para utilização nos anticorpos da invenção são aquelas que são estruturalmente semelhantes às sequências estruturais utilizadas pelos anticorpos selecionados, por exemplo, semelhantes às sequências estruturais de V<sub>H</sub> 1-18 (SEQ ID NO:101) e/ou às sequências estruturais de V<sub>H</sub> 1-69 (SEQ ID NO:102) e/ou às sequências estruturais de V<sub>H</sub> 1-3 (SEQ ID NO:103) e/ou às sequências estruturais de V<sub>H</sub> 3-9 (SEQ ID NO:104) e/ou às sequências estruturais de V<sub>K</sub> L6 (SEQ ID NO:105) e/ou às sequências estruturais de V<sub>K</sub> L15 (SEQ ID NO:106) e/ou às sequências estruturais de V<sub>K</sub> A27 (SEQ ID NO:107) e/ou às sequências estruturais de V<sub>K</sub> L18 (SEQ ID NO:107). As sequências CDR1, CDR2, ou CDR3 de V<sub>H</sub>, e as sequências CDR1, CDR2, ou CDR3 de V<sub>K</sub>, podem ser enxertadas em regiões estruturais que têm a sequência idêntica àquela encontrada

no gene de imunoglobulina de linha germinal a partir do qual a sequência estrutural deriva, ou as sequências CDR podem ser enxertadas em regiões estruturais que contêm uma ou mais mutações quando comparadas com as sequências de linha germinal. Por exemplo, verificou-se que em determinados casos, é benéfico mutar resíduos dentro das regiões estruturais para manter ou potencializar a capacidade de ligação a antígeno do anticorpo (veja-se por exemplo, os documentos de Patente U.S. N°s 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen et al.).

Anticorpos manipulados da invenção incluem aqueles nos quais foram realizadas modificações nos resíduos estruturais dentro de  $V_H$  e/ou  $V_K$ , por exemplo, para melhorar as propriedades do anticorpo. Tipicamente, tais modificações estruturais são realizadas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abrodagem consiste em "retromutar" um ou mais resíduos estruturais para a sequência de linha germinal correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que passou por mutação somática podem conter resíduos estruturais que diferem da sequência de linha germinal a partir da qual o anticorpo deriva. Tais resíduos podem ser identificados através da comparação das sequências estruturais do anticorpo com as sequências de linha germinal a partir das quais o anticorpo deriva. Por exemplo, conforme descrito abaixo, um número de alterações de aminoácidos nas regiões estruturais dos anticorpos anti-PD-L1 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1 B12, 7H1, 11E6, 12B7 e 13G4 que diferem da sequência-mãe de linha germinal. Para devolver as sequências de região estrutural à sua configuração de linha germinal, as mutações somáticas podem ser "retromutadas" para a sequência de linha germinal através de, por exemplo, mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese mediada por PCR. O alinhamento da região  $V_H$  para 3G10 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-18 de linha germinal é mostrado na Figura 11. O

alinhamento da região  $V_H$  para 12A4 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 12. O alinhamento da região  $V_H$  para 10A5 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-3 de linha germinal é mostrado na Figura 13. O alinhamento da região  $V_H$  para 5F8 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 14. O alinhamento da região  $V_H$  para 10H10 contra a sequência-mãe  $V_H$  3-9 de linha germinal é mostrado na Figura 15. O alinhamento da região  $V_H$  para 1 B12 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 16. O alinhamento da região  $V_H$  para 7H1 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 17. O alinhamento da região  $V_H$  para 11 E6 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 18. O alinhamento da região  $V_H$  para 12B7 contra a sequência-mãe  $V_H$  1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 19. O alinhamento da região  $V_H$  para 13G4 contra a sequência-mãe  $V_H$  3-9 de linha germinal é mostrado na Figura 20.

Por exemplo, para 12A4, o resíduo de aminoácido n.º 24 (dentro de FR1) de  $V_H$  é uma treonina enquanto este resíduo, na sequência de linha germinal  $V_H$  1-69 correspondente, é uma alanina. Para devolver as sequências de região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo n.º 24 da  $V_H$  de 12A4 pode ser "retromutado" de treonina para alanina. Tais anticorpos "retromutados" também se destinam a ser englobados pela invenção.

Como outro exemplo, para 12A4, o resíduo de aminoácido n.º 27 (dentro de FR1) de  $V_H$  é um ácido aspártico enquanto este resíduo na sequência de linha germinal  $V_H$  1-69 correspondente é uma glicina. Para devolver as sequências de região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo n.º 27 da  $V_H$  de 12A4 pode ser "retromutado" de ácido aspártico para glicina. Tais anticorpos "retromutados" também se destinam a ser

englobados pela invenção.

Como outro exemplo, para 12A4, o resíduo de aminoácido n.º 95 (dentro de FR3) de V<sub>H</sub> é uma treonina enquanto este resíduo, na sequência de linha germinal V<sub>H</sub> 1-69 correspondente, é uma tirosina. Para devolver as sequências de região estrutural à sua configuração de linha germinal, por exemplo, o resíduo n.º 95 (resíduo n.º 29 de FR3) da V<sub>H</sub> de 12A4 pode ser "retromutado" de fenilalanina para tirosina. Tais anticorpos "retromutados" também se destinam a ser englobados pela invenção.

Outro tipo de modificação estrutural envolve mutar um ou mais resíduos dentro da região estrutural para remover epítomos de células T para reduzir assim a potencial imunogenicidade do anticorpo. Esta abordagem também é referida como "desimunização" e é descrita em maior detalhe na Publicação de Patente U.S. N.º 20030153043 por Carr *et al.*

Em adição ou alternativa a modificações realizadas dentro da região estrutural, os anticorpos da invenção podem ser manipulados para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tal como semivida sérica, fixação de complemento, ligação a recetor Fc, e/ou citotoxicidade celular dependente de antigénio. Além disso, um anticorpo da invenção pode ser modificado quimicamente (por exemplo, uma ou mais frações químicas podem ser ligadas ao anticorpo) ou ser modificadas para alterar a sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma destas formas de realização é descrita em maior detalhe abaixo. A numeração de resíduos na região Fc é aquela do índice EU de Kabat.

Numa forma de realização, a região de dobradiça de CH1 é modificada de tal modo que o número de resíduos de cisteína na região de dobradiça é alterado, por exemplo,

aumentado ou diminuído. Esta abordagem é adicionalmente descrita no documento de Patente U.S. N.º 5.677.425 por Bodmer *et al.* O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça de CH1 é alterado para, por exemplo, facilitar a montagem das cadeias pesadas e leves ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

Noutra forma de realização, a região de dobradiça Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a semivida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácidos são introduzidas na região de interface de domínio CH2-CH3 do fragmento de dobradiça Fc de tal forma que o anticorpo possui uma ligação à proteína estafilocócica A (SpA) comprometida em relação à ligação a SpA do domínio de dobradiça Fc nativo. Esta abordagem é descrita em maior detalhe no documento de Patente U.S. N.º 6.165.745 por Ward *et al.*

Noutra forma de realização, o anticorpo é modificado para aumentar a sua semivida biológica. Várias abordagens são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das seguintes mutações podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, conforme descrito no documento de Patente U.S. N.º 6.277.375 para Ward. Alternativamente, para aumentar a semivida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou C1 para conter um epítipo de ligação a recetor de salvamento tomado a partir de duas ansas de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nos documentos de Patente U.S. N.ºs 5.869.046 e 6.121.022 por Presta *et al.*

Ainda noutras formas de realização, a região Fc é alterada através da substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados a partir dos resíduos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido

diferente de modo que o anticorpo tem uma afinidade alterada para um ligando efetor mas retém a capacidade de ligação a antígeno do anticorpo-mãe. O ligando efetor ao qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um recetor Fc ou o componente C1 do complemento. Esta abordagem é descrita em maior detalhe nos documentos de Patente U.S. N.ºs 5.624.821 e 5.648.260, ambos por Winter *et al.*.

Noutro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados a partir dos resíduos de aminoácidos 329, 331 e 322 podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente de modo que o anticorpo possui ligação a C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC) reduzida ou inexistente. Esta abordagem é descrita em maior detalhe no documento de Patente U.S. N.º 6.194.551 por Idusogie *et al.*.

Noutro exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro das posições de aminoácidos 231 e 239 são alterados para, deste modo, alterar a capacidade do anticorpo para fixar o complemento. Esta abordagem é adicionalmente descrita na Publicação PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*.

Ainda noutro exemplo, a região Fc é modificada para aumentar a capacidade do anticorpo para mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou para aumentar a afinidade do anticorpo para um recetor Fcγ ao modificar um ou mais aminoácidos nas seguintes posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439. Esta abordagem é adicionalmente descrita na Publicação PCT WO 00/42072 por Presta. Além disso, os sítios de ligação na IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e

variantes com ligação melhorada foram descritas (veja-se Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Mol. Chem. 276, 6591-6604). Verificou-se que mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 melhoram a ligação a FcγRIII. Adicionalmente, verificou-se que os seguintes mutantes de combinação melhoram a ligação a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e S298A/E333A/K334A.

Ainda noutra forma de realização, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser fabricado (isto é, o anticorpo carece de glicosilação). A glicosilação pode ser alterada para, por exemplo, aumentar a afinidade do anticorpo para o antigénio. Tais modificações dos hidratos de carbono podem ser conseguidas através de, por exemplo, alteração de um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência de anticorpo. Por exemplo, podem ser realizadas uma ou mais substituições de aminoácidos que resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação estruturais de região variável para, desta forma, eliminar a glicosilação nesses sítios. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para o antigénio. Uma tal abordagem é descrita em maior detalhe nos documentos de Patente U.S. N.ºs 5.714.350 e 6.350.861 por Co *et al.*.

Noutras determinadas formas de realização, pode ser fabricado um anticorpo que possui um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipofucosilado tendo quantidades reduzidas de resíduos de fucosilo ou um anticorpo tendo estruturas de GlcNac bissetoras aumentadas. Foi demonstrado que tais padrões de glicosilação alterados aumentam a capacidade de ADCC dos anticorpos. Tais modificações dos hidratos de carbono podem ser conseguidas através de, por exemplo, expressão do anticorpo numa célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. Células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser utilizadas como células hospedeiras nas

quais expressar anticorpos recombinantes da invenção para, desta forma, produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhas celulares Ms704, Ms705, e Ms709 carecem do gene da fucosiltransferase, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferase), de modo que os anticorpos expressos em linhas celulares Ms704, Ms705, e Ms709 carecem de fucose nos seus hidratos de carbono. As linhas celulares Ms704, Ms705, e Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> foram criadas pela interrupção direcionada do gene FUT8 em células CHO/DG44 utilizando dois vetores de substituição (veja-se a Publicação de Patente U.S. N.º 20040110704 por Yamane *et al.* e Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como outro exemplo, o documento EP 1.176.195 por Hanai *et al.* descreve uma linha celular com um gene FUT8 funcionalmente interrompido, que codifica uma fucosil transferase, de modo que os anticorpos expressos numa tal linha celular exibem hipofucosilação através de redução ou eliminação da enzima relacionada com a ligação alfa 1,6. Hanai *et al.* também descrevem linhas celulares que têm uma atividade enzimática reduzida para adicionar fucose à N-acetilglucosamina que se liga à região Fc no anticorpo ou não tem a atividade enzimática, por exemplo a linha celular de mieloma de rato YB2/0 ATCC CRL 1662). A Publicação PCT WO 03/035835 por Presta descreve uma linha celular CHO variante, células Lec13, com capacidade reduzida para ligar fucose a hidratos de carbono ligados a Asn(297), também resultando na hipofucosilação de anticorpos expressos nessa célula hospedeira (veja-se também Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Mol. Chem.* 277, 26733-26740). A Publicação PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* descreve linhas celulares manipuladas para expressar glicosil transferases modificantes de glicoproteínas (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII)) de modo que os anticorpos expressos nas linhas celulares manipuladas exibem estruturas GlcNac bissetoras aumentadas, o que

resulta numa atividade de ADCC aumentada dos anticorpos (veja-se também Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternativamente, os resíduos de fucose do anticorpo podem ser separados por clivagem utilizando uma enzima fucosidase. Por exemplo, a fucosidase alfa-L-fucosidase remove resíduos fucosilo dos anticorpos (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Outra modificação dos anticorpos no presente documento que é contemplada pela invenção é a peguilação. Um anticorpo pode ser peguilado para, por exemplo, aumentar a semivida biológica (por exemplo, sérica do anticorpo. Para peguilar um anticorpo, o anticorpo, ou fragmento do mesmo, é tipicamente reagido com polietilenoglicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado de aldeído de PEG, sob condições nas quais um ou mais grupos PEG se tornam ligados ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. Preferivelmente, a peguilação é levada a cabo através de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero hidrossolúvel reativo análogo). Conforme utilizado no presente documento, o termo "polietilenoglicol" destina-se a englobar qualquer uma das formas de PEG que foram utilizadas para derivar outras proteínas, tais como monoalcoxi (C1-C10) ou ariloxi-polietilenoglicol ou polietilenoglicol-maleimida. Em determinadas formas de realização, o anticorpo a ser peguilado é um anticorpo aglicosilado. Métodos para peguilação de proteínas são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Veja-se por exemplo, os documentos EP 0 154 316 por Nishimura *et al.* e EP 0 401 384 por Ishikawa *et al.*

#### Métodos de Manipulação de Anticorpos

Conforme discutido acima, os anticorpos anti-PD-L1 tendo sequências de  $V_H$  and  $V_K$  divulgadas no presente documento podem ser utilizados para criar novos anticorpos anti-PD-L1 através da modificação das sequências  $V_H$  e/ou  $V_K$ ,

ou a(s) região(ões) constante(s) ligadas às mesmas. Assim, noutro aspeto da invenção, as características estruturais de um anticorpo anti-PD-L1 da invenção, por exemplo, 12A4, são utilizadas para criar anticorpos anti-PD-L1 estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como ligação a PD-L1 humano. Por exemplo, as regiões CDR de 12A4 podem ser combinadas de forma recombinantes com regiões estruturais conhecidas e/ou outras CDRs para criar anticorpos anti-PD-L1 da invenção adicionais e manipulados geneticamente, conforme discutido acima. Outros tipos de modificações incluem aquelas descritas na secção anterior. O material de partida para o método de manipulação é uma ou mais das sequências  $V_H$  e/ou  $V_K$  proporcionadas no presente documento, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Para criar o anticorpo manipulado, não é realmente necessário preparar (isto é, expressar uma proteína) um anticorpo tendo uma ou mais das sequências  $V_H$  e/ou  $V_K$  proporcionadas no presente documento, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Em vez disso, a informação contida na(s) sequência(s) é utilizada como o material de partida para criar uma ou mais sequências de "segunda geração" derivadas a partir da(s) sequência(s) original(ais) e em seguida a(s) sequência(s) de "segunda geração" é(são) preparada(s) e expressa(s) como uma proteína.

Técnicas padrão de biologia molecular podem ser utilizadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterada.

Preferivelmente, o anticorpo codificado pela(s) sequência(s) de anticorpo alterada(s) é um que retém uma, algumas ou todas as propriedades funcionais dos anticorpos anti-PD-L1 descritos no presente documento, propriedades funcionais as quais incluem, mas não são limitadas a:

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

- (ii) aumenta a proliferação de células T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (iii) aumenta a produção de interferão- $\gamma$  num ensaio de MLR;
- (iv) aumenta a secreção de IL-2 num ensaio de MLR;
- (v) estimula respostas de anticorpos; e/ou
- (vi) inverte o efeito de células T reguladoras em células T efectoras e/ou células dendríticas.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados pode ser avaliada utilizando ensaios padrão disponíveis na técnica e/ou descritos no presente documento, tais como aqueles estabelecidos nos Exemplos (por exemplo, citometria de fluxo, ensaios de ligação).

Em determinadas formas de realização dos métodos de manipulação de anticorpos da invenção, as mutações podem ser introduzidas aleatória ou seletivamente ao longo de toda ou parte de uma sequência codificante de anticorpo anti-PD-L1 e os anticorpos anti-PD-L1 modificados resultantes podem ser rastreados em relação à atividade de ligação e/ou outras propriedades funcionais conforme descrito no presente documento. Métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, a Publicação PCT WO 02/092780 por Short descreve métodos para criar e rastrear mutações de anticorpos utilizando mutagénese de saturação, montagem de ligação sintética, ou uma combinação dos mesmos. Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 por Lazar *et al.* descreve métodos de utilização de métodos de rastreio computacional para otimizar as propriedades físico-químicas dos anticorpos.

#### Moléculas de Ácidos Nucleicos que Codificam Anticorpos da Divulgação

As moléculas de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da invenção podem estar presentes em células inteiras, num lisado celular, ou numa forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é

"isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando é purificado para longe de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, através de técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, produção de bandas com CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de agarose e outras bem conhecidas na técnica. Veja-se, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nova Iorque. Um ácido nucleico da invenção pode ser, por exemplo, ADN ou ARN e pode ou não conter sequências intrónicas. Numa forma de realização preferida, o ácido nucleico é uma molécula de ADNc.

Ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos utilizando técnicas padrão de biologia molecular. Para anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados a partir de ratinhos transgênicos que carregam genes de imunoglobulina humana conforme descrito mais abaixo), ADNcs que codificam as cadeias pesadas e leves do anticorpo fabricado pelo hibridoma podem ser obtidos através de amplificação por PCR ou técnicas de clonagem de ADNc padrão. Para anticorpos obtidos a partir de uma biblioteca de genes de imunoglobulina (por exemplo, utilizando técnicas de exibição em fagos) ácidos nucleicos que codificam o anticorpo podem ser recuperados a partir da biblioteca.

Moléculas de ácidos nucleicos preferidas da invenção são aquelas que codificam as sequências V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de 12A4. A sequência de ADN que codifica a sequência V<sub>H</sub> de 12A4 é mostrada na SEQ ID NO:82. A sequência de ADN que codifica a sequência V<sub>L</sub> de 12A4 é mostrada na SEQ ID NO:92.

Uma vez que os fragmentos de ADN que codificam segmentos V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> são obtidos, estes fragmentos de ADN podem ser adicionalmente manipulados através de técnicas de ADN recombinantes padrão, por exemplo para converter os

genes de região variável em genes de cadeia de anticorpo de comprimento completo, em genes de fragmento Fab ou num gene de scFv. Nestas manipulações, um fragmento de ADN codificante de  $V_L$  ou  $V_H$  é operativamente ligado a outro fragmento de ADN que codifica outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. O termo "operativamente ligado", conforme utilizado neste contexto, destina-se a significar que os dois fragmentos de ADN estão unidos de tal modo que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de ADN se mantêm enquadradas.

O ADN isolado que codifica a região  $V_H$  pode ser convertido num gene de cadeia pesada de comprimento completo operativamente ligando o ADN codificante de  $V_H$  com outra molécula de ADN que codifica as regiões constantes de cadeia pesada ( $CH1$ ,  $CH2$  e  $CH3$ ). As sequências dos genes de região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica (veja-se por exemplo, Kabat E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH N.º 91-3242) e os fragmentos de ADN que englobam estas regiões podem ser obtidos através de amplificação padrão por PCR. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, mas mais preferivelmente, é uma região constante de IgG1 ou IgG4. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o ADN codificante de  $V_H$  pode ser operativamente ligado a outra molécula de ADN que codifica apenas a região constante de  $CH1$  de cadeia pesada.

O ADN isolado que codifica a região  $V_L$  pode ser convertido num gene de cadeia leve de comprimento completo (bem como um gene de cadeia leve Fab) operativamente ligando o ADN codificante de  $V_L$  com outra molécula de ADN que codifica a região constante de cadeia leve,  $CL$ . As sequências dos genes de região constante de cadeia leve

humana são conhecidas na técnica (veja-se por exemplo, Kabat E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NIH N.º 91-3242) e os fragmentos de ADN que englobam estas regiões podem ser obtidos através de amplificação padrão por PCR. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda, mas mais preferivelmente, é uma região constante kappa.

Para criar um gene scFv, os fragmentos de ADN que codificam VH e VL são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligante flexível, por exemplo, que codifica a sequência de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que as sequências de VH e VL podem ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões VL e VH unidas pelo ligante flexível (veja-se por exemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

#### Produção de Anticorpos Monoclonais da Invenção

Os anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção podem ser produzidos através de uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpos monoclonais convencional, por exemplo, a técnica de hibridação de células somáticas padrão de Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Embora os procedimentos de hibridação de células somáticas sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produção de anticorpos monoclonais podem ser empregues, por exemplo, transformação viral ou oncogénica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparação de hibridomas é o sistema murino. A produção de hibridomas no ratinho é um procedimento muito bem estabelecido. Os protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenocitos imunizados para fusão são conhecidos na

técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma murino) e procedimentos de fusão também são conhecidos.

Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente invenção podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal murino preparado conforme descrito acima. O ADN que codifica as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido a partir do hibridoma murino de interesse e manipulado para conter sequências de imunoglobulina não murina (por exemplo, humana) utilizando técnicas padrão de biologia molecular. Por exemplo, para criar o anticorpo quimérico, as regiões variáveis murinas podem ser ligadas a regiões constantes humanas utilizando métodos conhecidos na técnica (veja-se por exemplo, o documento de Patente U.S. N.º 4.816.567 para Cabilly *et al.*). Para criar o anticorpo humanizado, as regiões CDR murinas podem ser inseridas numa região estrutural humana utilizando métodos conhecidos na técnica (veja-se por exemplo, o documento de Patente U.S. N.º 5.225.539 para Winter, e documentos de Patente U.S. N.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 para Queen *et al.*).

Numa forma de realização preferida, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra PD-L1 podem ser gerados utilizando ratinhos transgênicos ou transcromossômicos que carregam partes do sistema imunitário humano em vez do sistema de ratinho. Estes ratinhos transgênicos ou transcromossômicos incluem ratinhos referidos no presente documento como ratinhos HuMAb e KM mice<sup>™</sup>, respetivamente, e são coletivamente referidos, no presente documento, como "ratinhos de Ig humana".

O ratinho HuMAb® (Medarex, Inc.) contém miniloci de gene de imunoglobulina humana que codificam sequências de imunoglobulina de cadeia pesada ( $\mu$  e  $\gamma$ ) e leve  $\kappa$  não

rearranjadas, juntamente com mutações direcionadas que inativam os loci de cadeia  $\mu$  e  $\kappa$  endógenos (veja-se por exemplo, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Consequentemente, os ratinhos exibem expressão reduzida de IgM ou  $\kappa$  de ratinho, e em resposta à imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humana introduzidos passam por mudança de classe e mutação somática para gerar IgG $\kappa$  monoclonal humana de alta afinidade (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisto por Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). A preparação e utilização de ratinhos HuMAb, e as modificações genómicas transportadas por tais ratinhos, são adicionalmente descritas em Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailleon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailleon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; e Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, os conteúdos das quais são especificamente incorporadas como referência no presente documento na sua totalidade. Veja-se adicionalmente, os documentos de Patente U.S. N°s 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todos para Lonberg e Kay; documento de Patente U.S. N.º 5.545.807 para Surani *et al.*; N°s de Publicação PCT WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962, todos para Lonberg e Kay; e Publicação PCT N.º WO 01114424 para Korman *et al.*.

Noutra forma de realização, os anticorpos humanos da invenção podem ser produzidos utilizando um ratinho que

carrega sequências de imunoglobulina humana em transgenes ou transcromossomas, tal como um ratinho que carrega um transgene de cadeia pesada humano e um transcromossoma de cadeia leve humano. Tais ratinhos, referidos no presente documento como "KM mice<sup>TM</sup>", são descritos em detalhe na Publicação PCT WO 02/43478 para Ishida *et al.*.

Ainda outros sistemas animais transgênicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser utilizados para produzir anticorpos anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como o Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser utilizado; tais ratinhos são utilizados em, por exemplo, os documentos de Patente U.S. N°s 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 para Kucherlapati *et al.*.

Além disso, sistemas animais transcromossômicos alternativos que expressam genes de imunoglobulina humana estão disponíveis na técnica e podem ser utilizados para produzir anticorpos anti-PD-L1 da invenção. Por exemplo, ratinhos que carregam um transcromossoma de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humana, referidos como "ratinhos TC" podem ser utilizados; tais ratinhos são descritos em Tomizuka *et al.*, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Além disso, vacas que carregam transcromossomas de cadeia pesada e leve humana foram descritas na técnica (Kuroiwa *et al.* (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) e podem ser utilizadas para produzir os anticorpos anti-PD-L1 da invenção.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção também podem ser preparados utilizando métodos de exibição em fagos para rastrear bibliotecas de gene de imunoglobulina humana. Tais métodos de exibição em fagos para isolamento de anticorpos humanos estão estabelecidos na técnica. Veja-se por exemplo: os documentos de Patente U.S. N°s 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 para Ladner *et al.*;

documentos de Patente U.S. N.ºs 5.427.908 e 5.580.717 para Dower *et al.*; documentos de Patente U.S. N.ºs 5.969.108 e 6.172.197 para McCafferty *et al.*; e documentos de Patente U.S. N.ºs 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 para Griffiths *et al.*.

Anticorpos monoclonais da invenção podem também ser preparados utilizando ratinho SCID nos quais células imunitárias humanas foram reconstituídas de modo que uma resposta de anticorpos humanos pode ser gerada após imunização. Tais ratinhos são descritos, por exemplo, nos documentos de Patente U.S. N.ºs 5.476.996 e 5.698.767 para Wilson *et al.*.

#### Imunização de Ratinhos de Ig Humana

Quando ratinhos de Ig humana são utilizados para produzir anticorpos humanos da invenção, tais ratinhos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antigénio PD-L1 e/ou PD-L1 recombinante, ou uma proteína de fusão de PD-L1, conforme descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; e Publicação PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. Preferivelmente, os ratinhos terão 6-16 semanas de idade aquando da primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50 µg) de antigénio PD-L1 pode ser utilizada para imunizar os ratinhos de Ig humana por via intraperitoneal.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos contra PD-L1 são descritos no Exemplo 1 abaixo. Experiência cumulativa com vários antigénios mostrou que os ratinhos transgénicos respondem quando inicialmente imunizados por via intraperitoneal (IP) com antigénio em adjuvante completo de Freund, seguido por imunizações IP em semanas alternadas (até um total de 6) com antigénio em adjuvante de Freund incompleto. Contudo, também se verifica que adjuvantes para

além do de Freund também são eficazes. Adicionalmente, verifica-se que células inteiras na ausência de adjuvante são altamente imunogênicas. A resposta imunitária pode ser monitorizada ao longo do curso do protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas a partir de sangrias retro-orbitárias. O plasma pode ser rastreado por ELISA (conforme descrito abaixo), e os ratinhos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-PD-L1 podem ser utilizados para fusões. Os ratinhos podem ser reforçados por via intravenosa com antígeno 3 dias antes de serem sacrificados e da remoção do baço. Espera-se que possa ser necessário realizar 2-3 fusões para cada imunização. Entre 6 e 24 ratinhos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Normalmente, são utilizadas ambas as estirpes HCo7 e HCo12. Adicionalmente, ambos os transgenes HCo7 e HCo12 podem ser produzidos em conjunto num único ratinho tendo dois transgenes de cadeia pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). Alternativamente ou adicionalmente, a estirpe de KM mouse<sup>™</sup> pode ser utilizada, conforme descrito no Exemplo 1.

#### Geração de Hibridomas que Produzem Anticorpos Monoclonais Humanos da Divulgação

Para gerar hibridomas que produzem anticorpos monoclonais humanos da invenção, esplenocitos e/ou células dos linfonodos de ratinhos imunizados podem ser isolados e fusionados com uma linha celular imortalizada adequada, tal como uma linha celular de mieloma de ratinho. Os hibridomas resultantes podem ser rastreados em relação à produção de anticorpos específicos de antígeno. Por exemplo, suspensões de célula única de linfócitos esplênicos a partir de ratinhos imunizados podem ser fusionadas com um sexto do número de células de mieloma de ratinho não secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com PEG a 50%. As células são colocadas em placas a aproximadamente  $2 \times 10^5$  em placas de microtitulação de fundo plano, seguidas por

uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo soro de clone fetal a 20%, meio condicionado "683" a 18%, origen a 5% (IGEN), L-glutamina a 4 mM, piruvato de sódio a 1 mM, HEPES a 5 mM, 2-mercaptoetanol a 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e HAT 1X (Sigma, a HAT é adicionada 24 horas antes da fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio no qual a HAT é substituída por HT. Poços individuais podem depois ser rastreados por ELISA para anticorpos IgM e IgG monoclonais humanos. Uma vez que ocorre o crescimento extenso de hibridomas, o meio pode ser observado, normalmente, após 10-14 dias. Os hibridomas que secretam anticorpos podem ser colocados em placas novamente, rastreados de novo, e se ainda forem positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes através de diluição limitante. Os subclones estáveis podem depois ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpos em meio de cultura tecidual para caracterização.

Para purificar anticorpos monoclonais humanos, hibridomas selecionados podem ser cultivados em frascos de agitação de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). A IgG eluída pode ser verificada através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar a pureza. A solução tampão pode ser trocada para PBS, e a concentração pode ser determinada por D0280 utilizando um coeficiente de extinção 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser separados em alíquotas e armazenados a -80 °C.

#### Geração de Transfetomas que Produzem Anticorpos Monoclonais da Divulgação

Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos

num transfetoma de célula hospedeira utilizando, por exemplo, uma combinação de técnicas de ADN recombinante e métodos de transfeção génica, tal como é bem conhecido na técnica (por exemplo, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos, ou fragmentos de anticorpos dos mesmos, os ADNs que codificam cadeias leves e pesadas parciais ou de comprimento completo, podem ser obtidos através de técnicas de biologia molecular padrão (por exemplo, amplificação por PCR ou clonagem de ADNc utilizando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os ADNs podem ser inseridos em vetores de expressão de modo que os genes estão operativamente ligados a sequências de controlo translacional e transcricional. Neste contexto, o termo "operativamente ligado" destina-se a significar que um gene de anticorpo é ligado a um vetor de tal modo que sequências de controlo translacional e transcricional dentro do vetor servem a sua função pretendida de regulação da tradução e transcrição do gene de anticorpo. O vetor de expressão e sequências de controlo de expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão utilizada. O gene de cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vetores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpos são inseridos no vetor de expressão através de meios padrão (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares no fragmento génico do anticorpo e vetor, ou ligação de extremidades cegas se não estiverem presentes quaisquer sítios de restrição). As regiões variáveis de cadeia leve e pesada dos anticorpos descritos no presente documento podem ser utilizadas para criar genes de anticorpos de comprimento total de qualquer isotipo de anticorpo através da inserção dos mesmos em vetores de

expressão que já codificam regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve do isotipo desejado de modo que o segmento  $V_H$  está operativamente ligado com o(s) segmento(s)  $C_H$  dentro do vetor e o segmento  $V_K$  está operativamente ligado ao segmento  $C_L$  dentro do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um péptido de sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo a partir de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor de modo que o péptido de sinal esteja ligado em estrutura com o terminal amino do gene de cadeia de anticorpo. O péptido de sinal pode ser um péptido de sinal de imunoglobulina ou um péptido de sinal heterólogo (isto é, um péptido de sinal a partir de uma proteína não imunoglobulina).

Adicionalmente aos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes de cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. O termo "sequência reguladora" destina-se a incluir promotores, potenciadores e outros elementos de controlo da expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes de cadeia de anticorpo. Tais sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado pelos peritos na especialidade que o desenho do vetor de expressão, incluindo a seleção de sequências reguladoras, pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Sequências reguladoras preferidas para expressão de células hospedeiras de mamíferos incluem elementos virais que direcionam elevados níveis de expressão proteica em células de mamífero, tais como promotores e/ou potenciadores derivados a partir de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus,

(por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP) e políoma. Alternativamente, sequências reguladoras não virais podem ser utilizadas, tais como o promotor de ubiquitina ou promotor de  $\beta$ -globina. Ainda adicionalmente, elementos reguladores compostos de sequências a partir de diferentes origens, tais como o sistema promotor SR $\alpha$ , que contém sequências a partir do promotor precoce de SV40 e a repetição terminal longa do vírus de tipo 1 da leucemia de células T humana (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 466-472).

Adicionalmente aos genes de cadeia de anticorpo e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (veja-se por exemplo, os documentos de Patente U.S. N°s 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todos por Alex et al.). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência aos fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene da dihidrofolato redutase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras dhfr com seleção/amplificação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

Para expressão das cadeias leves e pesadas, o(s) vetor(es) de expressão que codificam as cadeias pesadas e leves é(são) transfetado(s) numa célula hospedeira através de técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" destinam-se a englobar uma ampla variedade de técnicas habitualmente utilizadas para a introdução de ADN exógeno numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por

exemplo, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfeção com DEAE-dextrano e semelhantes. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, a expressão de anticorpos em células eucarióticas, e mais preferivelmente células hospedeiras de mamífero, é o mais preferido porque tais células eucarióticas, e em particular células de mamífero, são mais propensas do que as células procarióticas a montar e secretar um anticorpo devidamente dobrado e imunologicamente ativo. A expressão procariótica de genes de anticorpo foi relatada como sendo ineficaz para a produção de elevados rendimentos de anticorpo ativo (Boss, M. A. e Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Células hospedeiras de mamífero preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem de Ovário de Hámster Chinês (células CHO) (incluindo células CHO dhfr, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad Sci. EUA 77:4216-4220, utilizadas com um marcador selecionável de DHFR, por exemplo, conforme descrito em R. J. Kaufman e P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Em particular, para utilização com células de mieloma NSO, outro sistema de expressão preferido é o sistema de expressão génica GS divulgado nos documentos WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338.841. Quando vetores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo para o meio de cultura no qual as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do meio de cultura utilizando métodos de purificação de proteínas

padrão.

#### Caracterização da Ligação de Anticorpo a Antígeno

Os anticorpos da invenção podem ser testados em relação à ligação a PD-L1 através de, por exemplo, ELISA padrão. De forma breve, placas de microtitulação são revestidas com PD-L1 purificado a 0,25 µg/ml em PBS, e depois bloqueadas com albumina sérica bovina a 5% em PBS. Diluições de anticorpo (por exemplo, diluições de plasma a partir de ratinhos imunizados com PD-L1) são adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas a 37 °C. As placas são lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com reagente secundário (por exemplo, para anticorpos humanos, um reagente policlonal de cabra anti-IgG humana específico de Fc) conjugado com fosfatase alcalina durante 1 hora a 37 °C. Após a lavagem, as placas são reveladas com substrato pNPP (1 mg/ml), e analisadas a DO de 405-650. Preferivelmente, os ratinhos que desenvolvem os títulos mais elevados serão utilizados para fusões.

Um ensaio de ELISA, conforme descrito acima, pode também ser utilizado para rastrear por hibridomas que mostram reatividade positiva com o imunogénio PD-L1. Hibridomas que se ligam com elevada avidéz a PD-L1 são subclonados e adicionalmente caracterizados. Um clone a partir de cada hibridoma, que retém a reatividade das células-mãe (através de ELISA, pode ser escolhido para fazer um banco de células de 5-10 frascos armazenados a -140 °C, e para purificação de anticorpos.

Para purificar os anticorpos anti-PD-L1, hibridomas selecionados podem ser cultivados em frascos de agitação de dois litros para purificação de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, NJ). A IgG eluída pode ser verificada através de eletroforese em gel e cromatografia líquida de alto desempenho para assegurar a pureza. A

solução tampão pode ser trocada para PBS, e a concentração pode ser determinada por  $DO_{280}$  utilizando um coeficiente de extinção 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser separados em alíquotas e armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . [0117] Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 selecionados se ligam a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, IL). Estudos de competição utilizando anticorpos monoclonais não marcados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser realizados utilizando placas de ELISA revestidas de PD-L1, conforme descrito acima. A ligação de mAb biotinilado pode ser detetada com uma sonda de fosfatase alcalina-estreptavidina.

Para determinar o isotipo dos anticorpos purificados, ELISAs de isotipo podem ser realizados utilizando reagentes específicos para anticorpos de um isotipo particular. Por exemplo, para determinar o isotipo de um anticorpo monoclonal humano, os poços de placas de microtitulação podem ser revestidos com 1 mg/ml de anticorpo anti-imunoglobulina humana durante a noite a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após bloqueio com BSA a 1%, as placas são reagidas com 1 mg/ml ou menos de anticorpos monoclonais de teste ou controles de isotipo purificados, à temperatura ambiente durante uma ou duas horas. Os poços podem depois ser submetidos a reação com IgG1 humana ou sondas conjugadas com fosfatase alcalina específicas para IgM humana. As placas são reveladas e analisadas conforme descrito acima.

IgGs humanas anti-PD-L1 podem ser adicionalmente testadas em relação à reatividade com o antígeno PD-L1 através de *Western blotting*. De forma breve, PD-L1 pode ser preparado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio. Depois da eletroforese, os antígenos separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro fetal bovino a 10%, e sondados com anticorpos monoclonais a serem

testados. A ligação de IgG humana pode ser detetada utilizando fosfatase alcalina anti-IgG humana e revelada com comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chern. Co., St. Louis, Mo.).

#### Propriedades Físicas dos Anticorpos

Os anticorpos da presente invenção podem ser adicionalmente caracterizados pelas várias propriedades físicas dos anticorpos anti-PD-L1. Vários ensaios podem ser utilizados para detetar e/ou diferenciar diferentes classe de anticorpos com base nas suas propriedades físicas.

Em algumas formas de realização, os anticorpos da presente invenção podem conter um ou mais sítios de glicosilação em ambas as regiões variáveis de cadeia leve ou pesada. A presença de um ou mais sítios de glicosilação na região variável pode resultar em imunogenicidade aumentada do anticorpo ou numa alteração da pK do anticorpo devido a uma ligação a antigénio alterada (Marshall *et al.*, (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA e Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Sabe-se que a glicosilação ocorrem em motivos que contêm uma sequência N-X-S/T. A glicosilação de região variável pode ser testada utilizando um ensaio Glycoblott, que cliva o anticorpo para produzir um Fab, e depois testa a glicosilação utilizando um ensaio que mede a oxidação de periodato e formação de bases de Schiff. Alternativamente, a glicosilação de região variável pode ser testada utilizando cromatografia de luz Dionex (Dionex-LC), que cliva sacarídeos a partir de um Fab em monossacarídeos e analisa o teor de sacarídeo individual. Em alguns casos, é preferível ter um anticorpo anti-PD-L1 que não contém glicosilação de região variável. Isto pode ser alcançado selecionando anticorpos que não contêm o motivo de glicosilação na região variável ou através de

mutação de resíduos dentro do motivo de glicosilação utilizando técnicas padrão bem conhecidas na técnica.

Numa forma de realização preferida, os anticorpos da presente invenção não contêm sítios de isomerismo de asparagina. Uma desaminação ou efeito de ácido isoaspártico pode ocorrer em sequências N-G ou D-G, respectivamente. A desaminação ou efeito de ácido isoaspártico resulta na criação de ácido aspártico que diminui a estabilidade de um anticorpo através da criação de uma estrutura ondulada de um terminal carboxi de uma cadeia lateral em vez da cadeia principal. A criação de ácido isoaspártico podem ser medida utilizando um ensaio iso-quant, que utiliza uma HPLC de fase reversa para testar em relação ao ácido isoaspártico.

Cada anticorpo terá um ponto isoelétrico (pI) único, mas, de uma forma geral, os anticorpos cairão no intervalo de pH de entre 6 e 9,5. O pI para um anticorpo IgG1 tipicamente cai dentro do intervalo de pH de 7-9,5 e o pI para um anticorpo IgG4 tipicamente cai dentro do intervalo de pH de 6-8. Os anticorpos podem ter um pI que está fora deste intervalo. Embora os efeitos sejam geralmente desconhecidos, existe especulação que os anticorpos com um pI fora do intervalo normal podem ter algum desdobramento e instabilidade sob condições *in vivo*. O ponto isoelétrico pode ser testado utilizando um ensaio de focagem isoelétrica capilar, que cria um gradiente de pH e pode utilizar focagem a laser para uma precisão mais elevada (Janini *et al.* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt *et al.* (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). Em alguns casos, é preferível ter um anticorpo anti-PD-L1 que contém um valor de pI que cai dentro do intervalo normal. Isto pode ser alcançado seja através da seleção de um anticorpo com um pI no intervalo normal, ou através da mutação de resíduos de superfície carregados utilizando técnicas padrão bem conhecidas na técnica.

Cada anticorpo terá uma temperatura de fusão que é indicativa da estabilidade térmica (Krishnamurthy R e Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). Uma estabilidade térmica maior indicar uma melhor estabilidade geral do anticorpo *in vivo*. O ponto de fusão de um anticorpo pode ser medido utilizando técnicas tais como calorimetria de varrimento diferencial (Chen *et al.* (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando *et al.* (1999) Immunol Lett 68:47-52).  $T_{M1}$  indica a temperatura do desdobramento inicial do anticorpo.  $T_{M2}$  indica a temperatura do desdobramento completo do anticorpo. Geralmente, prefere-se que a  $T_{M1}$  de um anticorpo da presente invenção seja superior a 60 °C, preferivelmente superior a 65 °C, ainda mais preferivelmente superior a 70 °C. Alternativamente, a estabilidade térmica de um anticorpo pode ser medida utilizando dicroísmo circular (Murray *et al.* (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9). A estabilidade térmica de anticorpos anti-PD-L1 divulgados no presente documento encontra-se resumida no Quadro 1.

**Quadro 1.**

<b>mAb</b>	<b>T<sub>m1</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>m2</sub> (°C)</b>
<b>3G10</b>	70	75
<b>5F8</b>	72	74
<b>11E6</b>	64	73
<b>1B12</b>	69	72
<b>12A4</b>	68	72
<b>10A5</b>		71
<b>12B7</b>		70
<b>13G4</b>	66	69
<b>10H10</b>		69

Numa forma de realização preferida, são selecionados anticorpos que não se degradam rapidamente. A fragmentação de um anticorpo anti-PD-L1 pode ser medida utilizando

eletroforese capilar (CE) e MALDI-MS, tal como é bem compreendido na técnica (Alexander AJ e Hughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32).

Noutra forma de realização preferida, são selecionados anticorpos que possuem efeitos de agregação mínimos. A agregação pode conduzir a desencadeamento de uma resposta imunitária indesejável e/ou alterada ou propriedades farmacocinéticas desfavoráveis. Geralmente, os anticorpos são aceitáveis com uma agregação de 25% ou menos, preferivelmente 20% ou menos, ainda mais preferivelmente 15% ou menos, ainda mais preferivelmente 10% ou menos e ainda mais preferivelmente 5%. A agregação pode ser medida através de várias técnicas bem conhecidas na técnica, incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de coluna de exclusão por tamanho (SEC), e dispersão de luz para identificação de monómeros, dímeros, trímeros ou multímeros.

#### Imunoconjugados

Noutro aspeto, a presente invenção apresenta um anticorpo anti-PD-L1, ou um fragmento do mesmo, conjugado com uma fração terapêutica, tal como uma citotoxina, um fármaco (por exemplo, um imunossupressor) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são referidos no presente documento como "imunoconjugados". Imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são referidos como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial para (por exemplo, mata) células. Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracenodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrottestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Agentes terapêuticos também

incluem, por exemplo, antimetabolitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfan, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugados com um anticorpo da invenção incluem duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas e auristatinas, e derivados das mesmas. Um exemplo de conjugado de anticorpo e caliqueamicina está comercialmente disponível (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

As citotoxinas podem ser conjugadas com anticorpos da invenção utilizando tecnologia de ligante disponível na técnica. Exemplos de tipos de ligantes que foram utilizados para conjugar uma citotoxina com um anticorpo incluem, mas não estão limitados a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, dissulfitos e ligantes que contêm péptidos. Pode ser escolhido um ligante que seja, por exemplo, suscetível à clivagem por pH baixo dentro do compartimento lisossomal ou suscetível à clivagem por proteases, tais como proteases preferivelmente expressas em tecido tumoral tais como catepsinas (por exemplo, catepsinas B, C, D).

Para discussão adicional sobre os tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugação de agentes terapêuticos com anticorpos, veja-se também Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat.*

Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados com um isótopo radioativo para gerar agentes radiofarmacêuticos citotóxicos, também referidos como radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos que podem ser conjugados com os anticorpos para utilização diagnóstica ou terapêutica incluem, mas não estão limitados a, iodo<sup>131</sup>, índio<sup>111</sup>, ítrio<sup>90</sup> e lutétio<sup>177</sup>. Métodos para a preparação de imunoconjugados estão estabelecidos na técnica. Exemplos de radioimunoconjugados estão comercialmente disponíveis, incluindo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), e métodos semelhantes podem ser utilizados para preparar imunoconjugados utilizando os anticorpos da presente invenção.

Os conjugados de anticorpos da invenção podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica, e a fração de fármaco não deve ser entendida como limitada aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a fração de fármaco pode ser uma proteína ou polipéptido que possui uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou um fragmento da mesma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina da difteria; uma proteína tal como um fator de necrose tumoral ou interferão- $\gamma$ ; ou, modificadores da resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator de estimulação de colônias de macrófagos granulócitos ("GM-CSF"), fator de estimulação de colônias de granulócitos ("G-CSF"), ou outros fatores de crescimento.

Técnicas para conjugação de tais frações terapêuticas com anticorpos são bem conhecidas, veja-se, *por exemplo*,

Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2<sup>a</sup> Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of the Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

#### Moléculas Biespecíficas

Noutro aspeto, a presente invenção apresenta moléculas biespecíficas que compreendem um anticorpo anti-PD-L1, ou um fragmento do mesmo, da invenção. Um anticorpo da invenção, ou porções de ligação a antigénio do mesmo, pode ser derivado ou ligado a outra molécula funcional, *por exemplo*, outro péptido ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligando para um recetor) para gerar uma molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios de ligação diferentes ou moléculas alvo. O anticorpo da invenção pode, de facto, ser derivado ou ligado a mais do que uma molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais do que dois sítios de ligação diferentes e/ou moléculas alvo; tais moléculas multiespecíficas destinam-se também a ser englobadas pelo termo "molécula biespecífica" conforme utilizado no presente documento. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, através de acoplamento químico, fusão

genética, associação não covalente ou outro) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, péptido ou mimético de ligação, de modo que uma molécula biespecífica resulta.

Consequentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas que compreendem pelo menos uma primeira especificidade de ligação para PD-L1 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo alvo. Numa forma de realização particular da invenção, o segundo epítipo alvo é um recetor Fc, por exemplo, FcγRI humano (CD64) ou um recetor Fcα humano (CD89). Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas capazes de se ligarem a células efetoras que expressam ambos FcγRI e FcαR (por exemplo, monócitos, macrófagos e células polimorfonucleares (PMNs)), e a células alvo que expressam PD-L1. Estas moléculas biespecíficas direcionam células que expressam PD-L1 para células efetoras e desencadeiam atividades celulares efetoras mediadas por recetor Fc, tais como fagocitose de células que expressam PD-L1, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), libertação de citocinas, ou geração do anião superóxido.

Numa forma de realização da invenção na qual uma molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode incluir adicionalmente uma terceira especificidade de ligação, em adição a uma especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-PD-L1. Numa forma de realização, a terceira especificidade de ligação é uma porção anti-fator de potenciação (EF), *por exemplo*, uma molécula que se liga a uma proteína de superfície envolvida na atividade citotóxica e que aumenta, desta forma, a resposta imunitária contra a célula alvo. A "porção anti-fator de potenciação" pode ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligando que se liga a uma dada molécula, *por exemplo*, um antigénio ou um recetor, e que

resulta, desta forma, numa potenciação do efeito das determinantes de ligação para o recetor  $F_c$  ou antigénio da célula alvo. A "porção anti-fator de potenciação" pode ligar-se a um recetor  $F_c$  ou um antigénio de célula alvo. Alternativamente, a porção anti-fator de potenciação pode ligar-se a uma entidade que é diferente da entidade à qual a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção anti-fator de potenciação pode ligar-se a uma célula T citotóxica (por exemplo através de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imunitária que resultam numa resposta imunitária aumentada contra uma célula alvo).

Numa forma de realização, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem, como uma especificidade de ligação, pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, uma Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , Fv, ou Fv de cadeia simples. O anticorpo também pode ser um dímero de cadeia pesada ou cadeia leve, ou qualquer fragmento mínimo do mesmo tal como um Fv ou uma construção de cadeia simples conforme descrito em Ladner *et al.* documento de Patente U.S. N° 4.946.778, os conteúdos do qual é expressamente incorporado como referência.

Numa forma de realização, a especificidade de ligação para um recetor  $Fc\gamma$  é proporcionada por um anticorpo monoclonal, a ligação do qual não é bloqueada pela imunoglobulina G (IgG) humana. Conforme utilizado no presente documento, o termo "recetor de IgG" refere-se a qualquer dos oitenta genes de cadeia localizados no cromossoma 1. Estes genes codificam um total de doze isoformas de recetor solúvel ou transmembranar que são agrupadas em três classes de recetor  $Fc\gamma$ :  $Fc\gamma RI$  (CD64),  $Fc\gamma RII$  (CD32), e  $Fc\gamma RIII$  (CD16). Numa forma de realização preferida, o recetor  $Fc\gamma$  é um  $Fc\gamma RI$  humano de alta afinidade. O  $Fc\gamma RI$  humano é uma molécula de 72 kDa, que apresenta alta afinidade para IgG monomérica ( $10^8 - 10^9$  M-

<sup>1</sup>).

A produção e caracterização de determinados anticorpos monoclonais anti-Fc $\gamma$  preferidos são descritas por Fanger *et al.* na Publicação PCT WO 88/00052 e no documento de Patente U.S. N.º 4.954.617, os ensinamentos dos quais são incorporados na totalidade como referência no presente documento. Estes anticorpos ligam-se a um epítopo de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII ou Fc $\gamma$ RIII num sítio que é distinto do sítio de ligação do recetor e, assim, a sua ligação não é bloqueada substancialmente por níveis fisiológicos de IgG. Anticorpos anti-Fc $\gamma$ RI específicos úteis na presente invenção são mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma que produz mAb 32 está disponível a partir da American Type Culture Collection, N.º de Acesso da ATCC HB9469. Noutras formas de realização, o anticorpo anti-recetor Fc $\gamma$  é uma forma humanizada do anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 são descritas em Graziano, RF. *et al.* (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 e Publicação PCT WO 94/10332. A linha celular que produz anticorpo H22 foi depositada na American Type Culture Collection sob a designação HA022CL1 e tem o número de acesso CRL 11177.

Ainda noutras formas de realização preferidas, a especificidade de ligação para um recetor Fc é proporcionada por um anticorpo que se liga a um recetor de IgA humana, por exemplo, o recetor Fc-alfa (Fc $\alpha$ RI (CD89)), a ligação do qual é preferivelmente não bloqueada pela imunoglobulina A (IgA) humana. O termo "recetor de IgA" destina-se a incluir o produto génico de um gene  $\alpha$  (Fc $\alpha$ RI) localizado no cromossoma 19. Este gene é conhecido como codificando várias isoformas transmembranares alternativamente unidas de 55 a 110 kDa. Fc $\alpha$ RI (CD89) é constitutivamente expresso em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, mas não em populações de células não efetoras. O Fc $\alpha$ RI tem afinidade

média ( $\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) para ambas IgA1 e IgA2, que é aumentada após a exposição a citocinas tais como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H.C. et al. (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Quatro anticorpos monoclonais específicos para Fc $\alpha$ RI, identificados como A3, A59, A62 e A77, que se ligam a Fc $\alpha$ RI fora do domínio de ligação a ligando de IgA, foram descritos (Monteiro, RC. et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

Fc $\alpha$ RI e Fc $\gamma$ RI são recetores de desencadeamento preferidos para utilização nas moléculas biespecíficas da invenção porque são (1) expressos primariamente em células efectoras imunitárias, por exemplo, monócitos, PMNs, macrófagos e células dendríticas; (2) expressos em níveis elevados (por exemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) mediadores de atividades citotóxicas (por exemplo, ADCC, fagocitose); (4) medeiam a apresentação de antígenos potenciada de antígenos, incluindo auto-antígenos, direcionados a eles.

Enquanto anticorpos monoclonais humanos são preferidos, outros anticorpos que podem ser empregues nas moléculas biespecíficas da invenção são murinos, quiméricos e anticorpos monoclonais humanizados.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas através da conjugação das especificidades de ligação constituintes, por exemplo, as especificidades anti-FcR e anti-PD-L1, utilizando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação da molécula biespecífica pode ser gerada separadamente depois conjugada uma com a outra. Quando as especificidades de ligação são proteínas ou péptidos, uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação podem ser utilizados para conjugação covalente. Exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-

piridiliditio)propionato (SPDP), e sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (veja-se por exemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* N° 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83), e Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). Agentes de conjugação preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis a partir de Chemical Co. (Rockford, IL).

Quando as especificidades de ligação são anticorpos, eles podem ser conjugados através da ligação de sulfidrilo das regiões de dobradiça do terminal C das duas cadeias pesadas. Numa forma de realização particularmente preferida, a região de dobradiça é modificada para conter um número ímpar de resíduos de sulfidrilo, preferivelmente um, antes da conjugação.

Alternativamente, ambas as especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeira. Este método é particularmente útil quando a molécula biespecífica é uma proteína de fusão mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> ou ligando x Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia simples que compreende um anticorpo de cadeia simples e uma determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica de cadeia simples que compreende duas determinantes de ligação. As moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia simples. Métodos para a preparação de moléculas biespecíficas são descritos, por exemplo, no documento de Patente U.S. 5.260.203; documento de Patente U.S. N.º 5.455.030; documento de Patente U.S. N.º 4.881.175; documento de Patente U.S. N.º 5.132.405; documento de Patente U.S. N.º 5.091.513; documento de Patente U.S. N.º 5.476.786; documento de Patente U.S. N.º 5.013.653; documento de

Patente U.S. N.º 5.258.498; e documento de Patente U.S. N.º 5.482.858. A ligação das moléculas biespecíficas aos seus alvos específicos pode ser confirmada através de, por exemplo, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise de FACS, bioensaio (por exemplo, inibição do crescimento), ou ensaio de *Western Blot*. Cada um destes ensaios deteta, geralmente, a presença de complexos de proteína-anticorpo de interesse particular empregando um reagente marcado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os complexos de FcR-anticorpo podem ser detetados utilizando, por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou um fragmento de anticorpo que reconhece e se liga especificamente aos complexos de anticorpo e FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detetados utilizando qualquer de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado de forma radioativa e utilizado num radioimunoensaio (RIA) (veja-se, por exemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, Março, 1986, que é incorporado por referência no presente documento). O isótopo radioativo pode ser detetado por tais meios como a utilização de um contador  $\gamma$  ou um contador de cintilação ou através de autoradiografia.

#### Composições Farmacêuticas

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, que contém um ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção(ões) de ligação a antigénio dos mesmos, da presente invenção, formulados em conjunto com um portador farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem incluir uma ou uma combinação de (por exemplo, dois ou mais diferentes) anticorpos, ou imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de

anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficas) que se ligam a diferentes epítomos no antigénio alvo ou que possuem atividades complementares.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapêutica de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapêutica de combinação pode incluir um anticorpo anti-PD-L1 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente anti-inflamatório ou imunossupressor. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser utilizados em terapêutica de combinação são descritos em maior detalhe abaixo na secção sobre utilizações dos anticorpos da invenção.

Conforme utilizado no presente documento, "portador farmaceuticamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antifúngicos e antibacterianos, agentes de retardamento de absorção e isotónicos, e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o portador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parentérica, espinal ou epidérmica (por exemplo, através de injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, imunoconjugado, ou molécula biespecífica, pode ser revestido num material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto-mãe e que não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (veja-se por exemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácidos incluem aqueles derivados a partir de ácidos inorgânicos

não tóxicos, tais como ácido clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e semelhantes, bem como a partir de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos alifáticos mono ou dicarboxílicos, ácidos alcanoicos substituídos com fenilo, ácidos alcanoicos de hidroxí, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos aromáticos e alifáticos e semelhantes. Sais de adição de bases incluem aqueles derivados a partir de metais alcalino-terrosos, tais como sais de sódio, potássio, magnésio, cálcio e semelhantes, bem como a partir de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e semelhantes.

Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir um antioxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metais, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e semelhantes.

Exemplos de portadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregues nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol, e semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como azeite, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etilo. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de materiais de revestimento, tais

como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula adequado no caso das dispersões, e através da utilização de tensioativos.

Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes e agentes de dispersão. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada por procedimentos de esterilização, *supra*, e através da inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, e semelhantes. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e semelhantes às composições. Adicionalmente, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada através da inclusão de agentes que atrasam a absorção tal como monoestearato de alumínio e gelatina.

Portadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente activas é conhecida na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, a utilização dos mesmos nas composições farmacêuticas da presente invenção é contemplada. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabrico e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada a uma concentração elevada de fármaco. O portador pode ser um solvente ou um meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol líquido, e

semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula adequado no caso das dispersões e através da utilização de tensioativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada através da inclusão na composição de um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária num solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme for necessário, seguido por microfiltração de esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas através da incorporação do composto ativo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados anteriormente. No caso de pós estéreis para a preparação das soluções injectáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são técnicas de secagem a vácuo e secagem por congelamento (liofilização) que produz um pó do ingrediente ativo acrescido de qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução anteriormente esterilizada por filtração do mesmo.

A quantidade de ingrediente activo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma farmacêutica individual variará dependendo do sujeito a ser tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material portador para produzir uma forma farmacêutica individual será, geralmente, aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento,

esta quantidade irá variar desde cerca de 0,01 por cento até cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, preferivelmente desde cerca de 0,1 por cento até cerca de 70 por cento, mais preferivelmente desde cerca de 1 por cento até cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um portador farmacêuticamente aceitável.

Regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único *bolus* pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parentéricas em forma farmacêutica unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma farmacêutica unitária conforme utilizado no presente documento refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o portador farmacêutico necessário. As especificações para as formas farmacêuticas unitárias da invenção são ditadas por, e diretamente dependentes de, (a) as características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de compôr um tal ingrediente ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para administração do anticorpo, as dosagens variam desde cerca de 0,0001 até 100 mg/kg, e mais normalmente 0,01 até 5 mg/kg, do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou dentro do intervalo de 1-10 mg/kg. Um regime de

tratamento exemplar implica a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez cada três a 6 meses. Regimes de dosagem preferidos para um anticorpo anti-PD-L1 da invenção incluem 1 mg/kg de peso corporal ou 3 mg/kg de peso corporal através de administração intravenosa, com o anticorpo a ser administrado utilizando uma das seguintes programações de dosagem: (i) cada quatro semanas durante seis dosagens, depois cada três meses; (ii) cada três semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal uma vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada três semanas.

Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, caso no qual a dosagem de cada anticorpo administrado cai dentro dos intervalos indicados. O anticorpo é normalmente administrado em múltiplas ocasiões. Os intervalos entre dosagens únicas podem ser, por exemplo, semanalmente, mensalmente, a cada três meses ou anualmente. Os intervalos também podem ser irregulares conforme indicado através da medição dos níveis sanguíneos de anticorpo para o antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma concentração plasmática de anticorpo de cerca de 1-1000 mg/ml e em alguns métodos cerca de 25-300 mg/ml.

Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de libertação prolongada, caso no qual é necessária uma administração menos frequente. A dosagem e frequência variam dependendo da semivida do anticorpo no paciente. Em geral, os anticorpos humanos apresentam a semivida mais longa, seguidos por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, é administrada uma dosagem relativamente

baixa em intervalos relativamente pouco frequentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber o tratamento para o resto das suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é, algumas vezes, necessária até que a progressão da doença é reduzida ou terminada, e preferivelmente até que o paciente apresenta melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Posteriormente, o paciente pode ser administrado com um regime profilático.

Os níveis de dosagem atuais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição, e modo de administração particular, sem ser tóxica para o paciente. O nível de dosagem selecionado irá depender de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregues, ou do éster, sal ou amida das mesmas, da via de administração, do momento de administração, da taxa de excreção do composto particular a ser empregue, da duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais utilizados em combinação com as composições particulares empregues, da idade, sexo, peso, condição, saúde geral e historial médico prévio do paciente a ser tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos nas especialidades médicas.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-PD-L1 da invenção resulta preferivelmente numa diminuição na gravidade dos sintomas de doença, um aumento na frequência e duração de períodos de doença livres de sintomas, ou uma prevenção de prejuízo ou incapacidade devido à aflição da doença. Por exemplo, para o tratamento de tumores PD-L1+, uma "dosagem terapeuticamente eficaz"

preferivelmente inibe o crescimento celular ou crescimento tumoral em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 40%, ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 60%, a ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 80% em relação a sujeitos não tratados. A capacidade de um composto para inibir o crescimento tumoral pode ser avaliada num sistema de modelo animal preditivo da eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade do composto para inibir, tal inibição *in vitro* através de ensaios conhecidos para o perito na especialidade. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho tumoral, ou de outra forma melhorar os sintomas num sujeito. Um perito na especialidade seria capaz de determinar tais quantidades com base em tais fatores tal como o tamanho do sujeito, a gravidade dos sintomas do sujeito, e a composição particular ou via de administração selecionada.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada através de uma ou mais vias de administração utilizando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Tal como será apreciado pelo perito na especialidade, a via e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados. Vias de administração preferidas para anticorpos da invenção incluem as vias de administração intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinal ou outras vias de administração parentéricas, por exemplo através de injeção ou infusão. A frase "administração parentérica" conforme utilizada no presente documento significam modos de administração diferente de administração entérica e tópica, normalmente por meio de injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica,

intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

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

Os compostos ativos podem ser preparados com portadores que irão proteger o composto da libertação rápida, tais como formulações de libertação controlada, incluindo implantes, pensos transdérmicos, e sistemas de administração microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, tais como acetato de vinilo de etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos para aqueles peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa forma de realização preferida, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos divulgados nos documentos de Patente U.S. N.ºs 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: o documento de Patente U.S. N.º 4.487.603, que divulga uma bomba de microinfusão implantável para dispensar medicação a uma taxa controlada; o documento de Patente U.S. N.º 4.486.194, que divulga um dispositivo terapêutico para administração de medicamentos através da pele; o documento

de Patente U.S. N° 4.447.233, que divulga uma bomba de infusão de medicação para administrar medicação a uma taxa de infusão precisa; o documento de Patente U.S. N° 4.447.224, que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para distribuição contínua de fármacos; o documento de Patente U.S. N° 4.439.196, que divulga um sistema de distribuição de fármacos tendo compartimentos multi-câmara; e documento de Patente U.S. N° 4.475.196, que divulga um sistema de distribuição de fármacos osmótico. Estas patentes são incorporadas no presente documento como referência. Muitos outros tais implantes, sistemas de distribuição, e módulos são bem conhecidos para os peritos na especialidade.

Em determinadas formas de realização, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para assegurar uma distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematoencefálica (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção atravessem a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabrico de lipossomas, veja-se, por exemplo, os documentos de Patente U.S. N.ºs 4.522.811; 5.374.548; e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais frações que são seletivamente transportadas para dentro de células ou órgãos específicos, aumentando assim a distribuição de fármacos direcionada (veja-se, *por exemplo*, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Frações de direcionamento exemplares incluem folato e biotina (veja-se, *por exemplo*, o documento de Patente U.S. N.º 5.416.016 para Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticorpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); recetor de proteína A tensioativo (Briscoe *et al.* (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) J. Mol.

Chem. 269:9090); veja-se também K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

#### Utilizações e Métodos da Invenção

Os anticorpos e composições de anticorpos da presente invenção possuem numerosas utilidades *in vitro* e *in vivo* que envolvem, por exemplo, a detecção de PD-L1 ou potenciação da resposta imunitária através do bloqueio de PD-L1. Numa forma de realização preferida, os anticorpos da presente invenção são anticorpos humanos. Por exemplo, estas moléculas podem ser administradas a células em cultura, *in vitro* ou *ex vivo*, ou a sujeitos humanos, por exemplo, *in vivo*, para potenciar a imunidade numa variedade de situações. Consequentemente, a resposta imunitária num sujeito pode ser modificada administrando ao sujeito o anticorpo, ou porção de ligação a antigénio do mesmo, da invenção de modo que a resposta imunitária no sujeito é modificada. Preferivelmente, a resposta é potenciada, estimulada ou regulada positivamente.

Conforme utilizado no presente documento, o termo "sujeito" destina-se a incluir animais humanos e não humanos. Animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios, e répteis, embora os mamíferos sejam preferidos, tais como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, vacas e cavalos. Sujeitos preferidos incluem pacientes humanos em necessidade de potenciação de uma resposta imunitária, particularmente pacientes humanos tendo um distúrbio que pode ser tratado através do aumento da resposta imunitária mediada por células T. Células cancerosas *in vivo* podem ser tratadas. Para alcançar uma potenciação da imunidade específica de antigénio, os anticorpos anti-PD-L1 podem ser administrados em conjunto com um antigénio de interesse. Quando os anticorpos contra

PD-L1 são administrados juntamente com outro agente, os dois podem ser administrados em qualquer ordem ou simultaneamente.

Adicionalmente, a presença de antigénio PD-L1 humano numa amostra pode ser detetada, ou a quantidade de antigénio PD-L1 humano medida, colocando a amostra, e uma amostra de controlo, em contacto com um anticorpo monoclonal humano, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, que se liga especificamente ao PD-L1 humano, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção do mesmo e PD-L1 humano. A formação de um complexo é depois detetada, em que uma diferença de formação de complexos entre a amostra comparada com a amostra de controlo é indicativa da presença de antigénio PD-L1 humano na amostra.

#### *Cancro*

O bloqueio de PD-L1 por anticorpos pode potenciar a resposta imunitária frente a células cancerosas no paciente. O PD-L1 não é expresso em células humanas normais, mas é abundante numa variedade de cancros humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:787-9). A interação entre PD-1 e PD-L1 resulta numa diminuição dos linfócitos infiltrantes de tumores, uma diminuição da proliferação mediada por recetor de células T, e evasão imune pelas células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J Mol Med* 81:281-7; Blank *et al.* (2004) *Cancer Immunol. Immunother.* [epub]; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). A supressão imune pode ser invertida inibindo a interação local de PD-L1 para PD-1 e o efeito é aditivo quando a interação de PD-L2 para PD-1 é também bloqueada (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66). Um anticorpo anti-PD-L1 pode ser utilizado isoladamente para inibir o crescimento de tumores cancerosos. Alternativamente, um anticorpo anti-PD-L1 pode ser utilizado em conjunto com outros agentes imunogénicos,

tratamentos padrão contra o cancro, ou outros anticorpos, conforme descrito abaixo.

Consequentemente, o crescimento de células tumorais num sujeito pode ser inibido administrando ao sujeito uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-L1, ou porção de ligação a antígeno do mesmo da invenção. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo anti-PD-L1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos anti-PD-L1 humanos descritos no presente documento). Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-L1 quimérico ou humanizado.

Cancros preferidos cujo crescimento pode ser inibido utilizando os anticorpos da invenção incluem cancros tipicamente responsivos à imunoterapia. Exemplos não limitantes de cancros preferidos para tratamento incluem melanoma (por exemplo, melanoma maligno metastático), cancro renal, cancro prostático, cancro da mama, cancro do cólon e cancro pulmonar. Exemplos de outros cancros que podem ser tratados incluem cancro ósseo, cancro pancreático, cancro cutâneo, cancro da cabeça ou pescoço, melanoma maligno intraocular ou cutâneo, cancro uterino, cancro ovário, cancro retal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro testicular, cancro uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da glândula tiroide, cancro das glândulas paratiroides, cancro da glândula adrenal, sarcoma de tecidos moles, cancro da uretra, cancro do pênis, leucemias agudas ou crónicas incluindo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, cancro da bexiga, cancro dos rins ou ureter, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema

nervoso central (SNC), linfoma do SNC primário, angiogénese tumoral, tumor do eixo da coluna, glioma do tronco cerebral, adenoma pituitário, sarcoma de Kaposi, cancro epidermoide, cancro de células escamosas, linfoma de células T, cancros induzidos pelo ambiente incluindo aqueles induzidos por amianto, e combinações dos ditos cancros. Cancros metastáticos também podem ser tratados, especialmente cancros metastáticos que expressam PD-L1 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Opcionalmente, anticorpos contra PD-L1 podem ser combinados com um agente imunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorais purificados (incluindo moléculas de proteínas, péptidos, e hidratos de carbono recombinantes), células, e células transfetadas com genes que codificam citocinas imunoestimulantes (He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Exemplos não limitantes de vacinais tumorais que podem ser utilizadas incluem péptidos de antígenos de melanoma, tais como péptidos gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 e/ou tirosinase, ou células tumorais transfetadas para expressar a citocina GM-CSF (discutida mais abaixo).

Em seres humanos, alguns tumores foram demonstrados como sendo imunogénicos tais como melanomas. Antecipa-se que ao aumentar o limiar da ativação das células T através do bloqueio de PD-L1, seria de esperar a ativação das respostas tumorais no hospedeiro.

O bloqueio de PD-L1 é provavelmente mais eficaz quando combinado com um protocolo de vacinação. Muitas estratégias experimentais para vacinação contra tumores foram elaboradas (veja-se Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; veja-se também Restifo, N. e Sznol, M., *Cancer Vaccines*,

Ch. 61, pp. 3023-3043 em DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Quinta Edição). Numa destas estratégias, é preparada uma vacina utilizando células tumorais autólogas ou alogénicas. Estas vacinas celulares demonstraram ser mais eficazes quando as células tumorais são transduzidas para expressar GM-CSF. O GM-CSF demonstrou ser um potente ativador da apresentação de antígenos para a vacinação tumoral (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad Sci EUA 90: 3539-43).

O estudo da expressão génica e padrões de expressão génica a larga escala em vários tumores levou à definição dos chamados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, SA (1999) Immunity 10: 281-7). Em muitos casos, estes tumores específicos de antígeno são antígenos de diferenciação expressos nos tumores e na célula a partir da qual o tumor surgiu, por exemplo antígenos de melanócito gp100, antígenos MAGE, e Trp-2. De forma mais importante, muitos destes antígenos podem ser mostrados como sendo alvos de células T específicas de tumores encontradas no hospedeiro. O bloqueio de PD-L1 pode ser utilizado em conjunto com uma coleção de proteínas e/ou péptidos recombinantes expressos num tumor de modo a gerar uma resposta imunitária contra estas proteínas. Estas proteínas são normalmente vistas pelo sistema imunitário como autoantígenos e são portanto tolerantes a eles. O antígeno tumoral também pode incluir a proteína telomerase, que é necessária para a síntese de telómeros de cromossomas e que é expressa em mais de 85% de cancros humanos e em apenas um número limitado de tecidos somáticos (Kim, N et al. (1994) Science 266:2011-2013). (Estes tecidos somáticos podem ser protegidos do ataque imunitário através de vários meios). Os antígenos tumorais também podem ser "neo-antígenos" expressos em células cancerosas devido a mutações somáticas que alteram a sequência das proteínas ou criam proteínas de fusão entre duas sequências

não relacionadas (isto é, bcr-abl no cromossoma Philadelphia), ou idiótipo a partir de tumores de células B.

Outras vacinas tumorais podem incluir as proteínas a partir de vírus implicados em cânceros humanos tais como Vírus do Papiloma Humano (VPH), Vírus da Hepatite (VHB e VHC) e Herpesvírus do Sarcoma de Kaposi (KHSV). Outra forma de antígeno específico de tumor que pode ser utilizado em conjunto com o bloqueio de PD-L1 é proteínas de choque térmico purificadas (HSP) isoladas a partir do próprio tumor. Estas proteínas de choque térmico contêm fragmentos de proteínas a partir de células tumorais e estas HSPs são altamente eficientes na distribuição a células apresentadoras de antígeno para desencadear imunidade frente a tumores (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura, Y. et al. (1997) *Science* 278:117-120).

As células dendríticas (DC) são potentes células apresentadoras de antígeno que podem ser utilizadas para iniciar respostas específicas de antígeno. As DCs podem ser produzidas *ex vivo* e carregadas com vários antígenos de proteínas e péptidos bem como extratos de células tumorais (Nestle, F. et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). As DCs também podem ser transduzidas por meios genéticos para expressar igualmente estes antígenos tumorais. As DCs também foram fusionadas diretamente a células tumorais para os propósitos de imunização (Kugler, A. et al. (2000) *Nature Medicine* 6.:332-336). Como um método de vacinação, a imunização com DC pode ser eficazmente combinada com o bloqueio de PD-L1 para ativar respostas antitumorais mais potentes.

O bloqueio de PD-L1 também pode ser combinado com tratamentos padrão contra o cancro. O bloqueio de PD-L1 pode ser eficazmente combinado com regimes quimioterapêuticos. Nestes casos, pode ser possível reduzir

a dose de reagente quimioterapêutico administrado (Mokyr, M. et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Um exemplo de uma tal combinação é um anticorpo anti-PD-L1 em combinação com decarbazina para o tratamento de melanoma. Outro exemplo de uma tal combinação é um anticorpo anti-PD-L1 em combinação com interleucina-2 (IL-2) para o tratamento de melanoma. O raciocínio científico por trás da utilização combinada do bloqueio de PD-L1 e quimioterapia é que a morte celular, que é uma consequência da ação citotóxica da maioria dos compostos quimioterapêuticos, deveria resultar em níveis aumentados de antígeno tumoral na via de apresentação de antígenos. Outras terapêuticas de combinação que podem resultar em sinergia com o bloqueio de PD-L1 através da morte celular são a radiação, a cirurgia, e a privação hormonal. Cada um destes protocolos cria uma fonte de antígeno tumoral no hospedeiro. Os inibidores da angiogénese podem também ser combinados com o bloqueio de PD-L1. A inibição da angiogénese conduz à morte de células tumorais o que podem alimentar antígeno tumoral às vias de apresentação de antígenos do hospedeiro.

Anticorpos de bloqueio de PD-L1 podem também ser utilizados em combinação com anticorpos biespecíficos que direcionam células efectoras que expressam recetor Fc alfa ou Fc  $\gamma$  para células tumorais (veja-se, por exemplo, os documentos de Patente U.S. N.ºs 5.922.845 e 5.837.243). Anticorpos antigénicos podem ser utilizados para direcionar dois antígenos separados. Por exemplo anticorpos biespecíficos anti-recetor Fc/anti antígenos tumorais (por exemplo, Her-2/neu) foram utilizados para direcionar macrófagos para locais de tumor. Este direcionamento pode ser ativar de forma mais eficaz as respostas específicas de tumor. O ramo de células T desta resposta seria aumentado através da utilização do bloqueio de PD-L1. Alternativamente, o antígeno pode ser distribuído diretamente às DCs através da utilização de anticorpos

biespecíficos que se ligam a antígenos tumorais e um marcador de superfície celular específico de células dendríticas.

Os tumores evitam a vigilância imunitária do hospedeiro através de uma grande variedade de mecanismos. Muitos destes mecanismos podem ser superados pela inativação de proteínas que são expressas pelos tumores e as quais são imunossupressivas. Estas incluem, entre outras, TGF-beta (Kehrl, J. *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), e ligando Fas (Hahne, M. *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). Anticorpos contra cada uma destas entidades podem ser utilizados em combinação com anti-PD-L1 para contrariar os efeitos do agente imunossupressor e favorecer as respostas imunitárias tumorais por parte do hospedeiro.

Outros anticorpos que podem ser utilizados para ativar a responsividade imunitária do hospedeiro podem ser utilizados em combinação com anti-PD-L1. Estes incluem moléculas na superfície de células dendríticas que ativam a função de DC e apresentação de antígenos. Anticorpos anti-CD40 são capazes de substituir eficazmente para a atividade auxiliar das células T (Ridge, J. *et al.* (1998) *Nature* 393: 474-478) e podem ser utilizados em conjunto com anticorpos para PD-L1 (Ito, N. *et al.* 201 (5) 527-40). A ativação de anticorpos para moléculas co-estimuladoras de células T tais como OX-40 (Weinberg, A. *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), e ICOS (Hutloff, A. *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) bem como anticorpos que bloqueiam a atividade de moléculas co-estimuladoras negativas tais como CTLA-4 (por exemplo, documento de Patente U.S. N.º 5.811.097) ou BTLA (Watanabe, N. *et al.* (2003) *Nat Immunol* 4:670-9), B7-H4 (Sica, GL *et al.* (2003) *Immunity* 18:849-61) também podem proporcionar níveis aumentados de ativação de células T.

O transplante de medula óssea tem sido utilizado atualmente para tratar uma variedade de tumores de origem hematopoiética. Enquanto a doença de enxerto contra hospedeiro é uma consequência deste tratamento, pode ser obtido benefício de respostas de enxerto contra tumor. O bloqueio de PD-L1 pode ser utilizado para aumentar a eficácia das células T específicas de tumor enxertadas do dador.

Também existem vários protocolos de tratamento experimentais que envolvem a ativação *ex vivo* e expansão de células T específicas de antígeno e transferência adotiva destas células em recetores de modo a produzir células T específicas de antígeno contra tumores (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Estes métodos também podem ser utilizados para ativar as respostas de células T contra agentes infecciosos tais como o CMV. Pode-se esperar que a ativação *ex vivo* na presença de anticorpos anti-PD-L1 aumente a frequência e atividade das células T transferidas de forma adotiva.

#### *Doenças Infecciosas*

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para tratar pacientes que foram expostos a toxinas ou agentes patogênicos particulares. Consequentemente, uma doença infecciosa num sujeito pode ser tratada através da administração ao sujeito de um anticorpo anti-PD-L1, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo da invenção, de modo que o sujeito é tratado para a doença infecciosa. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano anti-PD-L1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos humanos anti-PD-L1 descritos no presente documento). Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

De forma semelhante à sua aplicação a tumores conforme discutido anteriormente, o bloqueio de PD-L1 mediado por anticorpos pode ser utilizado isoladamente, ou como um

adjuvantes, em combinação com vacinas, para estimular a resposta imunitária contra agentes patogénicos, toxinas, e auto-antígenos. Exemplos de agentes patogénicos para os quais esta abordagem terapêutica pode ser particularmente útil, incluem agentes patogénicos para os quais não existe atualmente qualquer vacina eficaz, ou agentes patogénicos para os quais as vacinas convencionais são menos do que completamente eficazes. Estes incluem, mas não estão limitados a VIH, Hepatite (A, B, e C), gripe, herpes, giardíase, malária, leishmaniose, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. O bloqueio de PD-L1 é particularmente útil contra infeções estabelecidas por agentes tais como VIH que apresentam antígenos alterados ao longo do curso da infeção. Estes novos epítomos são reconhecidos como exógenos no momento da administração de anti-PD-L1 humano, provocando assim uma forte resposta de células T que não é atenuada por sinais negativos através do PD-L1.

Alguns exemplos de vírus patogénicos que causam infeções tratáveis por anticorpos da invenção incluem VIH, hepatite (A, B, ou C), herpesvírus (por exemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, e CMV, vírus Epstein Barr), adenovírus, vírus da gripe, flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus coxsackie, coronavírus, vírus sincicial respiratório, vírus da parotidite, rotavírus, vírus do sarampo, vírus da rubéola, parvovírus, vírus vaccínia, vírus HTLV, vírus da dengue, vírus do papiloma, vírus molluscum, poliovírus, vírus da raiva, vírus JC e vírus da encefalite arboviral.

Alguns exemplos de bactérias patogénicos que causam infeções tratáveis por anticorpos da invenção incluem clamídia, bactérias rickettsiais, micobactérias, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos e conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos, cólera, tétano, botulismo, antrax, peste, leptospirose, e bactérias da

doença de Lyme.

Alguns exemplos de fungos patogénicos que causam infeções tratáveis por anticorpos da invenção incluem *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Género Mucorales (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Alguns exemplos de parasitas patogénicos que causam infeções tratáveis por anticorpos da invenção incluem *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondi*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Em todos os métodos anteriores, o bloqueio de PD-L1 pode ser combinado com outras formas de imunoterapia tal como tratamento com citocinas (por exemplo, interferões, GM-CSF, G-CSF, IL-2), ou terapêutica com anticorpos biespecíficos. que proporciona uma apresentação potenciada de antígenos tumorais (veja-se, por exemplo, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad Sci. EUA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

#### *Reações Autoimunes*

Anticorpos anti-PD-L1 da invenção podem provocar e amplificar respostas autoimunes. De facto, a indução de respostas antitumorais utilizando vacinas de péptidos e células tumorais revela que muitas respostas antitumorais envolvem reatividades autoimunitárias (despigmentação observada em melanoma 16 modificado por anti-CTLA-4+GM-CSF em van Elsas et al. supra; despigmentação em ratinhos vacinados com Trp-2 (Overwijk, W. et al. (1999) Proc. Natl. Acad Sci. EUA 96: 2982-2987); prostatite autoimune provocada por vacinas de células tumorais TRAMP (Hurwitz,

A. (2000) supra ), vacinação com antígeno de péptido de melanoma e vitiligo observados em ensaios clínicos em seres humanos (Rosenberg, SA e White, DE (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(1): 81-4).

Desta forma, é possível considerar a utilização do bloqueio anti-PD-L1 na conjunção com várias autoproteínas de modo a elaborar protocolos de vacinação para gerar de forma eficaz respostas imunitárias contra estas autoproteínas para tratamento de doenças. Por exemplo, A doença de Alzheimer envolver a acumulação inapropriada de péptido A $\beta$  em depósitos amiloides no cérebro; as respostas de anticorpo contra a amiloide são capazes de eliminar estes depósitos amiloides (Schenk et al., (1999) Nature 400: 173-177).

Outras autoproteínas também podem ser utilizadas como alvos tais como IgE para o tratamento de alergia e asma, e TNF $\alpha$  para artrite reumatoide. Finalmente, as respostas de anticorpos contra várias hormonas podem ser induzidas através da utilização de anticorpos anti-PD-L1. As respostas de anticorpos neutralizantes contra hormonas reprodutivas podem ser utilizadas em contraceção. A resposta de anticorpos neutralizantes contra hormonas e outros fatores solúveis que são necessários para o crescimento de tumores particulares também se pode considerar como possíveis alvos terapêuticos.

Métodos análogos conforme descrito acima para a utilização do anticorpo anti-PD-L1 podem ser utilizados para a indução das respostas terapêuticas autoimunes para tratar pacientes tendo uma acumulação inapropriada de outros autoantígenos, tais como depósitos amiloides, incluindo A $\beta$  na doença de Alzheimer, citocinas tais como TNF $\alpha$  e IgE.

#### *Vacinas*

Os anticorpos anti-PD-L1 da invenção podem ser utilizados para estimular respostas imunitárias específicas

de antígeno através da coadministração de um tal anticorpo anti-PD-L1 com um antígeno de interesse (por exemplo, uma vacina). Consequentemente, uma resposta imunitária contra um antígeno num sujeito pode ser potenciada administrando ao sujeito: (i) o antígeno; e (ii) um anticorpo anti-PD-L1, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, da invenção de modo que uma resposta imunitária contra o antígeno no sujeito é potenciada. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano anti-PD-L1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos humanos anti-PD-L1 descritos no presente documento). Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado. O antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno a partir de um agente patogénico. Exemplos não limitantes de tais antígenos incluem aqueles discutidos nas secções acima, tais como os antígenos tumorais (ou vacinas tumorais) discutidos acima, ou antígenos a partir dos vírus, bactérias ou outros agentes patogénicos descritos acima.

Os anticorpos anti-PD-L1 também podem ser utilizados para anular efeitos secundários associados com doenças tais como doença debilitante e colite suprimida por células T (Kanai et al. (2003) J. Immunol. 171:4156-63). Consequentemente, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para anular a infiltração de leucócitos, diminuir a produção de IFN- $\gamma$ , IL-2, e IFN- $\alpha$  por células T. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano anti-PD-L1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos humanos anti-PD-L1 descritos no presente documento). Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

Os anticorpos anti-PD-L1 também podem ser utilizados para tratar doenças tais como doenças inflamatórias crónicas, tais como líquen plano, uma doença mucocutânea inflamatória crónica mediada por células T (Youngnak-

Piboonratanakit et al. (2004) Immunol Letters 94:215-22). Consequentemente, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para anular a doença inflamatória crónica por células T. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo humano anti-PD-L1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos humanos anti-PD-L1 descritos no presente documento). Adicionalmente ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

Vias de administração adequadas para administração das composições de anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais humanos, moléculas biespecíficas e multiespecíficas e imunoconjugados) da invenção *in vivo* e *in vitro* são bem conhecidas na técnica e podem ser seleccionadas pelos peritos na especialidade. Por exemplo, as composições de anticorpo podem ser administradas através de injeção (por exemplo, intravenosa ou subcutânea). As dosagens adequadas das moléculas utilizadas irão depender da idade e peso do sujeito e da concentração e/ou formulação da composição de anticorpo.

Conforme descrito anteriormente, os anticorpos anti-PD-L1 da invenção podem ser coadministrados com um ou mais agentes terapêuticos, por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressor. O anticorpo pode estar ligado ao agente (como um imunocomplexo) ou pode ser administrado em separado do agente. No último caso (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, depois ou simultaneamente com o agente ou pode ser coadministrado com outras terapêuticas conhecidas, por exemplo, uma terapêutica anti-cancro. por exemplo, radiação. Tais agentes terapêuticos incluem, entre outros, agentes antineoplásicos tais como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina, cisplatina, carmustina, clorambucilo, e ciclofosfamida hidroxureia, os quais, por eles próprios, são apenas eficazes a níveis que são tóxicos

ou subtóxicos para um paciente. A cisplatina é administrada por via intravenosa como 100 mg/dose uma vez a cada quatro semanas e a adriamicina é administrada por via intravenosa como uma dose de 60-75 mg/ml uma vez a cada 21 dias. A coadministração dos anticorpos anti-PD-L1 humanos, ou fragmentos de ligação a anticorpos dos mesmos, da presente invenção com agentes quimioterapêuticos proporciona dois agentes anti-cancro que funcionam através de diferentes mecanismos que produzem um efeito citotóxico em células tumorais humanas. Uma tal coadministração pode resolver problemas devido ao desenvolvimento de resistência aos fármacos ou uma alteração na antigenicidade das células tumorais que poderia torná-las não reativas com o anticorpo.

Também são divulgados no presente documento kits que compreendem as composições de anticorpos da invenção (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas biespecíficas ou multiespecíficas, ou imunoconjugados) e instruções para utilização. O kit pode conter adicionalmente, pelo menos, um reagente adicional, ou um ou mais anticorpos humanos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo humano tendo uma atividade complementar que se liga a um epítopo no antígeno PD-L1 distinta do primeiro anticorpo humano). Os kits incluem, tipicamente, um rótulo que indica a utilização a que se destina o conteúdo do kit. O termo rótulo inclui qualquer texto, ou material gravado fornecido sobre ou com o kit, ou que de outra forma acompanha o kit.

A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser entendidos como adicionalmente limitantes. O anticorpo 12A4 é um anticorpo de acordo com a presente invenção.

### **Exemplos**

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

##### **Antígeno**

Os protocolos de imunização utilizaram como antígeno ambos (i) uma proteína de fusão recombinante que compreende a porção extracelular de PD-L1, e (ii) PD-L1 de comprimento completo ligado a membrana. Ambos os antígenos foram gerados através de métodos de transfeção recombinante numa linha celular CHO.

#### Ratinhos transgênicos (colônia KM-Mouse®)

Anticorpos monoclonais totalmente humanos contra PD-L1 foram preparados utilizando a estirpe KM de ratinhos transcromossômicos transgênicos, que expressa genes de anticorpos humanos. Nesta estirpe de ratinhos, o gene de cadeia leve kappa de ratinho endógeno foi homozigoticamente interrompido conforme descrito em Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12:811-820 e o gene de cadeia pesada de ratinho endógeno foi homozigoticamente interrompido conforme descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Além disso, esta estirpe de ratinho carrega um transgene de cadeia leve kappa humano, KCo5, conforme descrito em Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, e um transcromossoma SC20 conforme descrito na Publicação PCT WO 02/43478.

#### Imunizações de KM-Mouse®

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos contra PD-L1, uma coorte de ratinhos da estirpe KM-Mouse® foi imunizada com PD-L1-Ig recombinante purificada e células CHO transfetadas com PD-L1 como antígeno. Esquemas gerais de imunização para ratinhos HuMab estão descritos em Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 e Publicação PCT WO 98/24884. Os ratinhos tinham 6-16 semanas de idade aquando da primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno PD-L1-Ig e  $5-10 \times 10^6$  células foram utilizadas para imunizar os ratinhos HuMab por via intraperitoneal (IP), subcutânea (Sc) ou através de injeção na almofada plantar.

Ratinhos transgênicos foram imunizados duas vezes com antígeno em adjuvante completo de Freund ou adjuvante de Ribí por via IP, seguido de 3-21 dias IP (até um total de 11 imunizações) com o antígeno em adjuvante incompleto de Freund ou adjuvante de Ribí. A resposta imunitária foi monitorizada através de sangrias retro-orbitárias. O plasma foi rastreado por ELISA (conforme descrito abaixo), e os ratinhos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-PD-L1 foram utilizados para fusões. Os ratinhos foram reforçados por via intravenosa com antígeno 3 dias antes de serem sacrificados e da remoção do baço. Tipicamente, foram realizadas 10-15 fusões para cada antígeno. Várias dúzias de ratinhos foram imunizados para cada antígeno.

Seleção de KM-Mouse® que Produzem Anticorpos Anti-PD-L1:

Para selecionar ratinhos HuMab que produzem anticorpos que se ligam a PD-L1, soros de ratinhos imunizados foram testados por ELISA conforme descrito por Fishwild, D. *et al.* (1996). De forma breve, placas de microtitulação foram revestidas com proteína de fusão de PD-L1 recombinante purificada a partir de células CHO a 1-2 µg/ml em PBS, 100 µl/poços incubadas a 4 °C durante a noite e depois bloqueadas com 200 µl/poço de soro fetal bovino a 5% em PBS/Tween (0,05%). As diluições de soros a partir de ratinhos imunizados com PD-L1 foram adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase de rábano (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois da lavagem, as placas foram reveladas com substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) e analisadas por espectrofotômetro a DO de 415-495. Os ratinhos que desenvolveram os títulos mais elevados de anticorpos anti-PD-L1 foram utilizados para fusões. As fusões foram realizadas conforme descrito abaixo e sobrenadantes de hibridoma foram testados em relação à atividade anti-PD-L1

através de ELISA.

Geração de Hibridomas que Produzem Anticorpos Monoclonais Contra PD-L1:

Os esplenocitos de ratinho, isolados a partir de ratinhos KM, foram fusionados com PEG a uma linha celular de mieloma de ratinho com base em protocolos padrão. Os hibridomas resultantes foram depois rastreados em relação à produção de anticorpos específicos de antígeno. Suspensões de célula única de esplenocitos a partir de ratinhos imunizados foram fusionadas com um quarto do número de células de mieloma de ratinho não secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com PEG a 50% (Sigma). As células foram colocadas em placas a aproximadamente  $1 \times 10^5$ /poço em placas de microtitulação de fundo plano, seguidas por uma incubação de cerca de duas semanas em meio seletivo contendo soro fetal bovino a 10%, meio condicionado com P388D1 a 10% (ATCC, CRL TIB-63), origem a 3-5% (IGEN) em DMEM (Mediatech, CRL 10013, com glucose, L-glutamina e piruvato de sódio elevados) mais HEPES a 5 mM, 2-mercaptoetanol a 0,055 mM, gentamicina a 50 mg/ml e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio no qual a HAT foi substituída com HT. Poços individuais foram depois rastreados por ELISA (descrito acima) em relação a anticorpos IgG monoclonais humanos anti-PD-L1. Uma vez que ocorreu o crescimento extenso de hibridomas, o meio foi monitorizado, normalmente, após 10-14 dias. Os hibridomas secretores de anticorpos foram colocados novamente em placas, rastreados de novo e, se ainda eram positivos para IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 foram subclonados pelo menos duas vezes através de diluição limitante. Os subclones estáveis foram depois ser cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpos em meio de cultura tecidual para caracterização adicional.

Os clones de hibridoma 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10,

1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 foram selecionados para análise posterior.

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

As sequências de ADNc que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13G4 foram obtidas a partir dos hibridomas 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, e 13GA, respetivamente, utilizando técnicas de PCR padrão e foram sequenciadas utilizando técnicas de sequenciação de ADN padrão.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 3G10 são mostradas na Figura 1A e na SEQ ID NO:81 e 1, respetivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 3G10 são mostradas na Figura 1B e na SEQ ID NO:91 e 11, respetivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 3G10 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 3G10 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-8, um segmento D não determinado, e um segmento JH de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da sequência de V<sub>H</sub> de 3G10 para a sequência de VH 1-18 de linha germinal é mostrado na Figura 11. A análise adicional da sequência de VH de 3G10 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 1A e 11, e nas SEQ ID NOs:21, 31 e 41, respetivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 3G10 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 3G10 utiliza um segmento VL de linha

germinal humana VK L6 e um segmento JK de linha germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência de  $V_L$  de 3G10 para a sequência de VK L6 é mostrado na Figura 21. A análise adicional da sequência de VL de 3G10 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 1B e 21, e nas SEQ ID NOs:51, 61 e 71, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12A4 são mostradas na Figura 2A e na SEQ ID NO:82 e 2, respectivamente.

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

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 12A4 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 12A4 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-69, um segmento D de linha germinal humana 3-10, e um segmento JH de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da sequência de  $V_H$  de 12A4 para a sequência de VH 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 12. A análise adicional da sequência de VH de 12A4 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 2A e 12, e nas SEQ ID NOs:22, 32 e 42, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 12A4 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 12A4 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK L6 e um segmento JK de linha germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência de  $V_L$  de 12A4 para a sequência de VK L6 é mostrado na Figura 22. A análise adicional da sequência de VL de 12A4 utilizando o sistema

de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 2B e 22, e nas SEQ ID NOs:52, 62 e 72, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 10A5 são mostradas na Figura 3A e na SEQ ID NO:83 e 3, respectivamente.

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

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 10A5 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 10A5 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-3, um segmento D de linha germinal humana 5-5, e um segmento JH de linha germinal humana JH 4b. O alinhamento da sequência de  $V_H$  de 10A5 para a sequência de VH 1-3 de linha germinal é mostrado na Figura 13. A análise adicional da sequência de VH de 10A5 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 3A e 13, e nas SEQ ID NOs:23, 33, e 43, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 10A5 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 10A5 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VL L15 e um segmento JK de linha germinal humana JK 2. O alinhamento da sequência de  $V_L$  de 10A5 para a sequência de VK L15 é mostrado na Figura 23. A análise adicional da sequência de VL de 10A5 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 3B e 23, e nas SEQ ID NOs:53, 63, e 73, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 5F8 são mostradas na Figura 4A e na SEQ ID NO:84 e 4, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 5F8 são mostradas na Figura 4B e na SEQ ID NO:94 e 14, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 5F8 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 5F8 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-69, um segmento D de linha germinal humana 6-13, e um segmento JH de linha germinal humana JH 4b. O alinhamento da sequência de VH de 5F8 para a sequência de VH 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 14. A análise adicional da sequência de VH de 5F8 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 4A e 14, e nas SEQ ID NOs:24, 34, e 44, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 5F8 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 5F8 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK A27 e um segmento JK de linha germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência de VL de 5F8 para a sequência de VK A27 é mostrado na Figura 24. A análise adicional da sequência de VL de 5F8 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 4B e 24, e nas SEQ ID NOs:54, 64, e 74, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 10H10 são mostradas na Figura 5A e na SEQ ID NO:85 e 5, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região

variável de cadeia leve de 10H10 são mostradas na Figura 5B e na SEQ ID NO:95 e 15, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 10H10 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 10H10 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 3-9, um segmento D de linha germinal humana 4-17, e um segmento JH de linha germinal humana JH 4b. O alinhamento da sequência de  $V_H$  de 10H10 para a sequência de VH 3-9 de linha germinal é mostrado na Figura 15. A análise adicional da sequência de VH de 10H10 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 5A e 15, e nas SEQ ID NOS:25, 35, e 45, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 10H10 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 10H10 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK L15 e um segmento JK de linha germinal humana JK 2. O alinhamento da sequência de  $V_L$  de 10H10 para a sequência de VK L15 é mostrado na Figura 25. A análise adicional da sequência de VL de 10H10 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 5B e 25, e nas SEQ ID NOS:55, 65, e 75, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 1 B12 são mostradas na Figura 6A e na SEQ ID NO:86 e 6, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 1 B12 são mostradas na Figura 6B e na SEQ ID NO:96 e 16, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 1B12 com as sequências de cadeia pesada de

imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 1B12 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-69, um segmento D de linha germinal humana 3-10, e um segmento JH de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da sequência de  $V_H$  de 1B12 para a sequência de VH 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 16. A análise adicional da sequência de VH de 1B12 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 6A e 16, e nas SEQ ID NOs:26, 36, e 46, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 1B12 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 1B12 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK L6 e um segmento JK de linha germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência de  $V_L$  de 1B12 para a sequência de VK L6 é mostrado na Figura 26. A análise adicional da sequência de VL de 1B12 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 6B e 26, e nas SEQ ID NOs:56, 66, e 76, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 7H1 são mostradas na Figura 7A e na SEQ ID NO:87 e 7, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 7H1 são mostradas na Figura 7B e na SEQ ID NO:97 e 17, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 7H1 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 7H1 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-69, um segmento D de linha germinal humana 3-10 e um segmento JH de linha germinal humana JH

6b. O alinhamento da sequência de  $V_H$  de 7H1 para a sequência de VH 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 17. A análise adicional da sequência de VH de 7H1 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 7A e 17, e nas SEQ ID NOs:27, 37, e 47, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 7H1 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 7H1 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK L6 e um segmento JK de linha germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência de  $V_L$  de 7H1 para a sequência de VK L6 é mostrado na Figura 27. A análise adicional da sequência de VL de 7H1 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 7B e 27, e nas SEQ ID NOs:57, 67, e 77, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 11 E6 são mostradas na Figura 4A e na SEQ ID NO:84 e 4, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 11 E6 são mostradas na Figura 4B e na SEQ ID NO:94 e 14, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 11 E6 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 11 E6 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 11-69, um segmento D de linha germinal humana 6-19, e um segmento JH de linha germinal humana JH 6c. O alinhamento da sequência de  $V_H$  de 11 E6 para a sequência de VH 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 18. A análise adicional da sequência de VH de 11 E6 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR

levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 8A e 18, e nas SEQ ID NOs:28, 38, e 48, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 11 E6 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 11 E6 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK A27 e um segmento JK de linha germinal humana JK 4. O alinhamento da sequência de V<sub>L</sub> de 11 E6 para a sequência de VK A27 é mostrado na Figura 27. A análise adicional da sequência de VL de 11 E6 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve conforme mostrado nas Figuras 8B e 28, e nas SEQ ID NOs:58, 68, e 78, respectivamente. Adicionalmente, um segundo clone relacionado incluiu a sequência de VK conforme mostrado na SEQ ID NO: 109. Este anticorpo é indicado no presente documento como 11 E6a.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 12B7 são mostradas na Figura 9A e na SEQ ID NO:89 e 9, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia leve de 12B7 são mostradas na Figura 9B e na SEQ ID NO:99 e 19, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 12B7 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 12B7 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 1-69, um segmento D de linha germinal humana 3-10, e um segmento JH de linha germinal humana JH 6b. O alinhamento da sequência de V<sub>H</sub> de 12B7 para a sequência de VH 1-69 de linha germinal é mostrado na Figura 19. A análise adicional da sequência de VH de 12B7 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de

cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 9A e 19, e nas SEQ ID NOs:29, 39, e 49, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 12B7 com as sequências de cadeia leve de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 12B7 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VK L6 e um segmento JK de linha germinal humana JK 5. O alinhamento da sequência de V<sub>L</sub> de 12B7 para a sequência de VK L6 é mostrado na Figura 29. A análise adicional da sequência de VL de 12B7 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 9B e 29, e nas SEQ ID NOs:59, 69, e 79, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de 13G4 são mostradas na Figura 10A e na SEQ ID NO:90 e 10, respectivamente.

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

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia pesada de 13G4 com as sequências de cadeia pesada de imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia pesada de 13G4 utiliza um segmento VH de linha germinal humana VH 3-9, um segmento D de linha germinal humana 3-9, e um segmento JH de linha germinal humana JH 4b. O alinhamento da sequência de V<sub>H</sub> de 13G4 para a sequência de VH 3-9 de linha germinal é mostrado na Figura 20. A análise adicional da sequência de VH de 13G4 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 10A e 20, e nas SEQ ID NOs:30, 40, e 50, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina de cadeia leve de 13G4 com as sequências de cadeia leve de

imunoglobulina de linha germinal conhecidas demonstrou que a cadeia leve de 13G4 utiliza um segmento VL de linha germinal humana VL L18 e um segmento JK de linha germinal humana JK 3. O alinhamento da sequência de V<sub>L</sub> de 13G4 para a sequência de VK L18 é mostrado na Figura 30. A análise adicional da sequência de VL de 13G4 utilizando o sistema de Kabat de determinação de região CDR levou ao delineamento das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada conforme mostrado nas Figuras 10B e 30, e nas SEQ ID NOs:60, 70, e 80, respectivamente.

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

Neste exemplo, a afinidade de ligação e cinética de ligação de anticorpos anti-PD-L1 foram examinadas por análise Biacore. A especificidade de ligação, e competição cruzada foram examinadas através de citometria de fluxo.

Afinidade de ligação e cinética

Os anticorpos anti-PD-L1 foram caracterizados em relação às afinidades e cinéticas de ligação através de análise Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suécia). A proteína de fusão de PD-L1 recombinante purificada foi ligada covalentemente a um chip CM5 (chip revestido com carboxi metil dextrano) através de amins primárias, utilizando química de acoplamento de amins padrão e um kit proporcionado por Biacore, até uma densidade de 562 RUs. A ligação foi medida fluindo os anticorpos em tampão HBS EP (proporcionado por Biacore AB) a uma concentração de 133 nM numa taxa de fluxo de 50 µl/min. A cinética de associação de antigénio-anticorpo foi seguida durante 1 minuto e a cinética de dissociação foi seguida durante 1 minuto. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas a um modelo de ligação de Langmuir utilizando software BIAevaluation (Biacore AB). Para minimizar os efeitos da avidéz na estimativa das constantes de ligação, apenas o

segmento inicial de dados correspondentes às fases de associação e dissociação foram utilizados para o ajuste. Os valores de  $K_D$ ,  $k_{on}$  e  $k_{off}$  que foram determinados são mostrados no Quadro 2.

Quadro 2. Dados de ligação Biacore para anticorpos monoclonais humanos para PD-L1.

N.º da amostra	ID da amostra	$K_D$ de afinidade $\times 10^{-9}$ (M)	Taxa de associação $k_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	Taxa de dissociação $k_{off} \times 10^{-4}$ 1/s
1	3G10	3,39	5,25	17,8
3	10A5	1,45	2,58	3,72

Dados de ligação adicionais obtidos a partir do método de ligação de equilíbrio e analisados em GraphPad Prism são mostrados no Quadro 3.

Quadro 3. Dados de ligação de equilíbrio Biacore para anticorpos monoclonais humanos para PD-L1.

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

#### Especificidade de ligação através de citometria de fluxo

Linhas celulares de ovário de hamster chinês (CHO) que expressam PD-L1 recombinante humano na superfície celular foram desenvolvidas e utilizadas para determinar a especificidade de anticorpos monoclonais humanos para PD-L1 através de citometria de fluxo. As células CHO foram transfetadas com plasmídeos de expressão contendo formas

transmembranares de PD-L1 que codificam ADNc de comprimento completo. A ligação dos anticorpos monoclonais humanos 3G10, 10A5, e 12A4 anti-PD-L1 foi avaliada incubando as células transfetadas com o anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1. As células foram lavadas e a ligação foi detetada com um Ac anti-IgG humana marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando um FACScan de citometria de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, CA). A ligação foi comparada com a linha celular CHO-mãe. Os resultados são mostrados nas Figuras 32A (HuMab 3G10), 32B (HuMab 10A5) e 32C (HuMab 12A4). A ligação também foi testada utilizando várias concentrações de um anticorpo anti-PD-L1. Os resultados são mostrados na Figura 33. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 10A5, e 12A4 ligam-se às células CHO transfetadas com PD-L1 de uma forma dependente da concentração. Estes dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 se ligam especificamente a PD-L1 da superfície celular.

#### Especificidade de ligação através de ELISA

A especificidade dos anticorpos monoclonais anti-PD-L1 foi determinada utilizando um ensaio ELISA padrão em relação à ligação a uma fusão de PD-L1 humano com uma região Fc de imunoglobulina.

Uma proteína de fusão Fc de PD-L1 humano foi testada em relação à ligação contra os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 12A4, e 10A5. Foram realizados procedimentos de ELISA padrão. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 foram adicionais em diferentes concentrações. Anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico de cadeia kappa) conjugado com peroxidase de rábano (HRP) foi utilizado como anticorpo secundário. Os resultados são mostrados na Figura 34. Cada um dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 3G10, 12A4, e 10A5 ligaram-se com elevada especificidade ao PD-L1.

**Exemplo 4: Caracterização de ligação de anticorpo anti-PD-L1 a PD-L1 expresso na superfície celular de células T de ser humano e macaco**

Os anticorpos anti-PD-L1 foram testados através de citometria de fluxo em relação à ligação a células T de macaco cinomolgo ou de ser humano ativadas que expressam PD-L1 na sua superfície.

As células T de ser humano ou macaco foram ativadas por anticorpo anti-CD3 para induzir a expressão de PD-L1 antes da ligação com um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1. A ligação dos anticorpos monoclonais humanos 3G10, 1B12, 13G4, e 12A4 anti-PD-L1 foi avaliada incubando as células ativadas com diluições seriadas dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1. Um anticorpo de controlo de isotipo foi utilizado como o controlo negativo. As células foram lavadas e a ligação foi detetada com um Ac anti-cadeia leve kappa de Ig humana marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando um citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são mostrados na Figura 35 e 36. Os anticorpos monoclonais 3G10, 1 B12, 13G4, e 12A4 anti-PD-L1 ligaram-se a células T de ser humano e macaco ativadas. Estes dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 se ligam a PD-L1 de superfície celular de ser humano e macaco.

**Exemplo 5: Caracterização de ligação de anticorpo anti-PD-L1 a PD-L1 expresso na superfície celular de células T de ser humano**

Anticorpos anti-PD-L1 foram testados em relação à ligação a células T humanas ativadas que expressam PD-L1 na sua superfície celular, através de citometria de fluxo.

As células T de ser humano foram ativadas por anticorpo anti-CD3 para induzir a expressão de PD-L1 nas células T antes da ligação com um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1. A ligação dos anticorpos monoclonais

humanos 3G10, 10A5 e 12A4 anti-PD-L1 foi avaliada incubando as células T ativadas com os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 a uma concentração de 20 µg/ml. Um anticorpo de controlo de isotipo foi utilizado como o controlo negativo. As células foram lavadas e a ligação foi detetada com um Ac anti-IgG humana marcado com FITC. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando um citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são mostrados nas Figuras 37A (HuMab 3G10), 37B (HuMab 10A5) e 37C (HuMab 12A4). Os anticorpos monoclonais 3G10, 10A5, e 12A4 ligaram-se a células T humanas ativadas (linha em negrito), conforme mostrado em traçados de histograma em comparação com controlo (linha sem negrito). Estes dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 se ligam a PD-L1 de superfície celular de ser humano.

**Exemplo 6: Especificidade de ligação através de citometria de fluxo**

A linha celular de carcinoma ovárico humano ES-2 que expressa PD-L1 recombinante humano na superfície celular foi utilizada para determinar a especificidade de anticorpos monoclonais humanos para PD-L1 através de citometria de fluxo. Células ES-2 foram tratadas durante a noite com 500 UI/ml de hIFN-γ recombinante para aumentar a expressão de PD-L1 ao longo do nível basal. A ligação dos anticorpos monoclonais humanos 12A4, 1 B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11 E6, e 5F8 anti-PD-L1 foi avaliada incubando as células induzidas com diluições séricas do anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1. As células foram lavadas e a ligação foi detetada com um Ac anti-IgG humana marcado com PE. As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando um citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). A ligação foi comparada com anticorpo de controlo de isotipo. Os resultados são mostrados nas Figuras 38. Os anticorpos monoclonais humanos 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, e 5F8 anti-PD-L1

ligaram-se às células ES-2 induzidas com hIFN- $\gamma$  de uma forma dependente da concentração. Estes dados demonstram que os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 se ligam especificamente a PD-L1 da superfície celular.

**Exemplo 7: Efeito de anticorpos humanos anti-PD-L1 na proliferação celular e produção de citocinas numa Reação Linfocitária Mista**

Uma reação linfocitária mista foi empregue para demonstrar o efeito do bloqueio da via de PD-L1/PD-1 em células efectoras linfocitárias. As células T no ensaio foram testadas em relação à proliferação, secreção de IFN- $\gamma$  e secreção de IL-2 na presença ou ausência de um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1.

Células T CD4<sup>+</sup> humanas foram purificadas a partir de PBMC utilizando um kit de seleção positiva de CD4<sup>+</sup> (Dynal Biotech). As células dendríticas foram derivadas a partir de monócitos purificados cultivados com 1000 U/ml de IL-4 e 500 U/ml de GM-CSF (R&D Biosystems) durante sete dias.

Os monócitos foram preparados utilizando um kit de seleção negativa de monócitos (Mitenyi Biotech). Cada cultura continha 10<sup>5</sup> células T purificadas e 10<sup>4</sup> células dendríticas alogénicas num volume total de 200  $\mu$ l. Anticorpos monoclonais 10A5, 12A4, ou 3G10 anti-PD-L1 foram adicionados a cada cultura em diferentes concentrações de anticorpo. Ou nenhum anticorpo ou um anticorpo de controlo de isotipo foi utilizado como um controlo negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37 °C. Após o dia 5, 100  $\mu$ l de meio foram retirados de cada cultura para medição de citocinas. Os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2 foram medidos usando kits de ELISA OptEIA (BD Biosciences). As células foram marcadas com <sup>3</sup>H-timidina, cultivadas durante mais 18 horas, e analisadas em relação à proliferação celular. Os resultados são mostrados nas Figuras 39A (proliferação de células T), 39B (secreção de IFN- $\gamma$  usando HuMAb 10A5), 39C (secreção de IFN- $\gamma$  usando HuMAb 12A4 ou

3G10) e 39D (secreção de IL-2). O anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 10A5 promove a proliferação de células T, a secreção de IFN- $\gamma$  e secreção de IL-2 de um modo dependente da concentração. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 12A4 e 3G10 também mostraram um aumento na secreção de IFN- $\gamma$ . Em contraste, as culturas contendo o anticorpo de controlo não mostraram um aumento na proliferação de células T, secreção de IFN- $\gamma$  ou de IL-2.

Numa experiência separada, uma reação linfocitária mista (MLR) alogénica foi utilizada para demonstrar o efeito do bloqueio da via de PD-L1/PD-1 em células efetoras linfocitárias. As células T no ensaio foram testadas em relação à proliferação e a secreção de IFN- $\gamma$  na presença ou ausência de um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 ou um anticorpo de controlo de isotipo.

As células T CD4<sup>+</sup> humanas foram purificadas a partir de PBMC utilizando um kit de seleção negativa de CD4<sup>+</sup> (Miltenyi). Os monócitos foram preparados utilizando um kit de seleção negativa de monócitos (Miltenyi Biotec). As células dendríticas foram derivadas a partir de monócitos purificados cultivados com 1000 U/ml de IL-4 e 500 U/ml de GM-CSF (R&D Biosystems) durante sete dias. Cada cultura de MLR continha 10<sup>5</sup> células T purificadas e 10<sup>4</sup> células dendríticas alogénicas num volume total de 200  $\mu$ l. Foram adicionados anticorpos monoclonais 12A4, 11 E6, 3G10, 13G4, 1B12, 10A5 e 12B7 anti-PD-L1 a cada cultura em diferentes concentrações de anticorpo. Ou nenhum anticorpo ou um anticorpo de controlo de isotipo foi utilizado como um controlo negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37 °C. No dia 5, 50  $\mu$ l de meio foi retirado de cada cultura para medição de citocinas e substituídos com um volume igual de meio de cultura contendo 1  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina. As células foram cultivadas por mais 18 horas, colhidas e analisadas em relação à proliferação celular. Os níveis de IFN- $\gamma$  no fluido de cultura foram medidos

utilizando um kit de ELISA de hIFN- $\gamma$  OptEIA (BD Biosciences). Os resultados são mostrados na Figura 40. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 promovem a proliferação de células T e a secreção de IFN- $\gamma$  de um modo dependente da concentração. Em contraste, as culturas contendo o anticorpo de controlo não mostraram um aumento na proliferação de células T ou secreção de IFN- $\gamma$ .

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

As células T reguladoras (CD4+, CD25+) são linfócitos que suprimem a resposta imunitária. O efeito da adição de células T reguladoras sobre a proliferação e a secreção de IFN- $\gamma$  em células dendríticas alogénicas e MLR de células T na presença ou ausência de um anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 foi testado.

Células T reguladoras foram purificadas a partir de PBMC utilizando um kit de isolamento de células T reguladoras CD4+ CD25+ (Miltenyi Biotec). Células T reguladoras foram adicionadas a uma reação linfocitária mista (veja-se acima) contendo células T CD4+ CD25- purificadas e células dendríticas alogénicas numa razão de 2:1 de CD4+ CD25- para células T reguladoras. Anticorpo monoclonal anti-PD-L1 10A5 foi adicionado a cada cultura a uma concentração de 10  $\mu$ g/ml. Ou nenhum anticorpo ou um anticorpo de controlo de isotipo foi utilizado como um controlo negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37 °C, altura em que os sobrenadantes foram analisados quanto à secreção de IFN- $\gamma$  usando um sistema de deteção de citocinas Beadlyte (Upstate). As células foram marcadas com  $^3$ H-timidina, cultivadas durante mais 18 horas, e analisadas em relação à proliferação celular. Os resultados são mostrados nas Figuras 41A (proliferação de células T) e 41 B (secreção de IFN- $\gamma$ ). A adição de anticorpo monoclonal humano anti-PD-L1 10A5 promove a proliferação de células T e secreção de IFN- $\gamma$  em culturas

celulares de células dendríticas alogénicas, células T e células T reguladoras, indicando que os anticorpos anti-PD-L1 podem reverter o efeito de células T reguladoras na MLR de DC alogénicas e células T.

Numa experiência separada, os anticorpos humanos anti-PD-L1 12A4 e 13G4, e um anticorpo de controlo 1D12, foram testados no ensaio de MLR com células T reguladoras. Os resultados são mostrados nas Figuras 42 (proliferação de células T) e 43 (secreção de IFN- $\gamma$ ). A adição de anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 12A4 ou 13G4 inverte parcialmente a supressão de ambas a proliferação de células T e da secreção de IFN- $\gamma$  em culturas celulares de células dendríticas alogénicas e células T contendo células T-reguladoras, indicando que os anticorpos anti-PD-L1 podem ter um efeito sobre as células T-reguladoras.

**Exemplo 9: Efeito de anticorpos anti-PD-1 na secreção de citocinas por células PBMC estimuladas por antígeno viral a partir de um dador responsivo positivo a CMV**

PBMC humanas responsivas a antígeno de CMV (Astarte Biologics, Redmond, WA) foram cultivadas a  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços tratadas com TC de fundo plano, na presença de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de lisado de CMV (Astarte Biologics) +/- anticorpos anti-PD-L1 titulados. Meio AIM-V (Invitrogen) suplementado com FBS inativado por calor (10% final) foi usado num volume total de 200  $\mu\text{l}$ /poço. As células foram cultivadas durante 4 dias a 37 °C, CO<sub>2</sub> a 5%, altura em que o sobrenadante da cultura foi colhido para determinação do interferão- $\gamma$  secretado através de ELISA (kit de ELISA de hIFN- $\gamma$  OptEIA - BD Biosciences). Os resultados são mostrados na Figura 44. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 promovem a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T específicas de CMV de uma forma dependente da dose. A resposta mais robusta foi gerada pelos anticorpos 13G4, 1 B12, 12A4 em comparação com o controlo de isotipo. Estes resultados mostram que os HuMabs anti-PD-

L1 podem estimular a libertação de IFN- $\gamma$  numa resposta de células T de memória a partir de células PBMC previamente estimuladas contra um antígeno.

**Exemplo 10: Bloqueio da ligação de ligando PD-L1 por anticorpos anti-PD-L1 humanos**

Anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 foram testados quanto à capacidade de bloquear a ligação do ligando PD-L1 a PD-1 expresso em células CHO transfetadas utilizando um ensaio de citometria celular.

Células CHO que expressam PD-1 foram suspensas em tampão FACS (PBS com soro fetal bovino a 4%). Várias concentrações dos HuMAbs anti-PD-L1 3G10, 10A5 ou 12A4 foram adicionadas aos tubos de suspensão celular a 4 °C durante 30 minutos, seguido pela adição de PD-L1 marcado com FITC fusionado com uma região Fc de imunoglobulina. As análises citométricas foram realizadas utilizando um citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados estão representados na Figura 45. Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 3G10, 10A5, 12A4 bloquearam a ligação de PD-L1 a células CHO transfetadas com PD-1 humano, tal como medido pela intensidade de fluorescência média (MFI) da coloração. Estes dados demonstram que os HuMAbs anti-PD-L1 bloqueiam a ligação de ligando PD-L1 a PD-1 de superfície celular.

**Exemplo 11: Inibição da ligação de PD-1 solúvel a PD-L1 de superfície celular por anticorpos anti-PD-L1 humanos.**

Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-L1 foram testadas para a capacidade de bloquear a ligação de uma versão solúvel dimérica do recetor PD-1 (PD-1-hFc) a PD-L1 expresso em células de carcinoma ovárico humano ES-2 induzidas por hIFN- $\gamma$  utilizando um ensaio de citometria de fluxo. O bloqueio foi comparado com o anticorpo de controlo de isotipo.

Células ES-2 foram induzidas durante a noite com 500 UI/ml de hIFN- $\gamma$  para regular positivamente a expressão na

superfície celular de hPD-L1. As células induzidas foram suspensas em tampão FACS. Diluições em série dos HuMAbs anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, e 5F8 foram adicionadas aos tubos de suspensão de células a 4 °C durante 30 minutos, seguido por duas lavagens para remover anticorpo não ligado. Em seguida adicionou-se proteína PD-1-hFc a uma constante de 2 µg/ml a todos os poços a 4 °C durante 30 minutos, seguido por duas lavagens para remover PD-1-hFc não ligada. Em seguida, PD-1-Fc ligada foi detetada nas células ES-2 por adição HuMab 26D5 anti-PD-L1 não bloqueante biotinilado, que se liga a PD-1, quando ligado a PD-L1, a 4 °C durante 30 minutos, seguido por duas lavagens para remover o anticorpo não ligado. Finalmente, o anticorpo 26D5 ligado foi detetado por adição de conjugado de estreptavidina-PE a 4 °C durante 30 minutos, seguido por duas lavagens para remover o conjugado não ligado. A análise de citometria de fluxo foi realizada utilizando um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados estão representados na Figura 46. Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, e 5F8 bloquearam a ligação de PD-1 a células ES-2 que expressam PD-L1 humano, como medido pela intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) da coloração. Estes dados demonstram que os HuMAbs anti-PD-L1 bloqueiam a ligação de recetor PD-1 solúvel a PD-L1 de superfície.

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

Ratinhos implantados com um tumor canceroso são tratados *in vivo* com anticorpos anti-PD-L1 para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos sobre o crescimento do tumor. Para os estudos tumorais, ratinhos AJ fêmeas entre 6-8 semanas de idade (Harlan Laboratories) são distribuídas aleatoriamente por peso em 6 grupos. Os ratinhos são implantados subcutaneamente no flanco direito com  $2 \times 10^6$

células de fibrossarcoma SA1/N dissolvidas em 200 µl de meio DMEM no dia 0. Os ratinhos são tratados com veículo de PBS, ou anticorpos anti-PD-L1 a 10 mg/kg. Os animais são administrados com doses através de injeção intraperitoneal com aproximadamente 200 µl de PBS contendo anticorpo ou veículo nos dias 1, 4, 8 e 11. Cada grupo contém 10 animais e os grupos consistem em: (i) um grupo de veículo, (ii) IgG de ratinho de controlo, e (iii) um anticorpo anti-PD-L1. Os ratinhos são monitorados duas vezes por semana para o crescimento do tumor durante cerca de 6 semanas. Utilizando um calibre eletrónico, os tumores são medidos em três dimensões (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor é calculado. Os ratinhos são sacrificados quando os tumores atingiram o ponto final do tumor (1500 mm<sup>3</sup>) ou apresentaram mais do que 15% de perda de peso.

**Exemplo 13: Eficácia in vivo da Terapêutica de Combinação (anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-L1) no Crescimento e Estabelecimento Tumoral**

Células cancerosas colorretais MC38 (disponíveis a partir de Dr. N. Restifo, National Cancer Institute, Bethesda, MD; ou Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD) foram implantadas em ratinhos C57BL/6 (2 x 10<sup>6</sup> células/ratinho) e selecionadas para o tratamento quando os tumores atingiram um tamanho de 100-200 mm<sup>3</sup>). No dia 0 (isto é, o primeiro dia de tratamento), cada um dos quatro grupos de 10 ratinhos foi injetado por via intraperitoneal (IP) com um dos seguintes: (1) 10 mg/kg de IgG de ratinho e 10 mg/kg de IgG de rato (controlo), (2) 10 mg/kg de anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 9D9 (anticorpo de ratinho anti-CTLA-4 de ratinho, obtido a partir de J. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nova Iorque, NY) e 10 mg / kg de IgG de rato, (3) anticorpo monoclonal anti-PD-L1 MIH5 (anticorpo de rato anti-PD-L1 de ratinho, eBioscience) e 10 mg/kg de IgG de ratinho, ou (4) 10 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 9D9 e 10 mg/kg de

anticorpo anti-PD-L1 MIH5. As injeções de anticorpo foram, depois adicionalmente administradas nos dias 3 e 6. Usando um calibre eletrónico, os tumores foram medidos em três dimensões (altura x largura x comprimento) e o volume tumoral foi calculado. Os ratinhos foram sacrificados quando os tumores atingiram um ponto final de tumor designado. Os resultados são mostrados na Figura 47.

Este estudo indica que, no modelo de tumor de murino MC38, o tratamento com anticorpo anti-PD-L1 sozinho tem um efeito modesto no crescimento tumoral, resultando num atraso do crescimento do tumor enquanto o anti-CTLA-4 tem pouco efeito neste modelo. Contudo, o tratamento de combinação anticorpo para CTLA-4 e anticorpo para PD-L1 tem um efeito significativamente maior no crescimento tumoral e resulta em ratinhos livres de tumor.

#### **Exemplo 14: Imunohistoquímica Utilizando Anticorpos Anti-PD-L1**

Para avaliar o perfil de ligação a tecidos dos HuMab anti-PD-L1, 12A4, 13G4, 3G10 e 12B7 não modificados foram examinados num painel de tecidos humanos normais (não neoplásicos), incluindo baço, amígdalas, cérebro, cerebelo, coração, fígado, pulmão, rim, pâncreas, hipófise, pele e intestino delgado, bem como tecidos de carcinoma pulmonar (1 amostra/cada). Células ES-2 foram utilizadas como controlo positivo. Hu-IgG1 e Hu-IgG4 foram usados como anticorpos de controlo do isotipo.

Tecidos tumorais e normais embebidos em OCT e congelados rapidamente foram adquiridos da Cooperative Human Tissue Network (Filadélfia, PA) ou National Disease Research Institute (Filadélfia, PA). Seções crioestáticas a 5 µm foram fixadas com acetona durante 10 min à temperatura ambiente, e armazenadas a -80 °C até à sua utilização. Um protocolo de imunohistoquímica desenvolvido por Medarex foi realizado usando HuMab anti-PD-L1 não modificado através de pré-complexação dos anticorpos primários (12A4, 13G4, 3G10

e 12B7) e do anticorpo secundário (fragmento Fab conjugado com FITC de cabra anti-IgG humana. Jackson ImmunoResearch Laboratories. West Grove, PA) antes de aplicação nas secções. De forma breve, 1 µg/ml ou 5 µg/ml dos anticorpos primários não conjugados foram misturados com um excesso de 3 vezes de anticorpo secundário, respetivamente, e incubados durante 30 min à temperatura ambiente, e, em seguida, excesso de gamaglobulina humana foi adicionado durante mais 30 min para bloquear o anticorpo secundário não ligado. Em paralelo, os anticorpos de controlo de isotipo Hu-IgG, ou Hu-IgG4 foram pré-complexados da mesma maneira. As lâminas foram lavadas com PBS (Sigma, St. Louis, MO) duas vezes, e depois incubadas com bloqueio de peroxidase fornecido em Dako EnVision+System (Dako. Carpinteria, CA) durante 10 minutos. Após duas lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com bloqueio de proteína Dako para bloquear os sítios de ligação não específicos. Subsequentemente, o pré-complexo de anticorpos primários ou controlos de isotipos foram aplicados sobre secções e incubados durante 1 h. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo de ratinho anti-FITC (20 µg/ml. Sigma) durante 30 min. Depois de mais três lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o polímero de anticorpo anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase fornecido no Dako EnVision+System durante 30 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas como acima e reagidas com solução de substrato-cromogénio DAB fornecida no Dako Envision+System durante 6 min. As lâminas foram depois lavadas com água desionizada, contracoradas com hematoxilina de Mayer (Dako), desidratadas, clarificadas e cobertas com lâminas com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) seguindo o procedimento histológico de rotina.

Uma coloração fraca a moderada foi observada em células ES-2, bem como em células tumorais de tecidos de carcinoma pulmonar. Em secções de amígdala, foi observada

uma coloração forte em epitélio das criptas que se encontra fortemente infiltrado por células linfoides, mas não nas células epiteliais escamosas estratificadas mucosas. Uma coloração moderada foi observada em algumas células na região interfolicular, e uma coloração muito fraca foi observada em células grandes espalhadas (células semelhantes a retículo dendrítico) no centro germinativo. No pulmão, uma coloração fraca foi encontrada nos macrófagos alveolares. Os padrões de coloração nos tecidos das amígdalas e pulmão foram igualmente observados em secções de imunohistoquímica usando mAb anti-PD-L1 comercial (eBiosciences. San Diego, CA). Houve uma coloração geral menos intensa pelos HuMabs, especialmente para a coloração nos centros germinativos. No baço, uma imunorreatividade fraca difusa na polpa vermelha encontrava-se um pouco acima da coloração de fundo. Adicionalmente, uma coloração fraca a moderada foi exibida em células do tipo de Kupffer no fígado e em células espalhadas em placas de Peyer, bem como em células semelhantes a macrófagos dispersas e fibroblastos principalmente na região focal da muscularis externa do intestino delgado.

Em tecidos de cerebelo, cérebro, coração, rim, pâncreas, hipófise e de pele, não foi observada uma coloração significativa quando corados com todos os quatro HuMabs anti-PD-L1. Nenhuma diferença evidente na coloração foi observada entre estes quatro anticorpos, exceto 12B7 e/ou 3G10 que exibiram uma coloração ligeiramente mais forte no fígado e em células ES-2.

Resumo de Anticorpos para PD-L1

SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA	SEQ ID NO:	SEQUÊNCIA
1	VH a.a. 3G10	26	VH CDR1 a.a. 1B12
2	VH a.a. 12A4	27	VH CDR1 a.a. 7H1
3	VH a.a. 10A5	28	VH CDR1 a.a. 11E6
4	VH a.a. 5F8	29	VH CDR1 a.a. 12B7

5	VH a.a. 10H10	30	VH CDR1 a.a. 13G4
6	VH a.a. 1B 12		
7	VH a.a. 7H1	31	VH CDR2 a.a. 3G10
8	VH a.a. 11E6	32	VH CDR2 a.a. 12A4
9	VH a.a. 12B7	33	VH CDR2 a.a. 10A5
10	VH a.a. 13G4	34	VH CDR2 a.a. 5F8
		35	VH CDR2 a.a. 10H10
11	VK a.a. 3G10	36	VH CDR2 a.a. 1B12
12	VK a.a. 12A4	37	VH CDR2 a.a. 7H1
13	VK a.a. 10A5	38	VH CDR2 a.a. 11E6
14	VK a.a. 5F8	39	VH CDR2 a.a. 12B7
15	VK a.a. 10H10	40	VH CDR2 a.a. 13G4
16	VK a.a. 1B12		
17	VK a.a. 7H1	41	VH CDR3 a.a. 3G10
18	VK a.a. 11E6	42	VH CDR3 a.a. 12A4
19	VK a.a. 12B7	43	VH CDR3 a.a. 10A5
20	VK a.a. 13G4	44	VH CDR3 a.a. 5F8
		45	VH CDR3 a.a. 10H10
21	VH CDR1 a.a. 3G10	46	VH CDR3 a.a. 1B12
22	VH CDR1 a.a. 12A4	47	VH CDR3 a.a. 7H1
23	VH CDR1 a.a. 10A5	48	VH CDR3 a.a. 11E6
24	VH CDR1 a.a. 5F8	49	VH CDR3 a.a. 12B7
25	VH CDR1 a.a. 10H10	50	VH CDR3 a.a. 13G4
51	VK CDR1 a.a. 3G10	79	VK CDR3 a.a. 12B7
52	VK CDR1 a.a. 12A4	80	VK CDR3 a.a. 13G4
53	VK CDR1 a.a. 10A5		

54	VK CDR1 a.a. 5F8	81	VH n.t. 3G10
55	VK CDR1 a.a. 10H10	82	VH n.t.12A4
56	VK CDR1 a.a. 1B12	83	VH n.t. 10A5
57	VK CDR1 a.a. 7H1	84	VH n.t. 5F8
58	VK CDR1 a.a. 11E6	85	VH n.t. 10H10
59	VK CDR1 a.a. 12B7	86	VH n.t. 1B12
60	VK CDR1 a.a. 13G4	87	VH n.t. 7H1
		88	VH n.t. 11E6
61	VK CDR2 a.a. 3G10	89	VH n.t. 12B7
62	VK CDR2 a.a. 12A4	90	VH n.t. 13G4
63	VK CDR2 a.a. 10A5		
64	VK CDR2 a.a. 5F8	91	VK n.t. 3G10
65	VK CDR2 a.a. 10H10	92	VK n.t. 12A4
66	VK CDR2 a.a. 1B12	93	VK n.t. 10A5
67	VK CDR2 a.a. 7H1	94	VK n.t. 5F8
68	VK CDR2 a.a. 11E6	95	VK n.t. 10H10
69	VK CDR2 a.a. 12B7	96	VK n.t. 1B12
70	VK CDR2 a.a.	97	VK n.t. 7H1

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

**DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

**Documentos de patente referidos na descrição**

- EP 1537878 A1 [0004]
- US 5225539 A, Winter [0060] [0096]
- US 5530101 A [0060] [0065] [0096]
- US 5585089 A [0060] [0065] [0096]
- US 5693762 A [0060] [0065] [0096]
- US 6180370 A, Queen [0060] [0065] [0096]
- US 20030153043 A, Carr [0070]
- US 5677425 A, Bodmer [0072]
- US 6165745 A, Ward [0073]
- US 6277375 B, Ward [0074]
- US 5869046 A [0074]
- US 6121022 A, Presta [0074]
- US 5624821 A [0075]
- US 5648260 A, Winter [0075]
- US 6194551 B, Idusogie [0076]
- WO 9429351 A, Bodmer [0077]
- WO 0042072 A, Presta [0078]
- US 5714350 A [0079]
- US 6350861 A, Co [0079]
- US 20040110704 A, Yamane [0080]
- EP 1176195 A, Hanai [0080]
- WO 03035835 A, Presta [0080]
- WO 9954342 A, Umana [0080]
- EP 0154316 A, Nishimura [0081]
- EP 0401384 A, Ishikawa [0081]

- WO 02092780 A, Short [0086]
- WO 03074679 A, Lazar [0086]
- US 4816567 A, Cabilly [0096]
- US 5545806 A [0098]
- US 5569825 A [0098]
- US 5625126 A [0098]
- US 5633425 A [0098]
- US 5789650 A [0098]
- US 5877397 A [0098]
- US 5661016 A [0098]
- US 5814318 A [0098]
- US 5874299 A [0098]
- US 5770429 A, Lonberg and Kay [0098]
- US 5545807 A, Surani [0098]
- WO 9203918 A [0098]
- WO 9312227 A [0098]
- WO 9425585 A [0098]
- WO 9713852 A [0098]
- WO 9824884 A [0098] [0104] [0206]
- WO 9945962 A, Lonberg and Kay [0098]
- WO 01114424 A, Korman [0098]
- WO 0243478 A, Ishida [0099] [0205]
- US 5939598 A [0100]
- US 6075181 A [0100]
- US 6114598 A [0100]
- US 6150584 A [0100]
- US 6162963 A, Kucherlapati [0100]
- US 5223409 A [0102]
- US 5403484 A [0102]
- US 5571698 A, Ladner [0102]
- US 5427908 A [0102]
- US 5580717 A, Dower [0102]
- US 5969108 A [0102]
- US 6172197 A, McCafferty [0102]
- US 5885793 A [0102]

- US 6521404 A [0102]
- US 6544731 A [0102]
- US 6555313 A [0102]
- US 6582915 A [0102]
- US 6593081 A, Griffiths [0102]
- US 5476996 A [0103]
- US 5698767 A, Wilson [0103]
- WO 0114424 A [0104]
- US 4399216 A [0111]
- US 4634665 A [0111]
- US 5179017 A, Axel [0111]
- WO 8704462 A [0113]
- WO 8901036 A [0113]
- EP 338841 A [0113]
- US 4946778 A, Ladner [0137]
- WO 8800052 A, Fanger [0139]
- US 4954617 A [0139]
- WO 9410332 A [0139]
- US 5260203 A [0145]
- US 5455030 A [0145]
- US 4881175 A [0145]
- US 5132405 A [0145]
- US 5091513 A [0145]
- US 5476786 A [0145]
- US 5013653 A [0145]
- US 5258498 A [0145]
- US 5482858 A [0145]
- US 5399163 A [0166]
- US 5383851 A [0166]
- US 5312335 A [0166]
- US 5064413 A [0166]
- US 4941880 A [0166]
- US 4790824 A [0166]
- US 4596556 A [0166]
- US 4487603 A [0166]

- US 4486194 A [0166]
- US 4447233 A [0166]
- US 4447224 A [0166]
- US 4439196 A [0166]
- US 4475196 A [0166]
- US 4522811 A [0167]
- US 5374548 A [0167]
- US 5399331 A [0167]
- US 5416016 A, Low [0167]
- US 5922845 A [0181]
- US 5837243 A [0181]
- US 5811097 A [0183]
- WO 0109187 A [0205]

#### Documentos de não patente citados na descrição

- **HUTLOFF et al.** *Nature*, 1999, vol. 397, 263266 [0001]
- **HANSEN et al.** *Immunogenics*, 1980, vol. 10, 247-260 [0001]
- **FREEMAN et al.** *J Exp Med*, 2000, vol. 192, 1027-34 [0001]
- **LATCHMAN et al.** *Nat Immunol*, 2001, vol. 2, 261-8 [0001]
- **CARTER et al.** *Eur J Immunol*, 2002, vol. 32, 634-43 [0001]
- **OHIGASHI et al.** *Clin Cancer Res*, 2005, vol. 11, 294753 [0001]
- **IWAI et al.** *PNAS*, 2002, vol. 99, 12293-7 [0002] [0171]
- **OHIGASHI et al.** *Clin Cancer Res*, 2005, vol. 11, 2947-53 [0002]
- **DONG et al.** *Nat Med*, 2002, vol. 8, 793-800 [0002]
- **KANAI et al.** *J Immunol*, 2003, vol. 171, 4156-63 [0002]
- **KOGA et al.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, vol. 24, 2057-2062 [0003]
- **BLANK et al.** *Cancer Research*, 2004, vol. 64, 1140-1145 [0003]
- **BARBER et al.** *Nature*, 2006, vol. 439, 682-687 [0005]
- **BROWN et al.** *J. Immunol.*, vol. 170 (3), 1257-1266 [0005]
- **WARD et al.** *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0027]

- **BIRD et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0027]  
[0093]
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85,  
5879-5883 [0027] [0093]
- **KABAT, E. A. et al.** Sequences of Proteins of  
Immunological Interest. NIH Publication No. 91-3242, 1991  
[0047] [0062] [0091] [0092]
- **E. MEYERS; W. MILLER.** *Comput. Appl. Biosci*, 1988, vol. 4,  
11-17 [0057]
- **NEEDLEMAN ; WUNSCH.** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 444-453  
[0057]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-10  
[0058]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25 (17),  
3389-3402 [0058]
- **RIECHMANN, L. et al.** *Nature*, 1998, vol. 332, 323-327  
[0060]
- **JONES, P. et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0060]
- **QUEEN, C. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, vol.  
86, 10029-10033 [0060]
- **TOMLINSON, I. M. et al.** The Repertoire of Human Germline  
VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with  
Different Hypervariable Loops. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol.  
227, 776-798 [0062]
- **COX, J. P. L. et al.** A Directory of Human Germ-line VH  
Segments Reveals a Strong Bias in their Usage. *Eur. J.*  
*Immunol.*, 1994, vol. 24, 827-836 [0062]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25,  
3389-3402 [0063]
- **SHIELDS, R.L. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276,  
6591-6604 [0078]
- **YAMANE-OHNUKI et al.** *Biotechnol Bioeng*, 2004, vol. 87,  
614-22 [0080]
- **SHIELDS, R.L. et al.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277,  
26733-26740 [0080]

- **UMANA et al.** *Nat. Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180 [0080]
- **TARENTINO, A.L. et al.** *Biochem.*, 1975, vol. 14, 5516-23 [0080]
- Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, 1987 [0087]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0093]
- **KOHLER; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0094]
- **LONBERG et al.** *Nature*, 1994, vol. 368 (6474), 856-859 [0098]
- **LONBERG, N.** Handbook of Experimental Pharmacology. 1994, vol. 113, 49-101 [0098]
- **LONBERG, N. ; HUSZAR, D.** *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0098]
- **HARDING, F. ; LONBERG, N.** *Ann. N.Y. Acad Sci.*, 1995, vol. 764, 536-546 [0098]
- **TAYLOR, L. et al.** *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20, 6287-6295 [0098]
- **CHEN, J. et al.** *International Immunology*, 1993, vol. 5, 647-656 [0098]
- **TUAILLON et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 3720-3724 [0098]
- **CHOI et al.** *Nature Genetics*, 1993, vol. 4, 117-123 [0098]
- **CHEN, J. et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 821-830 [0098]
- **TUAILLON et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 2912-2920 [0098]
- **TAYLOR, L. et al.** *International Immunology*, 1994, vol. 6, 579-591 [0098]
- **FISHWILD, D. et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851 [0098] [0104] [0206]
- **TOMIZUKA et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 2000, vol. 97, 722-727 [0101]
- **KUROIWA et al.** *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20, 889-894 [0101]
- **LONBERG, N. et al.** *Nature*, 1994, vol. 368 (6474), 856-859 [0104] [0206]

- **MORRISON, S.** *Science*, 1985, vol. 229, 1202 [0108]
- **GOEDDEL.** *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology.* Academic Press, 1990, vol. 185 [0110]
- **TAKEBE, Y. et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 466-472 [0110]
- **BOSS, M. A. ; WOOD, C. R.** *Immunology Today*, 1985, vol. 6, 12-13 [0112]
- **URLAUB ; CHASIN.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216-4220 [0113]
- **R. J. KAUFMAN ; P. A. SHARP.** *Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621 [0113]
- **MARSHALL et al.** *Annu Rev Biochem*, 1972, vol. 41, 673-702 [0121]
- **GALA FA ; MORRISON SL.** *J Immunol*, 2004, vol. 172, 5489-94 [0121]
- **WALLICK et al.** *J Exp Med*, 1988, vol. 168, 1099-109 [0121]
- **SPIRO RG.** *Glycobiology*, 2002, vol. 12, 43R-56R [0121]
- **PAREKH et al.** *Nature*, 1985, vol. 316, 452-7 [0121]
- **MIMURA et al.** *Mol Immunol*, 2000, vol. 37, 697-706 [0121]
- **JANINI et al.** *Electrophoresis*, 2002, vol. 23, 1605-11 [0123]
- **MA et al.** *Chromatographia*, 2001, vol. 53, S75-89 [0123]
- **HUNT et al.** *J Chromatogr A*, 1998, vol. 800, 355-67 [0123]
- **KRISHNAMURTHY R ; MANNING MC.** *Curr Pharm Biotechnol*, 2002, vol. 3, 361-71 [0124]
- **CHEN et al.** *Pharm Res*, 2003, vol. 20, 1952-60 [0124]
- **GHIRLANDO et al.** *Immunol Lett*, 1999, vol. 68, 47-52 [0124]
- **MURRAY et al.** *J. Chromatogr Sci*, 2002, vol. 40, 343-9 [0124]
- **ALEXANDER AJ ; HUGHES DE.** *Anal Chem*, 1995, vol. 67, 3626-32 [0125]
- **SAITO, G. et al.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, vol. 55, 199-215 [0130]
- **TRAIL, P.A. et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 2003,

vol. 52, 328-337 [0130]

- **PAYNE, G.** *Cancer Cell*, 2003, vol. 3, 207-212 [0130]
- **ALLEN, T.M.** *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, 750-763 [0130]
- **PASTAN, I. ; KREITMAN, R. J.** *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2002, vol. 3, 1089-1091 [0130]
- **SETER, P.D. ; SPRINGER, C.J.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, vol. 53, 247-264 [0130]
- Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy. **ARNON et al.** *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 243-56 [0133]
- Antibodies For Drug Delivery. **HELLSTROM et al.** *Controlled Drug Delivery*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 623-53 [0133]
- Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review. **THORPE et al.** *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*. 1985, 475-506 [0133]
- Analysis, Results, And Future Prospective Of the Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy. *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*. Academic Press, 1985, 303-16 [0133]
- **THORPE et al.** The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates. *Immunol. Rev.*, 1982, vol. 62, 119-58 [0133]
- **GRAZIANO, RF. et al.** *J. Immunol*, 1995, vol. 155 (10), 4996-5002 [0139]
- **MORTON, H.C. et al.** *Critical Reviews in Immunology*, 1996, vol. 16, 423-440 [0140]
- **MONTEIRO, RC. et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1764 [0140]
- **KARPOVSKY et al.** *J. Exp. Med.*, 1984, vol. 160, 1686 [0143]
- **LIU, MA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol 82, 8648 [0143]
- **PAULUS.** *Behring Ins. Mitt. No. 78*, 1985, 118-132 [0143]
- **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81-83

[0143]

- GLENNIE et al. *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 2367-2375

[0143]

- WEINTRAUB, B. Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques. The Endocrine Society, March 1986 [0145]

- BERGE, S.M. et al. *J. Pharm. Sci.*, 1977, vol. 66, 1-19

[0149]

- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, Inc, 1978 [0165]

- V.V. RANADE. *J. Clin. Pharmacol*, 1989, vol. 29, 685

[0167]

- UMEZAWA et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, vol. 153, 1038 [0167]

- P.G. BLOEMAN et al. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 357, 140

[0167]

- M. OWAIS et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, vol. 39, 180 [0167]

- BRISCOE et al. *Am. J. Physiol.*, 1995, vol. 1233, 134

[0167]

- SCHREIER et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 9090

[0167]

- K. KEINANEN ; M.L. LAUKKANEN. *FEBS Lett.*, 1994, vol. 346, 123 [0167]

- J.J. KILLION ; I.J. FIDLER. *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 273 [0167]

- DONG et al. *Nat Med*, 2002, vol. 8, 787-9 [0171]

- DONG et al. *J Mol Med*, 2003, vol. 81, 281-7 [0171]

- BLANK et al. *Cancer Immunol. Immunother*, 2004 [0171]

- KONISHI et al. *Clin. Cancer Res.*, 2004, vol. 10, 5094-100 [0171]

- BROWN et al. *J.Immunol.*, 2003, vol. 170, 1257-66 [0171]

- IWAI et al. *Int. Immunol.*, 2005, vol. 17, 133-144 [0173]

- HE et al. *J. Immunol.*, 2004, vol. 173, 4919-28 [0174]

- ROSENBERG, S. Development of Cancer Vaccines. ASCO

Educational Book Spring, 2000, 60-62 [0176]

- **LOGOTHETIS, C.** ASCO Educational Book Spring. 2000, 300-302 [0176]
- **DEVELOPMENT OF CANCER VACCINES.** ASCO Educational Book Spring, 2000, 414-428 [0176]
- **FOON, K.** DEVELOPMENT OF CANCER VACCINES. ASCO Educational Book Spring, 2000, 730-738 [0176]
- **Cancer: Principles and Practice of Oncology. RESTIFO, N. ; SZNOL, M. et al.** Cancer Vaccines. 1997, 3023-3043 [0176]
- **DRANOFF et al.** *Proc. Natl. Acad Sci US.A.*, 1993, vol. 90, 3539-43 [0176]
- **ROSENBERG, SA.** *Immunity*, 1999, vol. 10, 281-7 [0177]
- **KIM, N et al.** *Science*, 1994, vol. 266, 2011-2013 [0177]
- **SUOT, R; SRIVASTAVA, P.** *Science*, 1995, vol. 269, 1585-1588 [0178]
- **TAMURA, Y. et al.** *Science*, 1997, vol. 278, 117-120 [0178]
- **NESTLE, F. et al.** *Nature Medicine*, 1998, vol. 4, 328-332 [0179]
- **KUGLER, A. et al.** *Nature Medicine*, 2000, vol. 6, 332-336 [0179]
- **MOKYR, M. et al.** *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 5301-5304 [0180]
- **KEHRL, J. et al.** *J. Exp. Med.*, 1986, vol. 163, 1037-1050 [0182]
- **HOWARD, M. ; O'GARRA, A.** *Immunology Today*, 1992, vol. 13, 198-200 [0182]
- **HAHNE, M. et al.** *Science*, 1996, vol. 274, 1363-1365 [0182]
- **RIDGE, J. et al.** *Nature*, 1998, vol. 393, 474-478 [0183]
- **ITO, N. et al.** *Immunobiology*, 2000, vol. 201 (5), 527-40 [0183]
- **WEINBERG, A. et al.** *Immunol*, 2000, vol. 164, 2160-2169 [0183]
- **MELERO, I. et al.** *Nature Medicine*, 1997, vol. 3, 682-685 [0183]

- **HUTLOFF, A. et al.** *Nature*, 1999, vol. 397, 262-266 [0183]
- **WATANABE, N. et al.** *Nat Immunol*, 2003, vol. 4, 670-9 [0183]
- **SICA, GL.** *Immunity*, 2003, vol. 18, 849-61 [0183]
- **GREENBERG, R. ; RIDDELL, S.** *Science*, 1999, vol. 285, 546-51 [0185]
- **HOLLIGER.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0192]
- **POLJAK.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123 [0192]
- **OVERWIJK, W. et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 1999, vol. 96, 2982-2987 [0193]
- **ROSENBERG, SA ; WHITE, DE.** *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1996, vol. 19 (1), 81-4 [0193]
- **SCHENK et al.** *Nature*, 1999, vol. 400, 173-177 [0194]
- **KANAI et al.** *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, 4156-63 [0198]
- **YOUNGNAK-PIBOONRATANAKIT et al.** *Immunol Letters*, 2004, vol. 94, 215-22 [0199]
- **CHEN et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 811-820 [0205]
- **FISHWILD et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851 [0205]

Lisboa, 31 de Agosto de 2015

## REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, que se liga especificamente a PD-L1, compreendendo:

- (a) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:22;
- (b) uma CDR2 de região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:32;
- (c) uma CDR3 de região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:42;
- (d) uma CDR1 de região variável de cadeia leve que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 52;
- (e) uma CDR2 de região variável de cadeia leve que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:62; e
- (f) uma CDR3 de região variável de cadeia leve que compreende os aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:72.

2. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo da reivindicação 1, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de homologia com a sequência estabelecida na SEQ ID NO:2 e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de homologia com a sequência estabelecida na SEQ ID NO:12.

3. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo da reivindicação 1, que compreende uma

região variável de cadeia pesada que compreende aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:2 e uma região variável de cadeia leve que compreende aminoácidos tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO:12.

4. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, que é um anticorpo de um isotipo IgG1, IgG2 ou IgG4, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo.

5. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, que é um anticorpo de um isotipo IgG4, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo.

6. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, que é um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples.

7. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo se liga a PD-L1 humano com uma  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M ou menos.

8. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo da reivindicação 7, em que o anticorpo se liga a PD-1 humano com uma  $K_D$  de  $2 \times 10^{-9}$  M ou menos.

9. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, que aumenta:

- (a) a proliferação de células T num ensaio de reação linfocitária mista (MLR);
- (b) a produção de interferon- $\gamma$  num ensaio de MLR; e

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

10. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, anticorpo o qual é um anticorpo quimérico.

11. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1-9, anticorpo o qual é um anticorpo quimérico.

12. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1-9, anticorpo o qual é um anticorpo humano.

13. Um imunoconjugado que compreende o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações anteriores, ligado a um agente terapêutico.

14. O imunoconjugado da reivindicação 13, em que o agente terapêutico é uma citotoxina ou um isótopo radioativo.

15. Uma molécula biespecífica que compreende o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, ligado a uma segunda fração funcional tendo uma especificidade diferente do que o dito anticorpo ou porção de ligação a antigénio do mesmo.

16. Uma composição que compreende (a) o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, (b) o imunoconjugado da reivindicação 13 ou 14 ou (c) a molécula biespecífica da reivindicação 15, e um portador farmacêuticamente aceitável.

17. Uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

18. Um vetor de expressão que compreende a molécula de ácido nucleico da reivindicação 17.

19. Uma célula hospedeira que compreende o vetor de expressão da reivindicação 18.

20. Um ratinho transgênico que compreende transgenes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana, em que o ratinho expressa o anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

21. Um hibridoma preparado a partir do ratinho da reivindicação 20, em que o hibridoma produz o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

22. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para utilização num método de modulação de uma resposta imunitária num sujeito.

23. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para utilização num método de inibição do crescimento de células tumorais num sujeito.

24. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12 para utilização de acordo com a reivindicação 23, em que as células tumorais são células de um cancro escolhido a partir de melanoma, cancro renal, cancro prostático, cancro

da mama, cancro do cólon, cancro ovárico e cancro pulmonar.

25. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12 para utilização de acordo com a reivindicação 23, em que as células tumorais são células de um cancro escolhido a partir de cancro ósseo, cancro pancreático, cancro cutâneo, cancro da cabeça ou pescoço, melanoma maligno intraocular ou cutâneo, cancro uterino, cancro retal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro testicular, cancro uterino, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da glândula tiroide, cancro das glândulas paratiroides, cancro da glândula adrenal, sarcoma de tecidos moles, cancro da uretra, cancro do pénis, leucemias agudas ou crónicas incluindo leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, cancro da bexiga, cancro dos rins ou ureter, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (SNC), linfoma do SNC primário, angiogénese tumoral, tumor do eixo da coluna, glioma do tronco cerebral, adenoma pituitário, sarcoma de Kaposi, cancro epidermoide, cancro de células escamosas, linfoma de células T, cancros induzidos pelo ambiente incluindo aqueles induzidos por amianto, e combinações dos ditos cancros.

26. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para utilização num método de tratamento de uma doença infecciosa num sujeito.

27. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para utilização de acordo com a reivindicação 26, em que a doença infecciosa é:

(a) uma doença escolhida a partir de gripe, herpes, giardíase, malária, e leishmaniose;

(b) uma infecção patogénica por um vírus escolhido a partir de vírus da imunodeficiência humana (VIH), vírus da hepatite, herpesvírus, adenovírus, vírus da gripe, flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus coxsackie, coronavírus, vírus sincicial respiratório, vírus da parotidite, rotavírus, vírus do sarampo, vírus da rubéola, parvovírus, vírus vaccínia, vírus HTLV, vírus da dengue, vírus do papiloma, vírus molluscum, poliovírus, vírus da raiva, vírus JC e vírus da encefalite arboviral;

(c) uma infecção patogénica por uma bactéria escolhida a partir de clamídia, bactérias rickettsiais, micobactérias, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos e conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos, cólera, tétano, botulismo, antrax, peste, leptospirose, e bactérias da doença de Lyme;

(c) uma infecção patogénica por um fungo escolhido a partir de Candida, *Cryptococcus neoformans*, Aspergillus, Género Mucorales, *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*; ou

(e) uma infecção patogénica por um parasita escolhido a partir de *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondi*, e *Nippostrongylus brasiliensis*.

28. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12 para utilização de acordo com a reivindicação 27, em que;

(a) o vírus da Hepatite é Hepatite A, Hepatite B, ou Hepatite C;

(b) o vírus herpes é VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, e CMV, ou vírus Epstein Barr;

(c) o fungo Candida é *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, ou *Candida tropicalis*;

(d) o fungo Aspergillus é *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus niger*; e

(e) o fungo Mucorales é mucor, absidia, ou rhizopus.

29. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12 e um antígeno, para utilização num método de potenciação de uma resposta imunitária face ao antígeno num sujeito.

30. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12 para utilização de acordo com a reivindicação 29, em que o antígeno é um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno a partir de um agente patogénico.

31. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para utilização num método de tratamento ou prevenção de uma doença inflamatória num sujeito.

32. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12 para utilização de acordo com a reivindicação 31, em que

EP1907424B1

a doença inflamatória é líquen plano (LP).

Lisboa, 31 de Agosto de 2015

## Anti-PD-L1 3Q10 VH

segmento V: 1-18  
 segmento D: indeterminado  
 segmento J: JH6b

```

      Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
1  CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                CDR1
                                -----
      K V S C K A S G Y T F T D Y G E S W
55  AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC GAC TAT GGT TTC AGC TGG

                                CDR2
                                -----
      V R Q A P G Q G L E W M G W I T A Y
109 GTG CGA CAG GGC CTT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC ACC GCT TAC

                                CDR2
                                -----
      N S N T N Y A Q K L Q G R V T M T T
163 AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG CTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA

      D T S T S T V Y M E L R S L R S D D
217 GAC ACA TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AAG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                CDR3
                                -----
      T A V Y Y C A R D Y F Y G M D V W G
271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAC TAC TTC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC

      Q G T T V T V S S
325 CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figura 1a

## Anti-PD-L1 3G10 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S F A T L S L S F G E R
1   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L V W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG ACT GTT AGC AGC TAC TTA GTC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P G Q A F R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCF GGC CAG SCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G E P A K P S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L K P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W F R T P G Q G T N V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Figura 1b

## Anti-PD-L1 12A4 VH

segmento V: 1-69  
 segmento D: 3-10  
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
   CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                     CDR1
55  K V S C K T S G D T F S T Y A I S N
   AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AGC TGG

                                     CDR2
109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATA

                                     CDR3
163 F G K A H Y A Q E F Q G R V T I T A
   TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
   GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                     CDR3
271 T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
   ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                     CDR3
325 G M D V W G Q G T T V T V S S
   GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figura 2a

## Anti-PD-L1 12A4 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCG TGC AGG CCC AGT CAG ACT GTT ACC AGC TAC TTA CCC TGG TAC

                                CDR2
      Q Q K F G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      A T G I P A R F S C S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      R S N N F T F G Q G T N V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Figura 2b

## Anti-FD-L1 10A5 VH

segmento V: 1-3  
 segmento D: 5-5  
 segmento J: JH4b

Q V Q L V Q S G A E V K K F G A S V  
 1 CAG GTC CAA CTT GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

## CDR1

K V S C K A S G Y T F T S Y D V H W  
 55 AAG GGT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT GAT GTA CAT TGG

## CDR2

V R Q R F G Q R L E W M G W L H A D  
 109 GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG CTC CAC GCT GAC

## CDR2

T S I T K F S Q K F Q G R V T I T E  
 153 ACT GGT ATC ACA AAR TTT TCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC AGG

D T S A S T A Y M E L S S L R S E D  
 217 GAC ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC

## CDR3

T A V Y Y C A R E R I Q L W F D Y W  
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG AGG ATA CAG CTA TGG TTY GAC TAC TGG

G Q G Y L V T V S S  
 325 GGC CAG GGA ACC CTS GTC ACC GTC TCC TCA

Figura 3a

## Anti-PD-L1 10A5 VK

segmento V: L15  
 segmento J: JK2

```

      D I Q M T Q S F S S L E A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

      CDR1
-----
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CSG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

      CDR2
-----
      Q Q K F E K R F K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
-----
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      CDR3
-----
      L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
-----
      Y N S Y P Y T F S Q G T K L E I R
271 TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

Figura 3b

## Anti-PD-L1 5F8 VH

segmento V: 1-69  
 segmento D: 6-13  
 segmento J: JH4b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                -----
55     K V S C K V S G G I F S F Y A I N W
      AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCT GGA GGC ATC TTC AGC AEC TAT GCT ATC AAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G Q G L E N M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GCA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                -----
163    F G T A N H A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GGT ACA GCA AAC CAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T S T A Y M E L S S L R S S D
      GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A V Y Y C A R D Q S I A A A L F D
      ACE GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CAG GGT ATA GCA GCA GCC CTT TTT GAC

                                CDR3
                                -----
325    Y N G Q G T L V T V S S
      TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Figura 4a

## Anti-PD-L1 SF8 VK1

segmento V: A27  
segmento J: JK1

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G S R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TSC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
109     Y Q Q K P G Q A P R L L I Y C A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

                                CDR2
163     R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
217     T L T I S R L S P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CTT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                                CDR3
271     Q Y G S S P W T F G Q S T N V E I R
      CAG TAT GGT AGC TCA CDG TGG ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Figura 4b

## Anti-PD-L1 10H10 VH

segmento V: 3-9  
 segmento D: 4-17  
 segmento J: JH4b

```

1      E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
      GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG COT GGC AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
55     R L S C A V S S F T F D D Y V V R N
      AGA CTC TCC TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GTC GTG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
109    V R Q A P G K S L E W V S G I S G N
      GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT GGG AAT

                                CDR2
                                -----
163    S G N I G Y A D S V K G S F T I S R
      AGT GGT AAC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CAA TTC ACC ATC TCC AGA

                                CDR2
                                -----
217    D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
      GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
271    T A L Y Y C A V P F D Y N G Q G T L
      ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCG GTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325    V T V S S
      GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

## Anti-PD-L1 10H10 VK

segmento V: L15  
segmento J: JK2

```

1      D I Q N T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TGT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
55      V T I T C R A S Q G I S S N L A N Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
109     Q Q K P E K A P E S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
163     Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
217     L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
271     Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
      TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GCC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

Figura 5b

## Anti-PD-L1 1B12 VH

segmento V: 1-69  
 segmento D: 3-10  
 segmento J: JH6b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K R P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GCG SCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
55      K V S C R T S G D T F S S Y A I S W
      AAG GTC TCC TSC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
189     V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
163     F G R A H Y A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GCT AGA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC AGC ATT ACC GCG

217     D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
271     T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
      ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
325     G M D V W G Q G T T V T V S S
      GGT ATG GAC GTC TCG GCC CAA GCG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Figura 6a

## Anti-PD-L1 1B12 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK1

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P C S R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT OCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A N Y
      GCC ACC CTC TCC TCC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
109    Q Q N F G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CTT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

                                CDR2
163    A T G I F A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGS TCT GGS ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
217    L T I S S L E P S D F A V Y Y C C Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TCT CAG CAG

                                CDR3
271    R S N W P T F G Q G T K V E I N
      CTT AGC AAC TGG CCG ACE TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA

```

Figura 6b

## Anti-PD-L1 7H1 VH

segmento V: 1-69  
 segmento D: 3-10  
 segmento J: JH6b

```

      Q V Q L V Q S G A E V N R P G S S V
1   CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
      K V S C R T S S G T F S S Y A I S W
55  AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT CCT ATC AGC TGG

                                CDR2
      V R Q A P G Q G L E W M G G I I F I
105 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR3
      F G K A H Y A Q N F Q G R V T I T A
153 TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

      D E S T T T A Y M E L S S E R S E D
217 GAC GAA TCC ACC ACC ACA GGC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
      T A V Y Y C R R K Y D Y V S G S F F
271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAG TAT GAC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
      G M D V W G Q G T T V T V S S
325 GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figura 7a

## Anti-PD-L1 7H1 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK1

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
89      A T I S C N A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
109     Q Q R P G Q A P R L L I Y D A S N E
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCG AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

                                CDR2
163     A T G I F A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGS TTC AGT GGC AGT GGS TCT GGS ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
217     L T I S S L E F E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

                                CDR3
271     R S N N F T F G Q G T R V E I K
      CCT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGS ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Figura 7b

## Anti-PD-L1 11E6 VH

segmento V: 1-69  
 segmento D: 6-19  
 segmento J: JH6c

```

1      Q V Q L V Q S G A E V R K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG ANG CCT GGG TCC TCG GTG

                                     CDR1
                                     -----
55     K V S C K A S G G T F S S Y A I N W
      AAG GTC TCC TCC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I F I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                     CDR3
                                     -----
163    F G S A N Y A Q K F Q D R V T I T A
      TTT GGT TCA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GAC AGA GTC AGC ATT ACC GCG

217    D E S T S A A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACC AGC GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
271    T A V Y Y C A R D S S G R S R Y Y M
      ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AGA GAC AGC AGT GGC TGG TCT CCG TAC TAT ATG

      CDR3
      -----
325    D V W G Q G I T V T V S S
      GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Figura 8a

## Anti-PD-L1 11E6 VK1

segmento V: A27

segmento J: JKA4

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTH TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGS GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

      CDR2
      Y Q Q N P G Q A P R L L I Y S A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      R A T G I P D R P S S S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      CDR3
      T S T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
317 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      Q Y E S S P F G G G T R V E I N
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTT GAG ATC AAA

```

Figura 8b

## Anti-PD-L1 12B7 VH

segmento V: 1-69  
 segmento D: 3-10  
 segmento J: JH6b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K E F G S S V
    CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG GAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
55   K V S C K A S G G T F N S Y A I S W
    AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AAC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
109  V R Q A P S Q S L E W N G G I I F L
    GTG CGA CAG GCG CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGS ATG GGA GGG ATC ATC CCT CTT

                                CDR2
153  F G I A H Y A Q K F Q G R V T I T A
    TTC GGT ATA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG APT ACC GCG

217  D E S T N T A Y M D L E S L R S E D
    GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAT ATG GAC CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
271  T N V Y Y C A R K Y S Y V S S S F F
    ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AGA AAG TAT TCC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
325  G M D V W G Q G T T V T V S S
    GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Figura 9a

## Anti-PD-L1 12B7 VK

segmento V: L6  
segmento J: JK5

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G S R
I    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
105  CAA CAG AAA CCT GGC CAG SCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      A T G I F A R F S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      R S N W F T F G D G T R L E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

```

Figura 9b

## Anti-PD-L1 13G4 VH

segmento V: 3-9  
 segmento D: 3-9  
 segmento J: JH4b

```

      S V Q L V E S G G G L V Q F S R S L
1    GAA GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R L S C A A S G I T F D D Y G N H W
55   AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA ATC ACC TTT GAT GAT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V R Q A F G K G L E W V S G I S W N
105  GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGC TGG AAT

                                CDR2
                                -----
      R G R I E Y A D S V K G R F T I S K
163  AGA GGT AGA ATA GAG TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
217  GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC ACT CTG AGA GGT GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T A L Y Y C A K S R F R Y F D W F L
271  ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GGG CGG TTC CGA TAT TTT GAC TGG TTT CTT

                                CDR3
                                -----
      D Y W G Q G T L V T V S S
325  GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Figura 10a

## Anti-PD-L1 13G4 VK

segmento V: L18

segmento J: JK3

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
55      V E I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TCC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
109     Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

                                CDR3
163     E S G V P S R P S G S G S G T D P T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
217     L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

                                CDR3
271     F N S Y P P T F G P G T K V D I K
TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

```

Figura 10b

## região VH de 3G10 Anti-PD-L1

1-18 linha germinal: Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q  
3G10 VH: - - - - - - - - - - - - - - - - D - - F - - -

CDR1

1-18 linha germinal: A P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T  
3G10 VH: - - - - - T - - - - -

1-18 linha germinal: A Y M E L R S D D T A V Y C A R \_\_\_\_\_  
 3G10 VH: V - - - - - - - - - - - - - - - - D Y F Y G M D V W G Q G T T V T V S S  
 (JH6b) CDR3 \_\_\_\_\_

**Figura 11**

região VH de 12A4 Anti-PD-L1

1-69 linha germinal: Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A  
12A4 VH: - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T

1-69 linha germinal: S G G T F S S Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M  
12A4 VH: - - D - - - T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

CDR1

1-69 linha germinal: G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A  
12A4 VH: - - - - - - - - - - K - H - - - - - - - - - - - - - - - -

CDR2

1-69 linha germinal: D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C  
12A4 VH: - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - F

1-69 linha germinal: A R  
JH6b linha germinal: Y G M D V W G Q G T T V T  
12A4 VH: - - K F H F V S G S P F - - - - - - - - - - - - - - - -

CDR3

JH6b linha germinal: V S S  
12A4 VH: - - - - -

Figura 12



## região VH de 5F8 Anti-PD-L1

1-69 linha germinal Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W  
 5F8 VH CDR1  
 - - - - - I - - - - - T - - - - - N -

1-69 linha germinal V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A  
 5F8 VH CDR2  
 - - - - - H - - - - - - - - - -

1-69 linha germinal D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y C A R CDR3  
 JH4b linha germinal  
 5F8 VH F D  
 - - - - - D Q G I A A A L - -

JH4b linha germinal Y W G Q G T L V T V S S  
 5F8 VH (JH4b)  
 - - - - - - - - - -

Figura 14



## região VH de 1B12 Anti-PD-L1

1-69 linha germinal Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S Y A I S W  
CDRI  
**1B12 VH**

1-69 linha germinal V R Q A F G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A  
1B12 VH  
CDR2

	CDR3
1-69 linha germinal	D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R
3H4b linha germinal	
1B12 VH	- - - - - F - - - - - K F H F V S G S P F

JH4b linha germinal G M D V W G Q G T T V T V S S  
1B12 VH 1B12 VH (JH6b)

**Figura 16**

## região VH de 7H1 Anti-PD-L1

1-69 linha germinar Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W  
 7H1 VH CDR1

1-69 linha germinar V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A  
 7H1 VH CDR2

1-69 linha germinar D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y C A R CDR3  
 JH6b linha germinar Y  
 7H1 VH K Y D Y V S G S P F

JH6b linha germinar G M D V W G Q G T T V T V S S (JH6b)  
 7H1 VH

Figura 17

região VH de 11E6 Anti-PD-L1

1-69 linha germinal Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W  
11E6 VH CDR1

1-69 linha germinal V R Q A P G Q G L E N M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A  
11E6 VH CDR2

1-69 linha germinal D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R CDR3  
JH6c linha germinal Y Y M  
11E6 VH D S S G W S R

JH6c linha germinal D V W G Q G T T V T V S S  
11E6 VH (JH6c)

Figura 18

região VH de 12B7 Anti-PD-L1

1-69 linha germinar Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W  
12B7 VH CDR1 N - - - - -

1-69 linha germinar V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A  
12B7 VH CDR2 L - - - - - I - H - - - - -

1-69 linha germinar D E S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R CDR3  
JH6b linha germinar Y  
12B7 VH - - - - - N - - - - - D - - - - - K Y S Y V S G S P F

JH6b linha germinar G M D V W G Q G T T V T V S S (JH6b)  
12B7 VH - - - - -

Figura 19

## região VH de 13G4 Anti-PD-L1

3-9 linha germinal E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W  
 13G4 VH CDR1 I - - - - G - - -

3-9 linha germinal V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T I S R  
 13G4 VH CDR2 R - R - E - - - - -

3-9 linha germinal D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K  
 13G4 VH CDR3 - - - - G R F R Y F D W F L

JH4b linha germinal D Y W G Q G T L V T V S S  
 13G4 VH (JH4b)

Figura 20



região VK de 12A4 PD-L1

L6 linha germinal: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y  
 12A4 VK: . . . . . CDR1 . . . . .

L6 linha germinal: Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T  
 12A4 VK: . . . . . CDR2 . . . . .

L6 linha germinal: L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N W P  
 JK1 linha germinal: . . . . . CDR3 . . . . . T F G Q G T K V E I K  
 12A4 VK: . . . . .

Figura 22

região VK de 10A5 Anti-PD-L1

L15 linha germinal 10A5 VK	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1
L15 linha germinal 10A5 VK	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S L Q S G V P S R F	CDR2
L15 linha germinal 10A5 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S	CDR3
L15 linha germinal JK2 linha germinal 10A5 VK	Y P Y T F G Q G T K L E I K	(JK2)

Figura 23

região VK1 de 5F8 Anti-PD-L1

A27 linha germinal E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W  
5F8 VK1 - - - - - CDR1 - - - - -

A27 linha germinal Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R E S G S G T D F  
5F8 VK1 - - - - - CDR2 - - - - -

A27 linha germinal T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P  
JK1 linha germinal - - - - - CDR3 - - - - - W T F G Q G T K V E I K  
5F8 VK1 - - - - -  
(JK1)

Figura 24

## região VK de 10H10 Anti-PD-L1

[illegible]

IL15 linha germinal  
10H10 VK

<u>W</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>F</u>						
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
																				CDR2																	

[illegible]

L15 linha germinal		Y P	- - - - -	- - - - -	- - - - -	(JK2)
JK2 linha germinal		Y T F G Q G T K L E I K	- - - - -	- - - - -	- - - - -	
10H10 VK			- - - - -	- - - - -	- - - - -	

**Figura 25**

região VK de 1B12 Anti-PD-L1

L6 linha germinal 1B12 VK E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S CDR1

L6 linha germinal 1B12 VK Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F CDR2

L6 linha germinal 1B12 VK S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y C Q Q R S N CDR3

L6 linha germinal JK1 linha germinal 1B12 VK W P T F G Q G T K V E I K (JK1)

Figura 26

região VK de 7H1 Anti-PD-L1

L6 linha germinal 7H1 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S	CDR1
L6 linha germinal 7H1 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F	CDR2
L6 linha germinal 7H1 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N	CDR3
L6 linha germinal JK1 linha germinal 7H1 VK	W P T F G Q G T K V E I K (JK1)	

Figura 27

região VK1 de 11E6 Anti-PD-L1

A27 linha germinal 11E6 VK1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W	CDR1
A27 linha germinal 11E6 VK1	Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F	CDR2
A27 linha germinal JK4 linha germinal 11E6 VK1	T L T I S R L E P E D F A V Y C Q Q Y G S S P F G G G T K V E I K	CDR3 (JK4)

Figura 28

## região VK2 de 11E6a Anti-PD-L1

A27 linha germinal E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W  
11E6 VK2

A27 linha	Y Q Q K P G Q A P R L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D E	
germinal	- - - - -	
11E6 VK2	- - - - -	

[illegible]

**Figura 29**

região VK de 12B7 Anti-PD-L1

L6 linha germinal 12B7 VK  
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S  
CDR1

L6 linha germinal 12B7 VK  
Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F  
CDR2

L6 linha germinal 12B7 VK  
S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N  
CDR3

L6 linha germinal JK5 linha germinal 12B7 VK  
W P T F G Q G T R L E I K  
(JK5)

Figura 30

## região VK 13G4 Anti-PD-L1

L18 linha germinal  
13G4 VK

13G4 VK

LL18 linha germinal  
13G4 VK

ALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRF  
CDR2

13G4 VK

L18 linha germinal . S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y C Q Q F N S  
13G4 VK

13G4 VK

	<u>Y P</u>	
L18 linha germinal	- - - - -	(JK3)
JK3 linha germinal	F T F G P G T K V D I K	
13G4 VK	- - - - -	

JK3 linha terminal F T F G P G T K V D I K

[illegible]

Figura 31

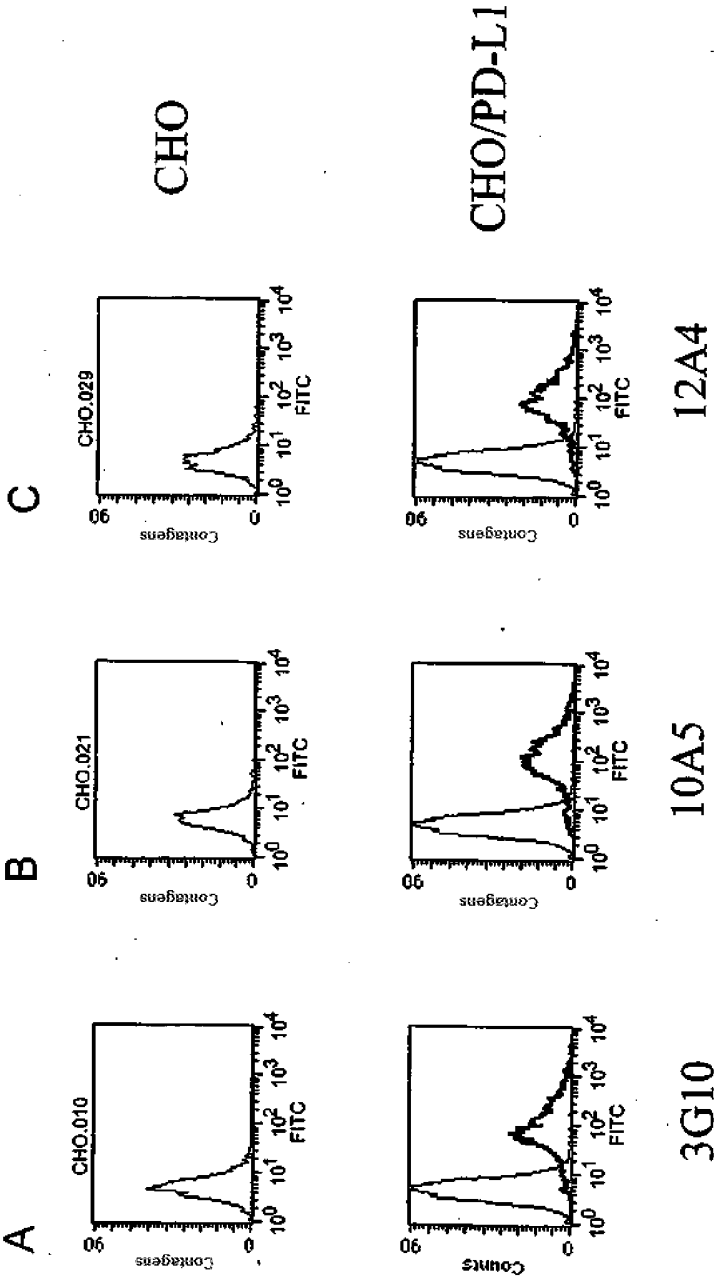


Figure 32

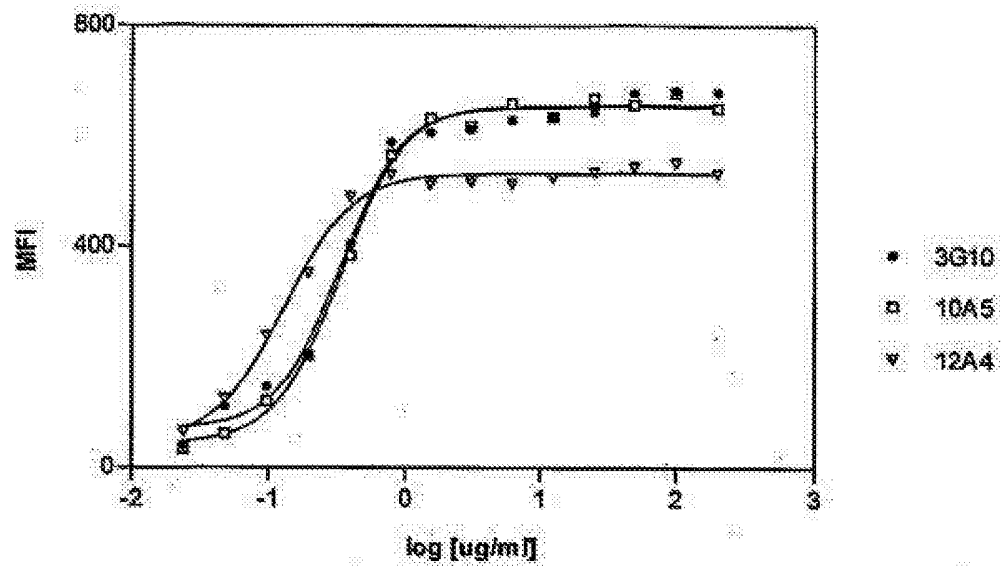
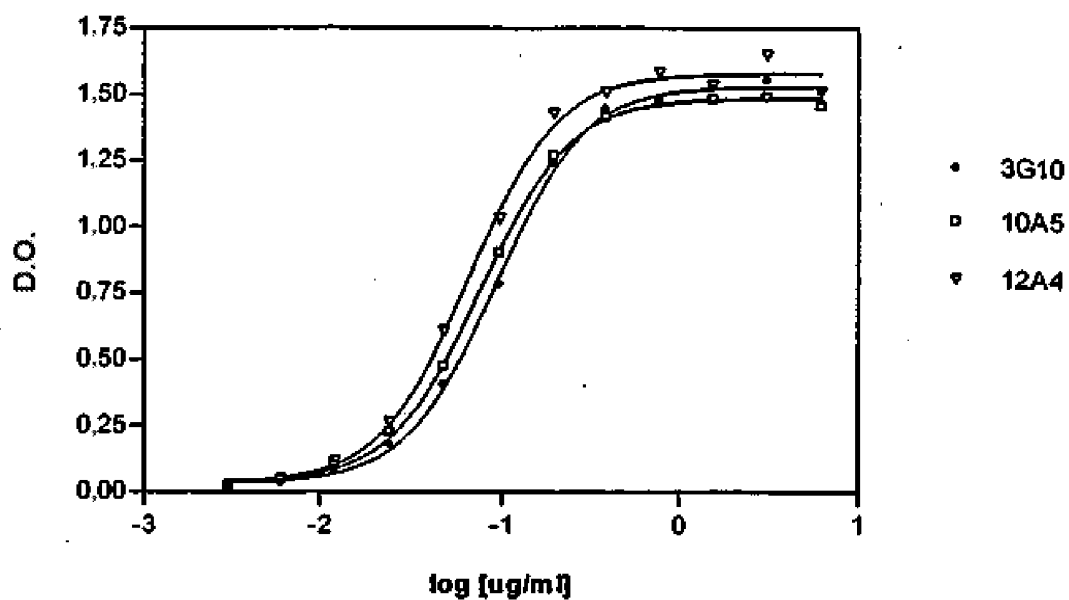


Figura 33

**Ligação de anticorpos HuMab anti-PD-L1 a hPD-L1/Fc (por ELISA)****Figura 34**

Titulação de HuMab para PDL1 em células T CD4+ estimuladas

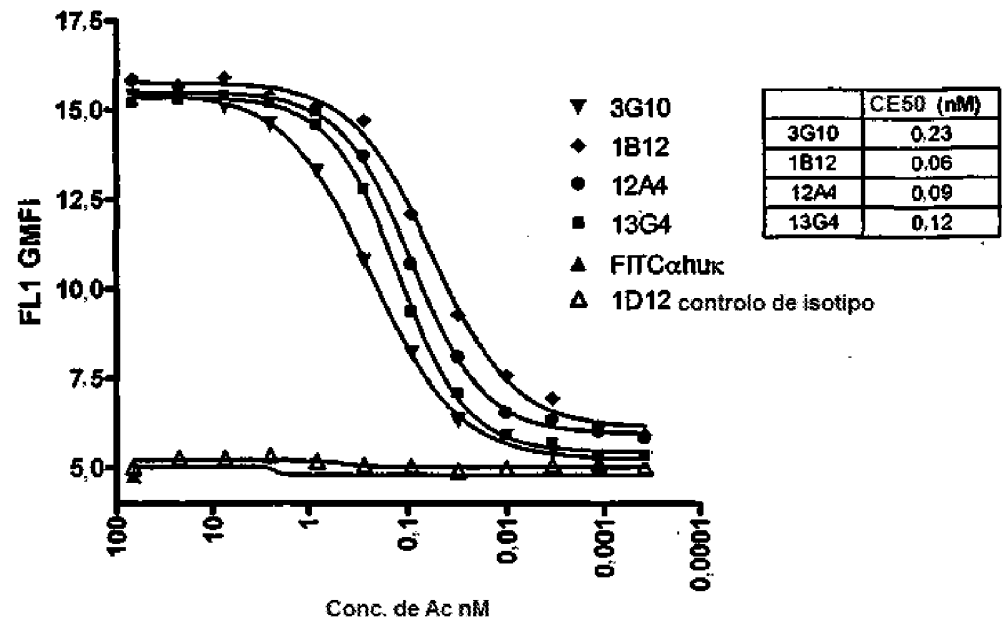


Figura 35

Titulação de HuMab para PD-L1 em PBMC de cinomólogo ativadas

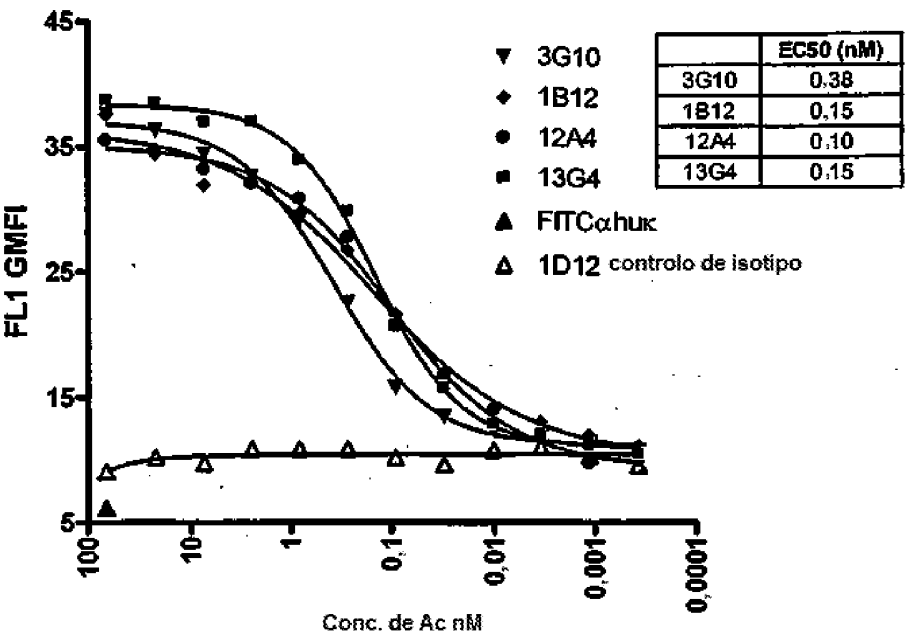


Figura 36

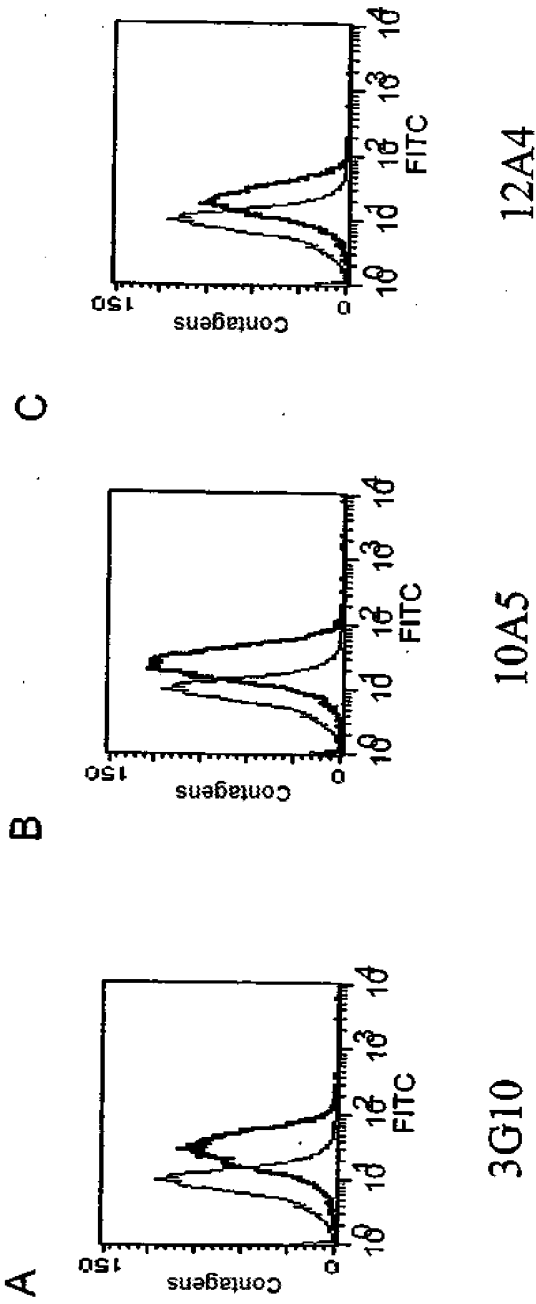


Figura 37

Titulação de células ES-2 tratadas com IFN $\gamma$  -  
Deteção de anti-Hu Kappa de HuMabs  $\alpha$ PDL1

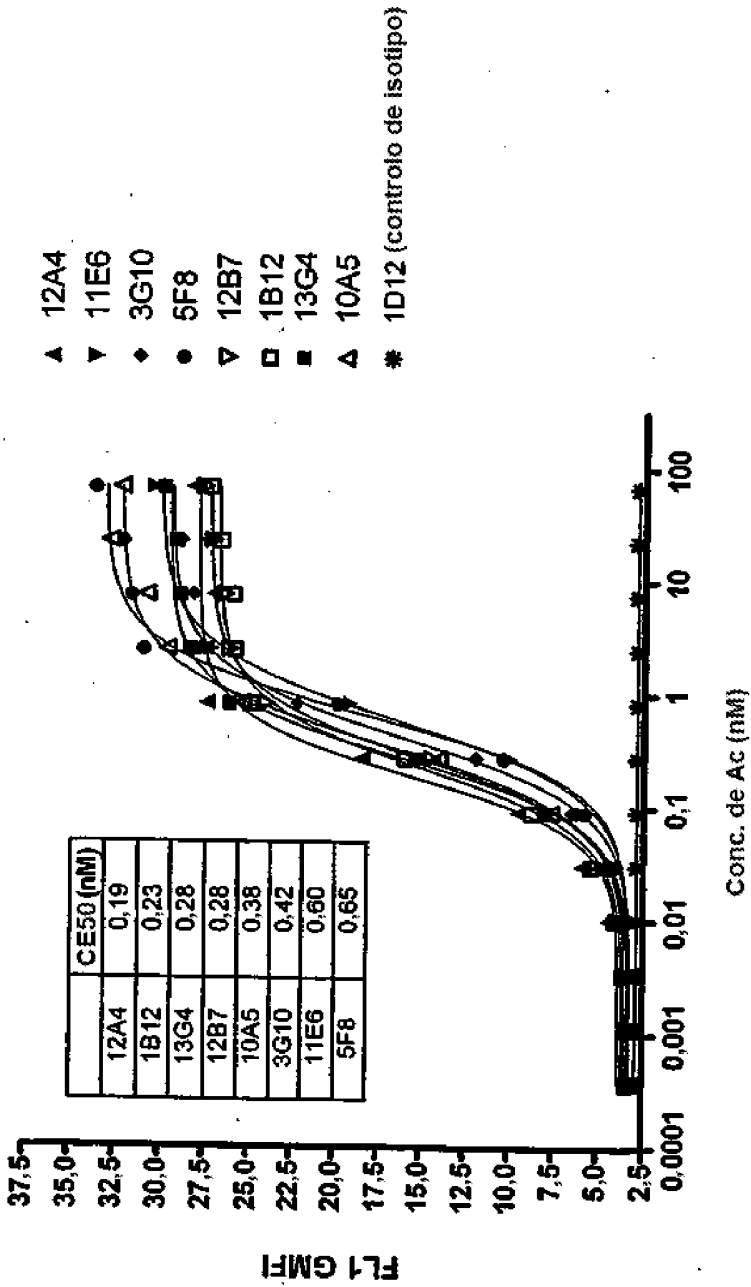


Figura 38

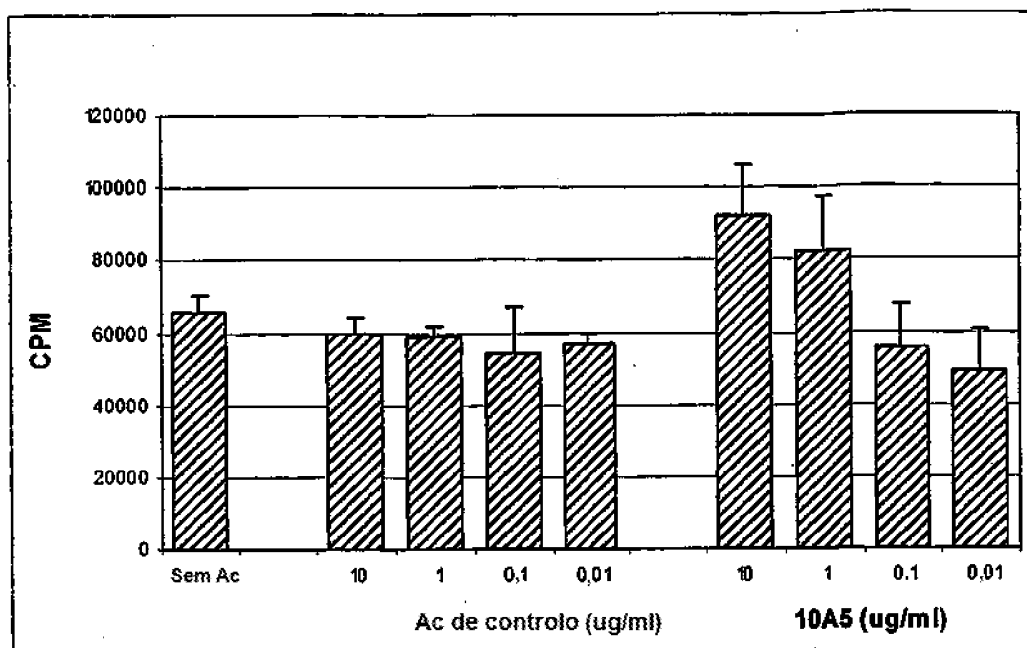


Figura 39A

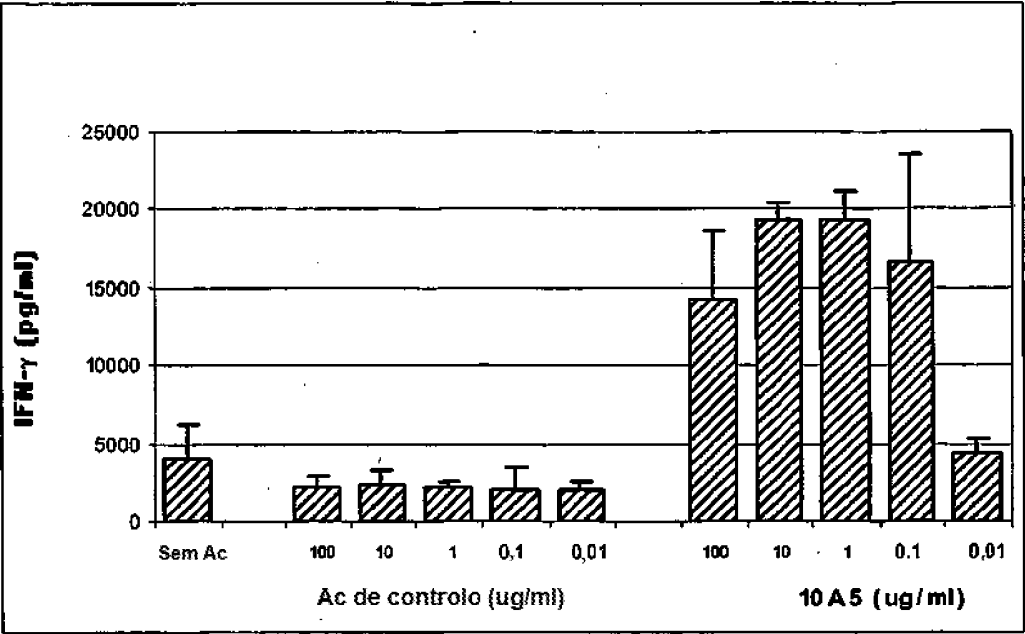


Figura 39B

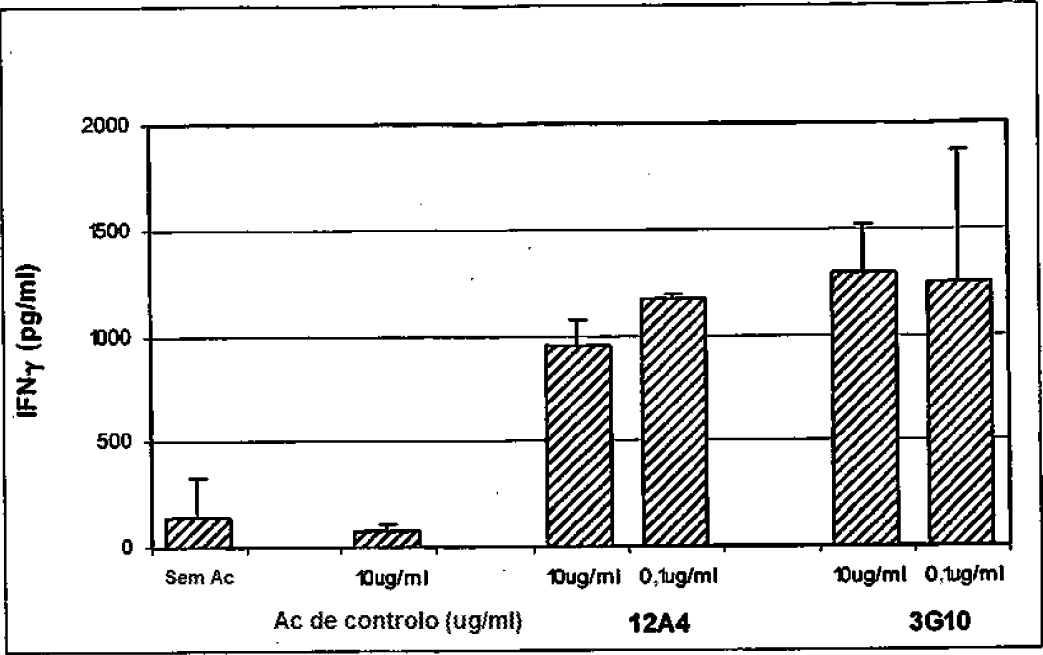


Figura 39C

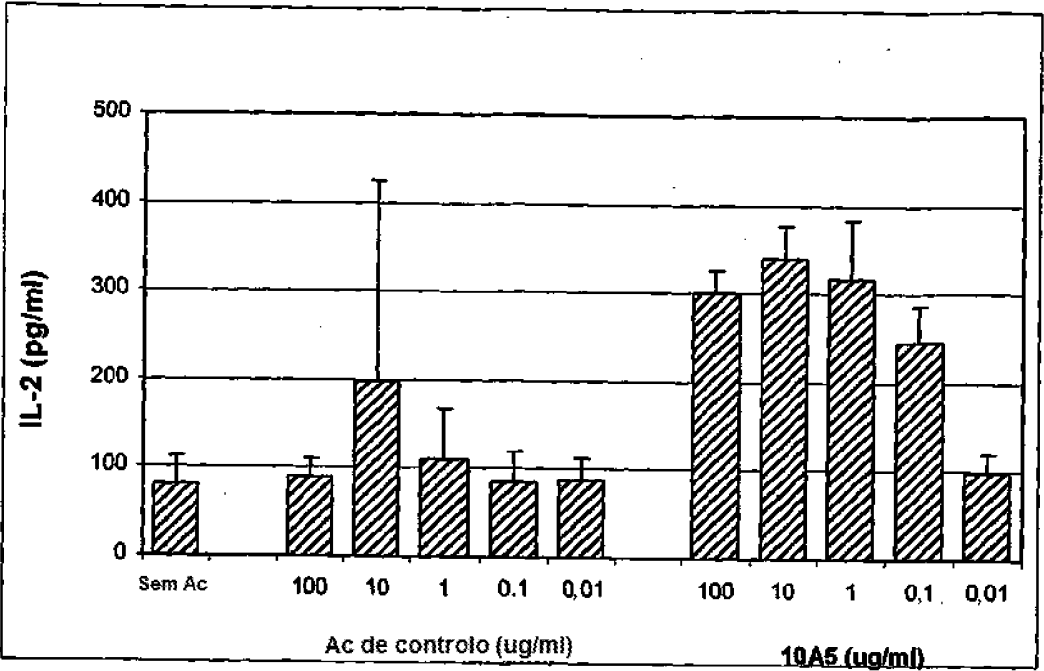


Figura 39D

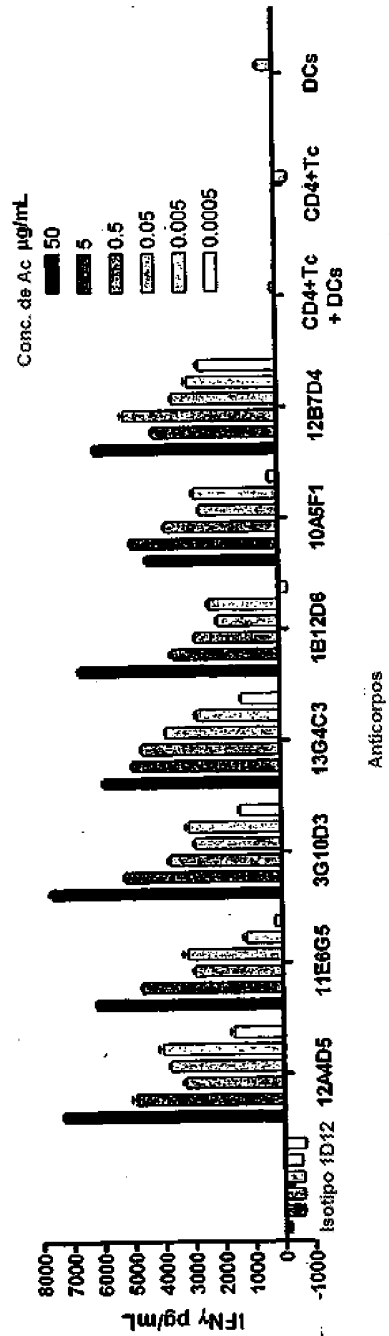
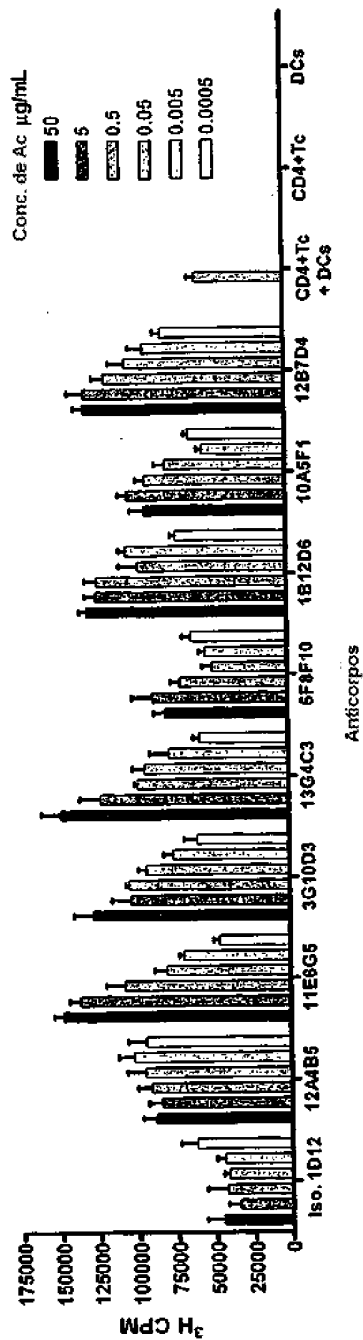


Figura 40

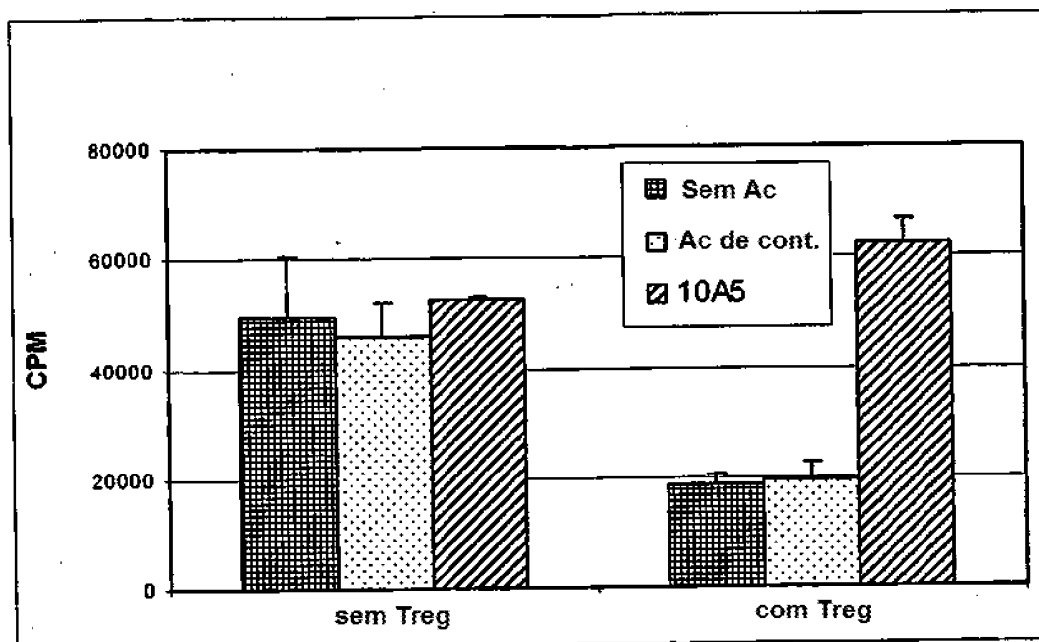


Figura 41A

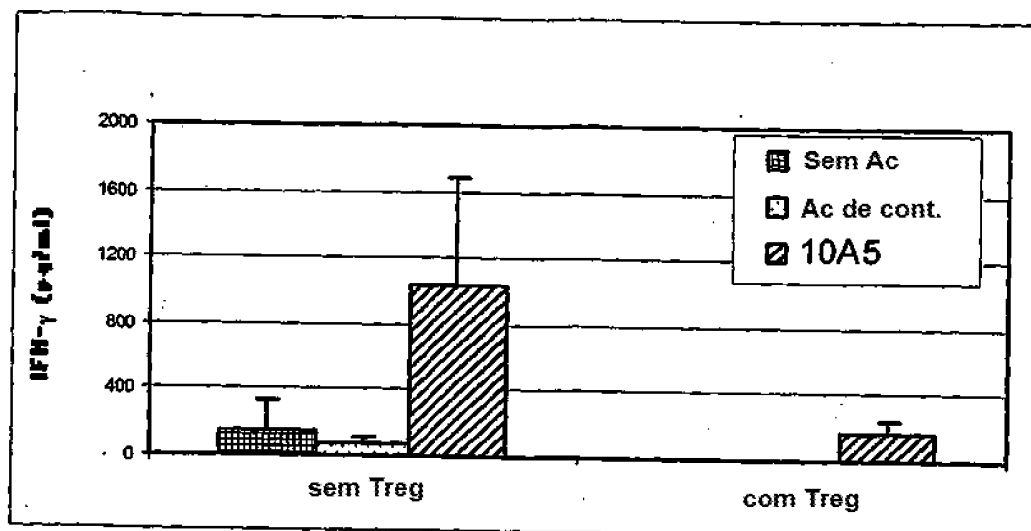


Figura 41B

Resposta proliferativa numa MLR T/Treg/DC na presença  
de anticorpos humanos anti-PD-L1

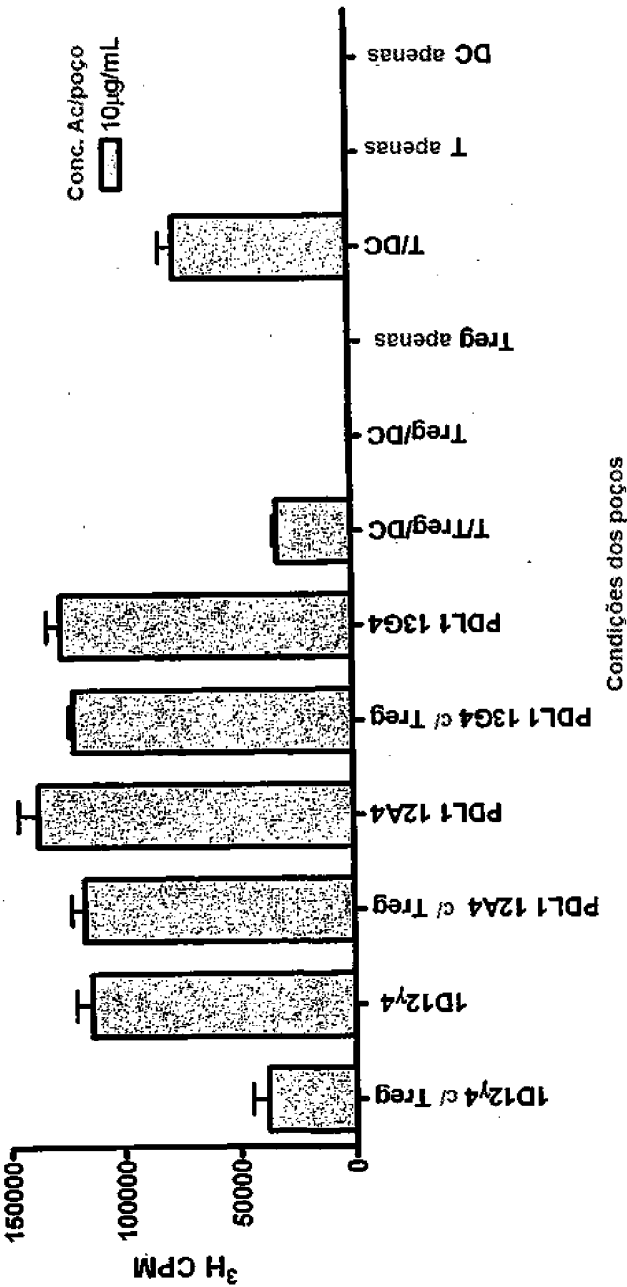


Figura 42

Libertação de IFN $\gamma$  numa MLR de T/T reg/DC  
na presença de anticorpos anti-PD-L1

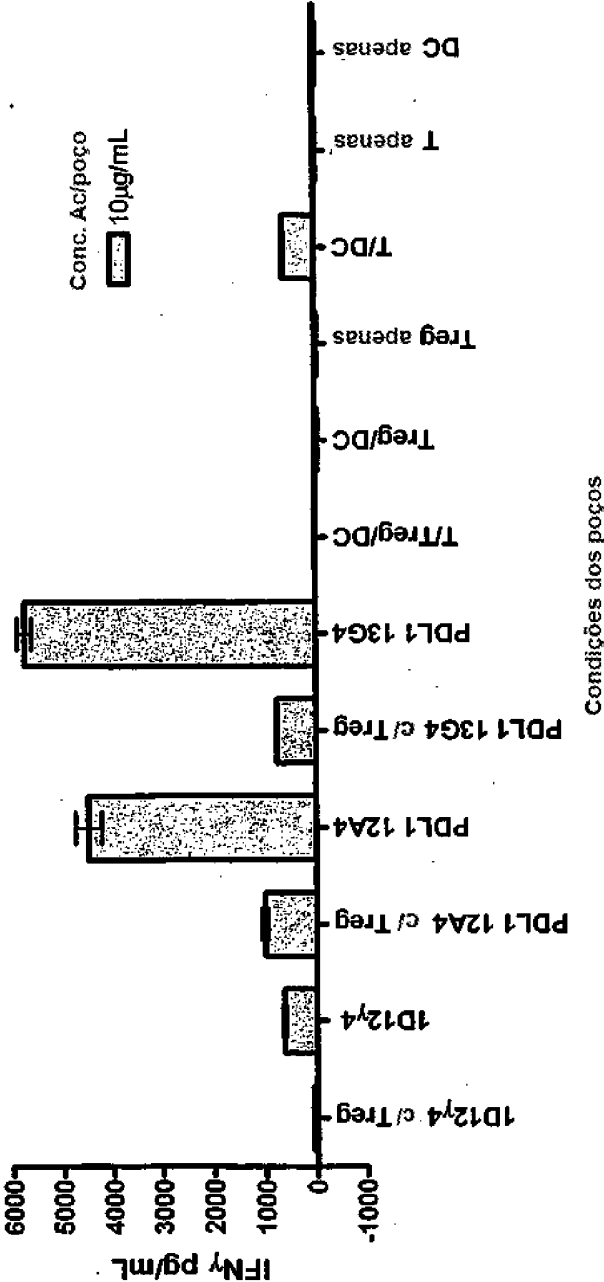


Figura 43

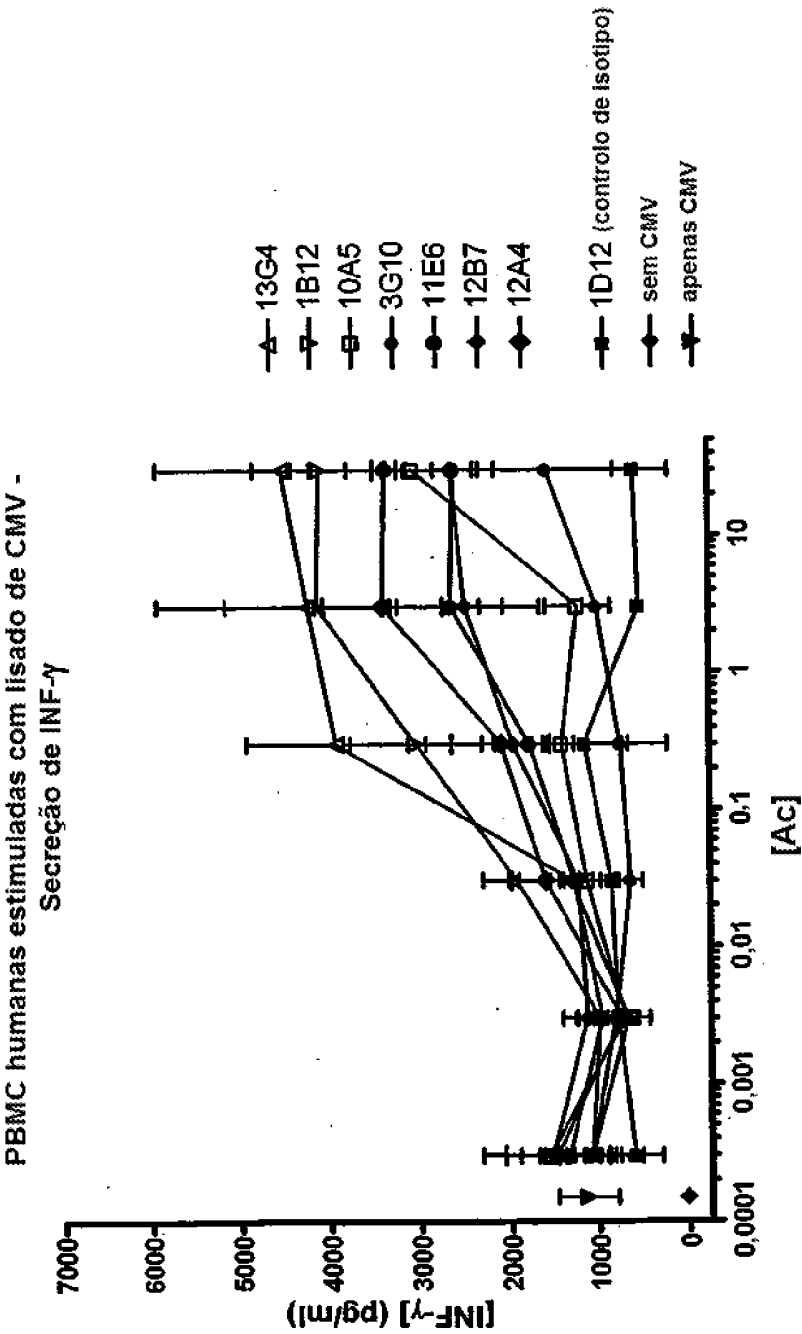


Figura 44

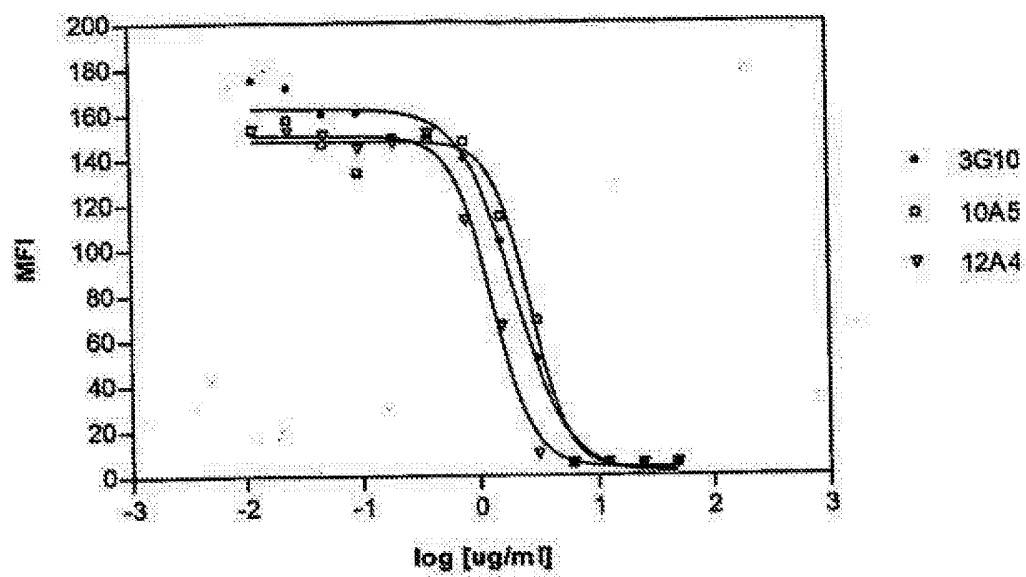


Figura 45

Bloqueio de ligação de PD1-Ig por Acs anti-PD-L1 em células ES-2 tratadas com IFN-gama

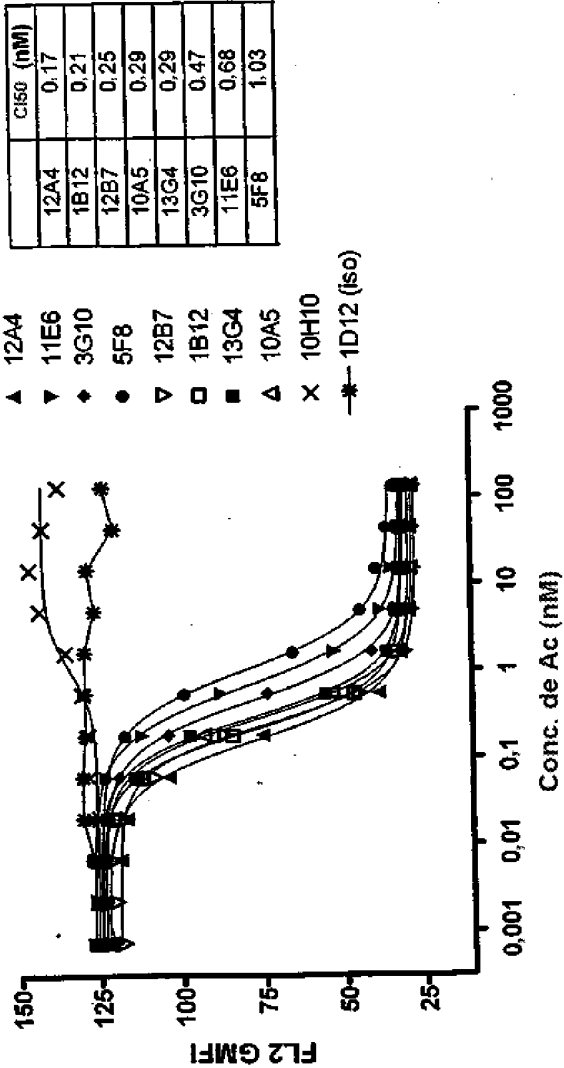


Figura 46

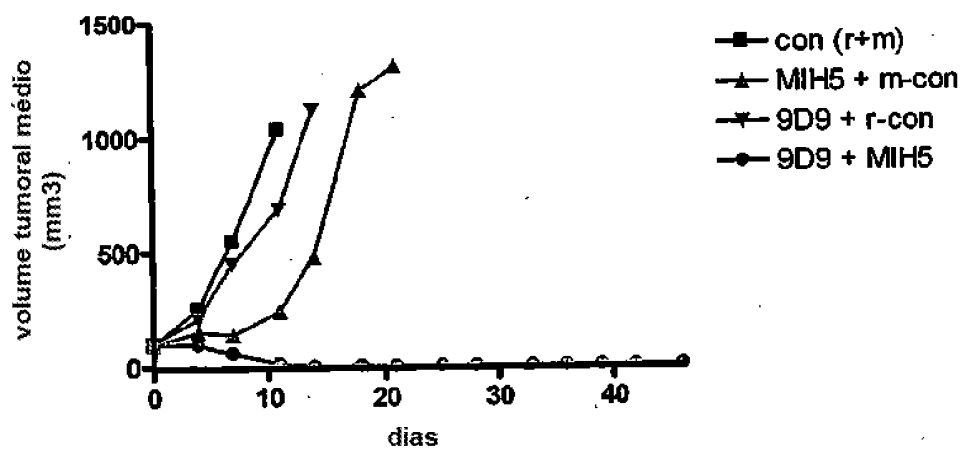


Figura 47