



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

(21) BR 112019025325-4 A2



(22) Data do Depósito: 08/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA TRATAR CÂNCER, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-ICOS OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-PDL1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-PD-L1 OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, USO DE UM ANTICORPO ANTI-ICOS OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, E, CÉLULA HOSPEDEIRA

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

(30) Prioridade Unionista: 03/05/2018 US 62/666278; 09/06/2017 US 62/517309.

(71) Depositante(es): GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED.

(72) Inventor(es): MEIXIA BI; CHRISTOPHER B. HOPSON; PATRICK A. MAYES; SAPNA YADAVILLI.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018054167 de 08/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/225033 de 13/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 29/11/2019

(57) Resumo: A presente invenção provê métodos para tratar câncer em um paciente em necessidade do mesmo, o método compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao ICOS humano e uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao PD 1 humano ou PD-L1 humano sequencialmente. A presente invenção também provê um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo para o uso sequencial no tratamento de câncer em um ser humano em necessidade do mesmo. A presente invenção provê um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo para uso sequencial no tratamento de câncer em um ser humano em necessidade do mesmo.

PLANEJAMENTO DE ESTUDO			
GRUPO	TRATAMENTO	Nº TOTAL DE SUJEITOS	DOSEAGEM CONCOMITANTE VS EM FASES
1	SOLUÇÃO SALINA	10	3 DOSES
2	IgG2a de rato 100µg + IgG2a de rato 200µg	10	3 DOSES
3	PD1 - 20µg + IgG2a de rato 100µg	10	3 DOSES
4	ICOS 10µg + IgG2a de rato 200µg	10	3 DOSES
5	ICOS 10µg + IgG2a de rato 200µg	10	3 DOSES
6	PD1 - 20µg + ICOS 10µg	10	3 DOSES
7	PD1 - 20µg + ICOS 10µg	10	3 DOSES
8	PD1 - 20µg (representação de 3 doses) + IgG2a de rato 100µg	10	Em fase: PD1 (representação de 3 doses) + IgG2a de rato 3 DOSES + PD1 3 DOSES
9	PD1 - 20µg (representação de 3 doses) + ICOS 10µg	10	Em fase: PD1 3 doses + ICOS 3 DOSES + PD1 3 DOSES
10	PD1 - 20µg (representação de 3 doses) + ICOS 10µg	10	Em fase: IgG2a de rato 3 DOSES + ICOS 3 DOSES + PD1 3 DOSES
11	ICOS - 10µg (representação de 3 doses) + IgG2a de rato 200µg	10	Em fase: ICOS (representação de 3 doses) + IgG2a de rato 3 DOSES
12	ICOS - 10µg (representação de 3 doses) + PD1 20µg	10	Em fase: ICOS 3 doses + PD1 6 DOSES
13	PD1 - 20µg (representação de 3 doses) + PD1 20µg	10	Em fase: IgG2a de rato 3 DOSES + PD1 6 DOSES

MÉTODOS PARA TRATAR CÂNCER, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-ICOS OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-PDL1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD-L1 OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, USO DE UM ANTICORPO ANTI-ICOS OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, E, CÉLULA HOSPEDEIRA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção geralmente diz respeito à imunoterapia no tratamento da doença humana. Mais especificamente, a presente invenção diz respeito ao uso da dose sequenciada de imunomoduladores tais como anticorpos anti-ICOS, anticorpos anti-PD1, e anticorpos anti-PDL1 no tratamento do câncer.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A imunidade ao câncer é um processo de múltiplas etapas que é rijamente regulado através de uma série de pontos de checagem imunológica negativos e receptores coestimuladores positivos que, quando eficazmente provocado pode obter uma resposta antitumoral (Mellman, I., *et al.* (2011) Cancer Immunotherapy Comes of Age. Nature 480(7378), 480-489). Contudo, os tumores estabeleceram vários mecanismos para

enganar a depuração imunológica alterando-se a responsividade do infiltrado imunológico. Em alguns exemplos, os tumores serão altamente dependentes de um mecanismo único, e nestes casos, existe o potencial de obter uma atividade clínica significativa com uma terapia imunomoduladora de agente único (Hoos, A. (2016). Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. Nat Rev Drug Discov. 15(4), 235-47). Contudo, conforme os tumores frequentemente utilizam mecanismos de sobreposição e redundantes múltiplos para bloquear a resposta imune, a terapia de combinação será provavelmente requerida para a eficácia durável através uma ampla faixa de tipos de tumores. Portanto, novas terapias imunológicas alvejadas são necessárias para melhorar o tratamento de todos os cânceres.

[003] Deste modo, há uma necessidade quanto a combinação de tratamentos e estratégias para a dosagem de imunomoduladores para o tratamento de uma doença, em particular, câncer.

Breve Descrição dos Desenhos

[004] A FIG. 1 é uma tabela mostrando o projeto de estudo de anticorpos anti-ICOS/anticorpos anti-PD1 simultâneos e um estudo de dose em fases aqui descrito.

[005] A FIG. 2 é um diagrama esquemático que mostra o procedimento de estudo dos anticorpos anti-ICOS/anticorpos anti-PD1 concorrentes e o estudo de dosagem em fases aqui descrito. Mostrado no fundo da FIG. 2 é uma tabela que lista os anticorpos usados no estudo.

[006] A FIG. 3 é uma representação gráfica mostrando o volume de tumor médio dos grupos de camundongos tratados com anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1 concomitantemente ou em fases sequenciais (por exemplo, dose inicial/dose de acompanhamento) e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle, como indicado na legenda da figura.

[007] A FIG. 4 é uma representação gráfica mostrando o volume

de tumor médio de grupos de camundongo tratados com dosagem concomitante de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle, como indicado na legenda da figura.

[008] A FIG. 5 é uma representação gráfica mostrando o volume de tumor médio dos grupos de camundongo tratados com dosagem em fases de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle, como indicado na legenda da figura.

[009] A FIG. 6 é uma representação gráfica mostrando o volume de tumor médio dos grupos de camundongo tratados com dosagem em fases de anticorpos anti-PD1 e anticorpos anti-ICOS, com anticorpos anti-PD1 como dose inicial e anticorpos anti-ICOS como dose de acompanhamento, e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle, como indicado na legenda da figura.

[0010] A FIG. 7 é uma representação gráfica mostrando o volume de tumor médio dos grupos de camundongo tratados com dosagem em fases de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, com anticorpos anti-ICOS como dose inicial e anticorpos anti-PD1 como dose de acompanhamento, e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle, como indicado na legenda da figura.

[0011] As FIGS. 8A-8C são conjuntos de representações gráficas mostrando volumes de tumores individuais de camundongos tratados com dosagem concomitante de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, e grupo(s) tratado(s) com controle(s), como indicado na(s) legenda(s) da(s) figura(s) correspondente(s). A FIG. 8A mostra os volumes de tumores individuais de camundongos no Grupo 1 (esquerda) e Grupo 2 (direita). A FIG. 8B mostra os volumes de tumores individuais de camundongos no Grupo 3 (esquerda superior), Grupo 4 (direita superior), e Grupo 5 (fundo). A FIG. 8C mostra os volumes de tumores individuais dos camundongos no Grupo 6 (esquerda) e Grupo 7 (direita).

[0012] As FIGS. 9A-9C são conjuntos de representações gráficas mostrando volumes de tumores individuais de camundongos tratados com dosagem em fases de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, e grupo(s) tratado(s) com controle(s), como indicado na(s) legenda(s) da(s) figura(s) correspondente(s). A FIG. 9A mostra os volumes de tumores individuais dos camundongos no Grupo 1 (esquerda) e Grupo 2 (direita). A FIG. 9B mostra os volumes de tumores individuais de camundongos no Grupo 8 (esquerda superior), Grupo 9 (direita superior), e Grupo 10 (fundo). A FIG. 9C mostra os volumes de tumores individuais dos camundongos no Grupo 11 (esquerda superior), Grupo 12 (direita superior), e Grupo 13 (fundo).

[0013] A FIG. 10 é uma representação gráfica mostrando a sobrevivência dos camundongos em todos os grupos (Grupos 1 a 13). Os camundongos nos grupos foram tratados com dosagem concomitantes ou em fases de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1 ou tratados com controle(s), como indicado na legenda da figura.

[0014] A FIG. 11 é uma representação gráfica mostrando a sobrevivência dos grupos de camundongo tratados com dosagem concomitante de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle, como indicado na legenda da figura.

[0015] A FIG. 12 é uma representação gráfica mostrando a sobrevivência dos grupos de camundongo tratados com dosagem em fases de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, e grupo(s) tratado(s) com controle(s), como indicado na legenda da figura.

[0016] A FIG. 13 é uma representação gráfica mostrando a sobrevivência dos grupos de camundongo tratados com a dosagem em fases de anticorpos anti-PD1 e anticorpos anti-ICOS, com anticorpos anti-PD1 como dose inicial e anticorpos anti-ICOS como dose de acompanhamento, e o(s) grupo(s) tratado(s) com controle(s), como

indicado na legenda da figura.

[0017] A FIG. 14 é uma representação gráfica mostrando a sobrevivência dos grupos de camundongo tratados com dosagem em fases de anticorpos anti-ICOS e anticorpos anti-PD1, com anticorpos anti-ICOS como dose inicial e anticorpos anti-PD1 como dose de acompanhamento, e grupo(s) tratado(s) com controle(s), como indicado na legenda da figura.

[0018] FIG 15: Desenvolvimento de um anticorpo monoclonal agonista de ICOS anti-humano

(A) H2L5 ligando ao ICOS dimérico humano (B) ICOS-L humano ligando ao ICOS dimérico humano (C) Ligação de H2L5 (20 $\mu\text{g/mL}$) a células T CD4 (**P = 0,0011, t = 4,183, df = 13) e CD8 (**P = 0,0078, t = 3,686, df = 7) de doadores saudáveis. Cada símbolo representa um doador humano separado, as linhas horizontais indicam a média, e as barras são a faixa interquartil (D) Western Blot representativo demonstrando a indução da sinalização de AKT nas células T ativadas purificadas depois do tratamento com H2L5 (E) Quantificação de das células T CD69⁺ CD4 (*P = 0,0142, t = 3,416 df = 6) ou CD8 (**P = 0,0012, t = 5,734 df = 6) e (F) quantificação das células T Ki67⁺ CD4 (*P = 0,0190, t = 3,809 df = 4) ou CD8 (*P = 0,0255, t = 3,474 df = 4) de doadores PBMC saudáveis tratados com (12,5 $\mu\text{g/mL}$) de H2L5 ligado e anti-CD3 por 48 hours. (G, H) Quantificação de IFN- γ solúvel de (G) do sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes saudáveis tratados com (12,5 $\mu\text{g/mL}$) de H2L5 ligado e anti-CD3 por 24 horas **P = 0,0041, t = 4,510 df = 6 ou 48 horas *P = 0,0375, t = 2,661 df = 6 (H) o sobrenadante PBMC do paciente com câncer NSCLC tratado com (10 $\mu\text{g/mL}$) H2L5 ligado e anti-CD3 por 72 horas. (I, K) Quantificação da expressão de RNA de (I) T-Bet (TBX21) (*P = 0,0156, t = 2,974 df = 9) e (J) Granzima B (GZMB) (**P = 0,0020, t = 4,292 df = 9) (K) L-Selectina (SELL) (*P = 0,0161, t = 2,955 df = 9) de células T CD3⁺ de um doador saudável após os

tratamentos indicados analisados por um teste em t de duas caudas emparelhado. H2L5 induz os aumentos dependentes de concentração na produção de citocina e ativação da célula T das suspensões de célula tumoral desagregadas. As placas foram revestidas com H2L5 +/- anti-CD3 ou controle de isótipo. (L) IFN- γ , (M) CD8+ OX40+, (N) CD8+ CD25+ após 6 dias de cultura. As barras = Médias dos Grupos $p < 0,05$ por Anova de Via Única, ** $P < 0,05$ *** $P < 0,0005$, **** $P < 0,000$ por Anova de Via Única. Linha tracejada = CD3 + isótipo IgG4 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ver a Fig. S7 para os tipos de tumores.

[0019] FIG 16: Isótipo de Anticorpo e encaixe de Fc γ R são críticos para a função de H2L5

(A) PBMC de pacientes saudáveis tratados com H2L5 solúvel de isótipos variantes a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 6 dias. A proliferação como medido por diluição de CFSE com relação ao controle de isótipo (mudança de dobra) (B, C) PBMCs de pacientes saudáveis, com ou sem esgotamento das células NK; tratadas com (B) H2L5 solúvel de isótipos variantes a (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 6 dias. (C) H2L5 solúvel de isótipos variantes (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 24 horas e porcentagem de células mortas determinadas pela citometria de fluxo usando uma matriz NIR Viva/Morta. Um anticorpo anti-CD52 conhecido induzir o extermínio das células T mediado por ADCC foi incluído como um controle positivo. (D) A expressão de ICOS nos pacientes recentemente dissociados TIL. A intensidade fluorescente média de ICOS das populações de células CD4, CD8, T_{reg}, e T_{eff}. (Triângulo Sólido de Tipos de Tumores = NSCLC (6) Círculo Sólido = CRC (4) Diamante Sólido = bexiga (2) Quadrado sólido = cabeça/pescoço (1) Triângulo Aberto = RCC (4) Círculo aberto = Endometrial (2) Diamante aberto = Próstata (1) Quadrado aberto = Tireoide (1); $p < 0,05$ por Anova de Via Única). O encarte mostra o histograma da expressão de ICOS em CD4 (Vermelho), CD8 (Laranja) e T_{reg} (Azul) de um paciente com câncer

endometrial.

[0020] (E) A correlação de Spearman entre os números do receptor de ICOS totais (calculada multiplicando-se o ICOS em por cento positivo para cada tipo de célula através do número receptor de ICOS por célula positiva) e indução de dobra do ensaio repórter Fc γ R11A nas células alvo isoladas de PBMCs e tumores de pacientes na presença de H2L5 isótipo IgG1 com relação ao controle de isótipo para todas as amostras onde ambos os pontos de dados foram disponíveis ($r^2 = 0,681$, $p < 0,001$). A indução de dobra (F) observada em um ensaio repórter Fc γ R11A usando as células alvo isoladas de um tumor de paciente NSCLC 5001003 incubadas com anticorpos anti-ICOS. CD4 T_{eff}, as células T CD8 e T_{reg} foram isoladas de um tumor de paciente dissociado e utilizadas como células alvo no ensaio de Fc γ R11A.

[0021] A FIG. 17: H2L5 apresenta um agonismo dependente de FcR para induzir a ativação da célula T

(A) As células T CD4 isoladas de pacientes saudáveis tratadas com concentrações indicadas de H2L5 por 60 horas (isótipo ligado vs. H2L5 ligado ***P = 0,0006, t = 9,777 df = 4, isótipo solúvel vs. H2L5 solúvel ***P = 0,0003, t = 11,50 df = 4 e (#)H2L5 ligado vs. H2L5 solúvel **P = 0,0017, t = 7,530 df = 4) (B) PBMC de um paciente não saudável tratado com H2L5 solúvel (IgG4PE de ICOS) ou Fc de H2L5 desativado a (10 μ g/mL) por 3,5 dias (controle de isótipo vs. H2L5 **P = 0,0056, t = 5,426 df = 4), (H2L5 vs. Fc de H2L5 desativado **P = 0,0012, t = 8,297 df = 4) (C) MLR com anticorpo anti-CD3 seguido pelo tratamento com H2L5 solúvel ou anticorpo Fc de H2L5 desativado a (10 μ g/mL) (controle de isótipo vs. H2L5 *P = 0,0166, t = 3,966 df = 4), (H2L5 vs. Fc de H2L5 desativado *P = 0,0158, t = 4,022 df = 4) (D) As células T isoladas cultivadas com e sem monócitos do mesmo doador seguido pelo tratamento com H2L5 solúvel ou Fc de H2L5 desativado a (10 μ g/mL) +/- anti-CD32

ou anticorpo de bloqueio de Fc por 4 dias. (#) ***P = 0,0009, t = 8,734 df = 4, (\$) **P = 0,0031, t = 6,405 df = 4, (&) *P = 0,0389, t = 3,026 df = 4, (@) controle de isótipo vs. H2L5 **P = 0,0027, t = 6,612 df = 4, H2L5 vs. Fc de H2L5 desativado *P = 0,0239, t = 3,544 df = 4, H2L5 (controle) vs. H2L5 (anti-CD32) **P = 0,0066, t = 5,184 df = 4, H2L5 (anti-CD32) vs. H2L5 (bloqueio de Fc) **P = 0,0013, t = 8,047 df = 4 e H2L5 (controle) vs. H2L5 (bloqueio de Fc) *P = 0,0446, t = 2,889 df = 4. (E, F) As células T humanas pré-estimuladas com anti-CD3 por 48 horas e adicionadas a uma cocultura com DC humano. H2L5 IgG4PE rotulado com AlexaFlour488 adicionado a 3 µg/ml às coculturas em gelo e depois movidas para 37° C para pontos de tempo indicados. As setas indicam as células T ativadas em resposta ao tratamento com H2L5, polarização e mobilização para as células dendríticas adjacentes. Os dados representativos dos três experimentos separados realizados usando diferentes células doadoras.

[0022] A FIG. 18: H2L5 induz um fenótipo EM e atividade antitumoral em um modelo de camundongo humanizado.

(A) Quantificação de células CD45⁺CD3⁺ humanas no tratamento H2L5 com sangue de camundongos como comparado ao controle de isótipo IgG4PE (****P = <0,0001, F = 33,57, df = 24) (B) Quantificação das células CD45⁺CD3⁺CD69⁺ humanas do H2L5 do sangue de camundongos (1,2 mg/kg) vs. controle de isótipo IgG4PE (*P = 0,0119, F = 4,179, df = 24) (C) Porcentagem de CD4⁺ T_{CM} (0,04 mg/kg **P = 0,0038, 0,4 mg/kg ***P = 0,0002, 1,2 mg/kg ***P = 0,0005, F = 8,172, df = 20. Isto é equivalente a 0,8, 8 e 24 µg por camundongo, respectivamente. (D) CD8⁺ T_{naive}/T_{TEMRA} de memória efetora terminalmente diferenciada (0,004 mg/kg **P = 0,0036, 0,04 mg/kg e 0,4 mg/kg ****P = <0,0001, 1,2 mg/kg **P = 0,0072, F = 13,78, df = 20) no baço de camundongos (E). A porcentagem de ICOS⁺ ou células PD-1⁺ T em camundongos

subcutaneamente implantadas com o tumor A549 e identificadas usando-se IgG4 de camundongo anti-humano PE conjugado por citometria de fluxo. (F) A razão das células CD8/T_{reg} nos tecidos tumorais integrais (G) volumes tumorais HCT116 no dia 13 (0,04 mg/kg) *P = 0,0273, (0,4 mg/kg) *P = 0,0432, F = 2,788, df = 36 (H) volumes tumorais A549 no dia 21 (0,4 mg/kg) *P = 0,0056, F = 3,906, df = 36 (i) curva de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos NSG enxertados com PBMC humano com tumores A549 (A-I) linhas horizontais representam os valores médios, as barras de erro representam a faixa interquartil. Todos os testes estatísticos foram ANOVA de via única.

[0023] FIG. 19: O isótipo de ICOS mAb de murinos influencia a eficácia em tumores singenéticos.

(A) as representações gráficas de Kaplan-Meier de camundongos com tumores singenéticos murinos (A) EMT6, CT26 murino (B) tratados com as doses indicadas (5, 100 ou 200 µg correspondendo a 0,5, 5 e 10 mg/Kg respectivamente das versões de IgG1 ou IgG2a de murino do anticorpo 7E,17G9 duas vezes por semanas por 3 semanas ou controle de isótipo (200 µg ou 10 mg/kg). Os resultados são representativos de dois experimentos repetidos. Cada símbolo representa um camundongo individual. As linhas horizontais representam os valores médios, as barras de erro representam a faixa interquartil. Todos os testes estatísticos foram ANOVA de via única, seguido pelos comparadores de tratamento específico. (C) a razão de CD8⁺/T_{reg} em tumores EMT6 ou CT26 determinados no tamanho de tumor 100 mm³; (D) A porcentagem de células ICOS⁺ CD4, CD8 e T_{reg} em tumores (círculos fechados) ou baços (círculo abertos) de camundongos implantados com tumores EMT6; MFI de ICOS em células CD8, CD4 e T_{reg} em tumores (círculos fechados) ou baço (círculo abertos) em camundongos implantados com tumores (E) CT26 ou (F) EMT6 em tamanhos de tumores de 100 mm³. (G) Histograma

da representação gráfica do fluxo representativo comparando a MFI da expressão de ICOS em CD4, CD8 e T_{reg} isoladas de tumores EMT6 e CT26; (H) o número absoluto clones TCR expandidos no sangue do pós-tratamento com anti-ICOS 7E,17G9 que também foram encontrados no tumor EMT6 (10 µg *P = 0,0173 e 100 µg *P = 0,0483; F = 3,269 df = 28).

[0024] FIG. 20: Avaliação da expressão de ICOS em diferentes tipos de células em cânceres humanos. (A) Expressão de ICOS, ICOS-L e PD-L1 em diferentes tipos de tumores classificados pela expressão de ICOS do banco de dados de TCGA. (B) A expressão das células de ICOS+ pelo plex IHC único e a correlação com a expressão de PD-L1, PD-1, CD4, CD8, FOXP3 e CD3 em NSCLC. (C) % das células CD45+ que são CD3+, células B, monócitos, células NK, macrófagos, células dendríticas em tumores desagregados de diferentes tipos de tumores sólidos. Triângulo sólido = NSCLC (6) Círculo sólido = CRC (4) Diamante sólido = Bexiga (2) Quadrado sólido = Cabeça/Pescoço (1) Triângulo aberto = RCC (4) Círculo aberto = Endometrial (2) Diamante aberto = Próstata (1) Quadrado aberto = Tireoide (1). (D) A porcentagem de CD3+CD8+, CD3+CD4+Foxp3+ (T_{reg}) e a razão de CD3+, CD8+: CD3+CD4+Foxp3 em diferentes tipos de tumores. A linha horizontal mostra a média. (E) A quantificação da co-expressão das células CD3+PD-1+ICOS+ nas biópsias tumorais obtidas de diferentes tipos tumorais por IHC multiplexo. (F) O IHC multiplexo de uma amostra tumoral de cabeça e pescoço FFPE co-tingida para CD3, PD-1 e ICOS (G) Heatmap sumarizando os genes diferencialmente expressados nas células T humanas purificadas tratadas com H2L5 mais mAb anti-CD3 comparado ao anti-CD3 sozinho como determinado pela análise pelo Sistema NanoString nCounter usando o painel PanCancer-Immune humano (N = 6 doadores). (H) A expressão dos genes muda (aumento de dobra) comum entre anti-CD3 (0,6 µg/mL) mais células T humanas ativadas H2L5 (10 µg/mL) T (n = 6 doadores) e tumores

transplantáveis EMT6 murinos depois do tratamento substituto anti-ICOS (7E,17G9 IgG2b de rato).

[0025] FIG. 21: mAb agonista de ICOS induz a expressão de PD-1/PD-L1 e aumenta a atividade anti-PD-1

(A) Quantificação da expressão de RNA de PD-L1 (CD274) (10 μg *P = 0,0137 e 100 μg *P = 0,0374; F = 5,175 df = 10) e (B) PD-1 (Pdc1) (10 μg *P = 0,0194 e 100 μg P = 0,1626; F = 3,911 df = 10) em EMT6 após os tratamentos indicados. Cada símbolo representa uma amostra de camundongo individual, as linhas horizontais representam os valores médios, as barras de erro representam a faixa interquartil. Todos os testes estatísticos foram ANOVA de via única com os dados de raiz quadrada transformados para estabilizar as diferenças (C) Porcentagem de células T CD4⁺PD-1⁺ e CD8⁺PD-1⁺ após o tratamento com controle de isótipo ou H2L5 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 72 horas em PBMC de pacientes com câncer CD4⁺ *P = 0,0128, t = 3,026 df = 10; CD8⁺ **P = 0,005, t = 3,548, df = 10. O teste em t de duas caudas emparelhado (D). Porcentagem de CD4⁺ ICOS⁺ em NSCLC ou pacientes com melanoma pré- e pós-PD-1 terapia (pembrolizumab ou nivolumab) comparado com os pacientes saudáveis. (E) Camundongos com tumores EMT6 tratados com IgG1 7E,17G9 (10 μg equivalente a 0,5 mg/kg), anti-PD-1 (200 μg equivalente a 10 mg/kg) ou a combinação de 7E,17G9 e anti-PD-1 concomitantemente dosados, duas vezes por semana por 3 semanas. (N = 10 por grupo de tratamento) (F) volume de tumor A549 em camundongos NSG reconstituído com PBMC humano e tratado com H2L5 a 0,8 μg de camundongo equivalente a 0,04 mg/kg, isótipo 0,8 μg equivalente a 0,04 mg/kg ou anti-PD-1 (pembrolizumab/Keytruda) 100 μg equivalente a 5 mg/kg ou a combinação de ambos os anticorpos. (G) A quantificação de IFN- γ dos tumores dos pacientes NSCLC disseminados tratados com anti-CD3 e H2L5 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas. (#) **P = 0,0100 (\$) ****P =

<0,0001 (&) ***P = 0,002, F = 15,8, df = 20. As linhas horizontais representam os valores médios, as barras de erro representam a faixa interquartil (H) o ensaio de MLR avaliando ICOS + pembrolizumab vs. ICOS **P = 0,0036, IgG4PE ICOS + pembrolizumab vs. pembrolizumab **P = 0,0090, ICOS + pembrolizumab vs. 2x IgG4PE ***P = 0,0009, F = 7,324, df = 10. As barras representam a média da medição de triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão (C-E). Todos os testes estatísticos foram ANOVA de uma via).

[0026] FIG. 22: H2L5 de ligação ao epítipo IgG4PE (A) Um ensaio de competição ICOS-L por MSD demonstra que H2L5 IgG4PE parcialmente compete com ICOS-L pela ligação ao receptor de ICOS humano. (B) As células T ativadas foram incubadas com diferentes concentrações de ICOS-L recombinante (R&D systems) e depois incubadas com H2L5 e MFI de ICOS células CD4+ e CD8+ determinados por citometria de fluxo.

[0027] A FIG. 23: H2L5IgG4PE causa um aumento dependente da dose (A) na produção de citocina IFN γ , IL-17, IL-10, IL-4, IL-13, IL-5, IL-2, IL-6, TNF α medida por MSD (B) marcador de ativação OX40, CD25 e CD69 nas células T CD4 e CD8. PBMC foram cultivadas por 48 horas com anti-CD3 (0,6 μ g/ml) e diferentes concentrações de H2L5IgG4PE ou controle de isótipo e os sobrenadantes coletados para a análise de citocina e células para a citometria de fluxo.

[0028] FIG. 24: H2L5 induz o aumento dependente da concentração na produção de citocina das suspensões de célula tumoral desagregada dos pacientes com diferentes cânceres. As suspensões de células tumorais desagregadas foram cultivadas com H2L5IgG4PE unido à placa ou controle de isótipo na presença ou ausência de anti-CD3 após 6 dias de estímulo *in vitro* com anti-CD3 unido à placa (0,6 μ g/mL) e IL2 (100 ng/mL) seguido pela análise de (A) IL17,(B) IL10, (C) IL5, (D)

citocinas IL13 nos sobrenadantes por MSD.

[0029] A FIG. 25: H2L5 induz os aumentos dependentes da concentração em porcentagem de (A) CD8+LAG3 +, $p < 0,005$ pelo Anova de Via Única (B) CD8+ PD-1+, (C) células ICOS L + e (D) (CD4+, CD25+ Foxp3+) $p < 0,05$ por Anova de Via Única das suspensões de células tumorais desagregadas de diferentes pacientes com câncer. As suspensões de células tumorais desagregadas foram cultivadas com H2L5 de ligação de placa (ICOS) IgG4PE ou controle de isótipo na presença ou ausência de anti-CD3 após 6 dias de estímulo *in vitro* com anti-CD3 de ligação em placa (0,6 $\mu\text{g/mL}$) e IL-2 (100 ng/mL) seguido pela citometria de fluxo. Linha pontilhada = CD3 + 10 $\mu\text{g/mL}$ de isótipo IgG4. As barras horizontais representam a média.

[0030] FIG. 26: IgG1 de H2L5 induz a via de sinalização do Fc γ R de ativação principal (Fc γ RIIIa) responsável por ADCC em humanos. (A) Tratamento das células efectoras Jurkat-Fc γ RIIIa-NFAT-luciferase e células T CD4⁺ humanas primárias em uma razão de 6:1 com H2L5 solúvel de variantes de isótipos por 6 horas. Um anticorpo anti-CD52 conhecido induzir o extermínio da célula T mediado por ADCC foi incluído como um Tratamento de controle positivo (B) das células efectoras Jurkat-Fc γ RIIIa-NFAT-luciferase e tumor *ex vivo* humano primário purificado derivado de CD4, CD8 e Tregs em uma razão de 6:1 com IgG1 de H2L5 solúvel para uma mudança de dobra de 6 horas na indução de luciferase produzida pelas células efectoras de Jurkat-Fc γ RIIIa-NFAT-luciferase com relação ao controle de isótipo.

[0031] A FIG. 27: H2L5 causa a ligação dependente de dose ao ICOS que expressam as células T no sangue e tumor. A porcentagem de células T ICOS⁺ ou PD-1⁺ no sangue integral (A) e tecidos tumorais (B) dentro de cada grupo, 48 horas após a 4^a dose identificada usando PE de IgG4 de camundongo anti-humano conjugada por citometria de fluxo. As

barras representam os valores médios para cada grupo.

[0032] FIG. 28: Caracterização de um anticorpo agonista de ICOS anti-murino. O anticorpo agonista de ICOS anticamundongo (7E,17G9) induz a produção de $\text{IFN}\gamma$ em esplenócitos de camundongo disseminados cultivados *ex vivo* por 60 horas.

[0033] FIG. 29: Crescimento de Tumor (A) EMT6 ou (B) CT26 tumores de murinos singenéticos tratados com doses de 10 (0,5 mg/kg), 100 (5 mg/kg) ou 200 μg (10 mg/kg) de variantes de IgG1 ou Ig2a de murino de anticorpo 7E,17G9 ou controle de isótipo (200 μg (10 mg/kg) duas vezes por semana durante 3 semanas. *(número) indica o número camundongos com tumores minimamente detectáveis ou não detectáveis no ponto final do estudo.

[0034] FIG. 30: % das células ICOS+ dentro das populações de CD4, CD8 e Treg em tumores (círculos fechados) e baços (círculo abertos) de camundongos carregando tumores CT26 com $\sim 100 \text{ mm}^3$.

[0035] FIG. 31: (A) número absoluto de clones TCR contraídos no sangue pós-tratamento com anticorpo Anti-ICOS 7E17G9 no com relação ao sangue do pré-tratamento (10 μg *P = 0,0327 e 100 μg *P = 0,0497; F = 3,033 df = 28) (B) número absoluto de clones de TCR expandidos no sangue pós-tratamento com relação ao sangue pré-tratamento (10 μg P = 0,0975 e 100 μg P = 0,1915; F = 1,958 df = 28) (C) A estimativa da fração de célula T média vs capacidade de clonagem produtiva média.

[0036] FIG. 32: Expressão de células positivas de ICOS em NSCLC, câncer de mama e CRC através da detecção Imunohistoquímica IHC de ICOS em câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC), câncer de mama (BrCA) TNBrCa, e câncer colorretal (CRC), usando um clone SP98 de CD278 Monoclonal de anticorpo de coelho anti-humano (Spring Biosciences). O ensaio foi realizado em Leica Bond RX com reagentes de plataforma associados. DAB (3, 3'-diaminobenzidina) foi

usado para a detecção de alvo. As seções foram contratingidos com Hematoxilina (Todas as barras em escala = 20 μ m).

[0037] FIG. 33: As mudanças nos níveis de citocina do doador humano PBMC em resposta ao tratamento com anti-CD3 mais o controle de isótipo ou H2L5 anticorpo IgG4PE a 12,5 μ g/mL.

[0038] FIG. 34: Indução de Citocina de PBMC dos pacientes de NSCLC após o tratamento com controle de isótipo ou anticorpo IgG4PE de H2L5 a 10 μ g/ml por 72 horas.

[0039] FIG. 35: Afinidade de ligação de diferentes variantes de isótipo de anticorpo H2L5 humanizado para FcgR humano.

[0040] FIG. 36: Afinidade de ligação de diferentes variantes do isótipo 7E-17G9 ao FcR murino.

[0041] FIG. 37: Expressão de mRNA das células positivas para ICOS em diferentes patologias tumorais de TCGA.

[0042] FIG. 38: Mudanças de expressão de gene com tratamento anti CD3 + H2L5 comparado ao CD3 sozinho nas células T humanas como medido por Nanostring.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0043] Em um aspecto, a presente invenção provê métodos para tratar o câncer em um paciente em necessidade deste compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente direcionado à ICOS humana e uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano sequencialmente, em que a administração do agente direcionado ao ICOS humano é seguido pela administração do agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano. Em uma modalidade, o agente direcionado ao ICOS humano é um agonista de ICOS. Em uma modalidade, o agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano é um antagonista de PD1.

[0044] Em um aspecto, a presente invenção provê um anticorpo

anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste e um anticorpo anti-PD1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste para o uso sequencial no tratamento do câncer em um ser humano em necessidade deste, em que a administração dos anticorpos anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste é seguido pela administração dos anticorpos anti-PD1 ou fragmentos de ligação ao antígeno deste. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD1 ou fragmentos de ligação ao antígeno destes é um antagonista de PD1. Em uma modalidade, os anticorpos anti-ICOS ou fragmentos de ligação aos antígenos destes é um agonista de ICOS.

[0045] Em um aspecto, a presente invenção provê um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste e um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste para o uso sequencial no tratamento do câncer em um ser humano em necessidade deste, em que a administração dos anticorpos anti-ICOS ou fragmentos de ligação ao antígeno deste é após a administração do anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PDL1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste é um antagonista de PD1. Em uma modalidade, os anticorpos anti-ICOS ou fragmentos de ligação ao antígeno destes é um agonista de ICOS.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

[0046] Como aqui usado “ICOS” significa qualquer proteína coestimuladora da célula T induzível. Os pseudônimos para os ICOS (coestimulador da célula T induzível) incluem AILIM; CD278; CVID1, JTT-1 ou JTT-2, MGC39850, ou 8F4. ICOS é uma molécula coestimuladora da superfamília CD28 que é expressada nas células T ativadas. A proteína codificada por este gene pertence à família receptora de superfície celular CD28 e CTLA-4. Esta forma homodímeros e desempenha um papel importante na sinalização de célula-célula, respostas

imunes, e regulação da proliferação celular. A sequência de aminoácidos da ICOS humana (isoforma 2) (No de aquiescência.: UniProtKB - Q9Y6W8-2) é mostrada abaixo como SEQ ID NO:9.

MKSGLWYFFLFCLRIKVLGTGEINGSANYEMFIFHNGG
VQILCKYDPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSLKFC
HSQLSNNVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHI
YESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKM (SEQ ID
NO:9)

[0047] A sequência de aminoácidos da ICOS humana (isoforma 1) (No. de aquiescência: UniProtKB - Q9Y6W8-1) é mostrada abaixo como SEQ ID NO:10.

MKSGLWYFFL	FCLRIKVLGT	EINGSANYEM
FIFHNGGVQI	LCKYDPDIVQQ	
FKMQLLKGGQ	ILCDLTKTKG	SGNTVSIKSL
KFCHSQLSNN	SVSFFLYNLD	
HSHANYYFCN	LSIFDPPPFK	VTLTGGYLHI
YESQLCCQLK	FWLPIGCAAF	
VVVCILGCIL	ICWLTKKKYS	SSVHDPNGEY
MFMRVNTAK	KSRLTDVTL	

(SEQ ID NO: 10)

[0048] A ativação dos ICOS ocorre através da ligação por ICOS-L (B7RP-1/B7-H2). Nem B7-1 nem B7-2 (ligantes para CD28 e CTLA4) ligam ou ativam a ICOS. Contudo, a ICOS-L foi mostrada ligar fracamente tanto à CD28 quanto à CTLA-4 (Yao S *et al.*, “B7-H2 is a costimulatory ligand for CD28 in human”, *Immunity*, 34(5); 729-40 (2011)). A expressão dos ICOS parece ser restrita às células T. Os níveis de expressão de ICOS variam entre diferentes subconjuntos de célula T e no estado da ativação da célula T. A expressão de ICOS foi mostrada no teste das células TH17, T auxiliares foliculares (TFH) e T reguladoras (Treg); contudo, diferente de

CD28; esta não é altamente expressada nas populações ingênuas das células T efectoras T_H1 e T_H2 (Paulos CM *et al.*, “The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells”, *Sci Transl Med*, 2(55); 55ra78 (2010)). A expressão de ICOS é altamente induzida nas células T efectoras CD4+ e CD8+ após a ativação através do encaixe de TCR (Wakamatsu E, *et al.*, “Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells”, *Proc Natl Acad Sci EUA*, 110(3); 1023-8 (2013)). A sinalização coestimuladora sinalizando através do receptor de ICOS apenas ocorre nas células T que recebem um sinal de ativação TCR simultâneo (Sharpe AH and Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”, *Nat. Rev Immunol*, 2(2); 116-26 (2002)). Nas células T específicas ao antígeno ativadas, o ICOS regula a produção tanto das citocinas tanto T_H1 quanto T_H2 incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, IL-13 e outros. O ICOS também estimula a proliferação da célula T efetora, embora a um menor grau do que CD28 (Sharpe AH and Freeman GJ. “The B7-CD28 Superfamily”, *Nat. Rev Immunol*, 2(2); 116-26 (2002)). Anticorpos para ICOS e os métodos de usar estes no tratamento da doença são descritos, por exemplo, na WO2012/131004, US20110243929, e US20160215059. A US20160215059 é aqui incorporada por referência. As CDRs para anticorpos murinos aos ICOS humanos tendo atividade agonista são mostradas na PCT/EP2012/055735 (WO 2012/131004). Os anticorpos para os ICOS também são divulgados na WO 2008/137915, WO 2010/056804, EP 1374902, EP1374901, e EP1125585. Os anticorpos agonistas para os ICOS ou proteínas que ligam aos ICOS são divulgados em WO2012/13004, WO2014/033327, WO2016/120789, US20160215059, e US20160304610. Os anticorpos exemplares na US2016/0304610 inclui 37A10S713. As sequências de 37A10S713 são reproduzidas abaixo como SEQ ID NOS: 14-21.

[0049] Cadeia pesada de região variável 37A10S713:
 EVQLVESGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
 DYWMDWVRQA PGKGLVWVSN IDEEDGSITEY SPFVKGRFTI
 SRDNAKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRWG RFGFDSWGQG
 TLVTVSS (SEQ. ID NO:14)

[0050] Região variável de cadeia leve 37A10S713:
 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL
 SGSFNYLTWY QQKPGQPPKL LIFYASTRHT GVPDRFSGSG
 SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCHHHYNAPP TFGPGTKVDI K (SEQ.
 ID NO:15)

37A10S713 V_H CDR1: GFTFSDYWMD (SEQ.ID NO:16)

37A10S713 V_H CDR2: NIDEDGSITEYSPFVKG (SEQ. ID
 NO: 17)

37A10S713 V_H CDR3: WGRFGFDS (SEQ. ID. NO: 18)

37A10S713 V_L CDR1: KSSQSLLSGSFNYLT (SEQ. ID
 NO: 19)

37A10S713 V_L CDR2: YASTRHT (SEQ. ID NO: 20)

37A10S713 V_L CDR3: HHHYNAPPT (SEQ. ID NO: 21)

[0051] Por “agente direcionado ao ICOS” é intencionado significar qualquer composto químico ou molécula biológica capaz de ligar ao ICOS. Em algumas modalidades, o agente direcionado ao ICOS é uma proteína de ligação ao ICOS. Em algumas outras modalidades, o agente direcionado ao ICOS é um agonista de ICOS.

[0052] O termo “proteína de ligação ao ICOS” como aqui usado se refere aos anticorpos e outras construções proteicas, tais como domínios, que são capazes de ligar ao ICOS. Em alguns exemplos, o ICOS é um ICOS humano. O termo “proteína de ligação ao ICOS” pode ser usado permutavelmente com “proteína de ligação ao antígeno de ICOS.” Deste modo, como é entendido na técnica, os anticorpos anti-ICOS e/ou proteínas

de ligação ao antígeno de ICOS seriam considerados proteínas de ligação de ICOS. Como aqui usado, a “proteína de ligação ao antígeno” é qualquer proteína, incluindo, mas não limitado aos anticorpos, domínios e outros construtos aqui descritos, que liga a um antígeno, tal como ICOS. Como aqui usado “porção de ligação ao antígeno” de uma proteína de ligação à ICOS incluiria qualquer porção da proteína de ligação de ICOS capaz de ligar à ICOS, incluindo, mas não limitado a, um fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno.

[0053] Em uma modalidade, os anticorpos de ICOS da presente invenção compreendem qualquer uma ou uma combinação das seguintes CDRs:

CDRH1: DYAMH (SEQ ID NO:1)

CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG (SEQ ID NO:2)

CDRH3: NNYGNYGWYFDV (SEQ ID NO:3)

CDRL1: SASSSVSYM (SEQ ID NO:4)

CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO:5)

CDRL3: FQGSGYPYT (SEQ ID NO:6)

[0054] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-ICOS da presente invenção compreendem uma cadeia pesada de região variável tendo pelo menos 90% de identidade de sequência à SEQ ID NO:7. Adequadamente, as proteínas de ligação aos ICOS da presente invenção podem compreender uma cadeia pesada de região variável tendo cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência para a SEQ ID NO:7.

Região Variável (H2) da Cadeia pesada humanizada (V_H):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT
 DYAMHWVRQA PGQGLEWMGL ISIYSDHTNY NQKFQGRVTI
 TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN YGNYGWYFDV
 WGQGTTVTVS S

(SEQ ID NO:7)

[0055] Em uma modalidade da presente invenção o anticorpo de ICOS compreende CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5), e CDRL3 (SEQ ID NO:6) na região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:8. As proteínas de ligação ao ICOS da presente invenção compreendendo a região variável de cadeia leve humanizada apresentada na SEQ ID NO:8 são indicadas como “L5.” Deste modo, uma proteína de ligação ao ICOS da presente invenção compreende a cadeia pesada de região variável da SEQ ID NO:7 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO:8 pode ser aqui indicada como H2L5.

[0056] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação ao ICOS da presente invenção compreendem uma região variável de cadeia leve tendo pelo menos 90% de identidade de sequência para a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:8. Adequadamente, as proteínas de ligação ao ICOS da presente invenção podem compreender uma região variável de cadeia leve tendo cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência para a SEQ ID NO:8.

Região Variável (L5) da Cadeia Leve Humanizada (V_L)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS
 YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGIPAR FSGSGSGTDY
 TLTSSLEPE DFAVYYCFQG SGYPYTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO:8)

[0057] As CDRs ou unidades de ligação mínimas podem ser modificadas em pelo menos uma substituição, exclusão ou adição de aminoácido, em que a proteína de ligação variante ao antígeno substancialmente retém as características biológicas da proteína não modificada, tal como um anticorpo compreendendo a SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8.

[0058] Será apreciado que cada um de CDR H1, H2, H3, L1, L2, L3 pode ser modificado sozinho ou em combinação com qualquer outra CDR, em qualquer outra permutação ou combinação. Em uma modalidade, um CDR é modificado através da substituição, exclusão ou adição de até 3 aminoácidos, por exemplo, 1 ou 2 aminoácidos, por exemplo, 1 aminoácido. Tipicamente, a modificação é uma substituição, particularmente, uma substituição conservativa, por exemplo, como mostrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1

Cadeia Lateral	Membros
Hidrofóbica	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrofílica neutra	Cys, Ser, Thr
Ácida	Asp, Glu
Básica	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Resíduos que influenciam a orientação de cadeia	Gly, Pro
Aromática	Trp, Tyr, Phe

[0059] A subclasse de um anticorpo, em parte determina as funções efetoras secundárias, tais como ativação de complemento ou ligação ao receptor de Fc (FcR) e citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) (Huber, *et al.*, Nature 229(5284): 419-20 (1971); Brunhouse, *et al.*, Mol Immunol 16(11): 907-17 (1979)). Na identificação do tipo ótimo de anticorpo para uma aplicação particular, as funções efetoras dos anticorpos podem ser levadas em consideração. Por exemplo, os anticorpos hIgG1 têm uma meia vida relativamente longa, são muito eficazes em fixar um complemento, e estes ligam tanto a FcγRI quanto a FcγRII. Ao contrário, os anticorpos IgG4 humanos têm uma meia vida mais curta, não fixam o complemento e têm uma afinidade inferior para as FcRs. A substituição da serina 228 com um prolina (S228P) na região Fc da IgG4 reduz a heterogeneidade observada com hIgG4 e estende a meia vida do soro (Kabat, *et al.*, “Sequences of proteins of immunological interest” 5.sup.^a Edição (1991); Angal, *et al.*, Mol Immunol 30(1): 105-8 (1993)). Uma segunda mutação que substitui a leucina 235 com um ácido glutâmico

(L235E) elimina a ligação de FcR residual e atividades de ligação complementares (Alegre, *et al.*, J Immunol 148(11): 3461-8 (1992)). O anticorpo resultante com ambas as mutações é indicado como IgG4PE. A numeração dos aminoácidos hIgG4 foi derivada da referência de numeração EU: Edelman, G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. EUA, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969. Em uma modalidade da presente invenção o anticorpo de ICOS é um isótipo de IgG4. Em uma modalidade, o anticorpo de ICOS compreende uma região Fc de IgG4 compreendendo a substituição S228P e L235E pode ter a indicação IgG4PE.

[0060] Como aqui usado “ICOS-L” e “ligante de ICOS” são usados permutavelmente e se referem ao ligante natural de ligação à membrana de ICOS humano. O ligante de ICOS é uma proteína que em seres humanos é codificada pelo gene *ICOSLG*. *ICOSLG* também foi indicado como CD275 (cluster de diferenciação 275). Os pseudônimos para ICOS-L incluem B7RP-1 e B7-H2.

[0061] Como aqui usado, um “agente direcionado ao PD-1” ou “agente direcionado ao PD1” significam qualquer composto químico ou molécula biológica capaz de ligar ao PD1. Em algumas modalidades, o agente direcionado ao PD1 é um antagonista de PD1.

[0062] O termo “proteína de ligação ao PD1” ou “proteína que liga ao PD-1” como aqui usado se refere aos anticorpos e outras formações de proteína, tais como domínios, que são capazes de ligar ao PD1. Em alguns exemplos, o PD1 é PD1humano. O termo “proteína que liga ao PD1” pode ser usado permutavelmente com a “proteína de ligação ao antígeno PD1.” Deste modo, como é entendido na técnica, os anticorpos anti-PD1 e/ou proteínas de ligação aos antígenos PD1 seriam considerados proteínas de ligação ao PD1. Como aqui usado, “proteína de ligação ao antígeno” é qualquer proteína, incluindo, mas não limitada aos anticorpos, domínios e outras formações aqui descritas, que ligam a um antígeno, tal como PD1.

Como aqui usado “porção de ligação ao antígeno” de uma proteína de ligação ao PD1 inclui qualquer porção da proteína de ligação ao PD1 capaz de ligar ao PD1, incluindo, mas não limitado a, um fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno.

[0063] A proteína de Morte Programada 1 (PD-1) é um membro inibidor da família CD28 dos receptores, que também inclui CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. PD-1 é expressado nas células B ativadas, células T, e células mielóides (Agata *et al.*, supra; Okazaki *et al.* (2002) *Curr. Opin. Immunol* 14:391779-82; Bennett *et al.* (2003) *J Immunol* 170:711-8) os membros iniciais da família, CD28 e ICOS, foram verificados através dos efeitos funcionais no aumento da proliferação da célula T após a adição dos anticorpos monoclonais (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenics* 10:247-260). PD-1 foi verificado através da triagem pela expressão diferencial nas células apoptóticas (Ishida *et al.* (1992) *EMBO J* 11:3887-95) os outros membros da família, CTLA-4, e BTLA foram verificados através da triagem para a expressão diferencial nos linfócitos T citotóxicos e células TH1, respectivamente. CD28, ICOS e CTLA-4 todos têm um resíduo de cisteína não emparelhado que permite a homodimerização. Ao contrário, PD-1 é sugerido existir como um monômero, sem o resíduo de cisteína não emparelhado característico nos outros membros da família CD28. Os anticorpos PD-1 e os métodos de uso no tratamento da doença são descritos nas Patente US Nos.: US 7.595.048; US 8.168.179; US 8.728.474; US 7.722.868; US 8.008.449; US 7.488.802; US 7.521.051; US 8.088.905; US 8.168.757; US 8,354,509; e Publicações US Nos. US20110171220; US20110171215; e US20110271358. As combinações de anticorpos CTLA-4 e PD-1 são descritas na Patente US No. 9.084.776.

[0064] Em algumas modalidades, o agente direcionado ao PD1 é um antagonista de PD1 e bloqueia ligação de PD-L1 expressada em uma

célula cancerosa ao PD-1 expressado em uma célula imune (célula T, célula B ou célula NKT) e também pode bloquear a ligação de PD-L2 expressada em uma célula cancerosa ao PD-1 expressado na célula imune. Os nomes alternativos ou sinônimos para PD-1 e seus ligantes incluem: PDCD1, PD1, CD279 e SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PDL1, B7H1, B7-4, CD274 e B7-H para PD-L1; e PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc e CD273 para PD-L2. A sequência de aminoácidos PD-1 humana pode ser encontrada em NCBI Locus No.: NP_005009. A sequência de aminoácidos em NCBI Locus No.: NP_005009 é reproduzida abaixo:

```

mqipqapwpv   vwavlqlgwr   pgwfldspdr   pwnpptfspa
llvvtgdna tfctsfnts
                esfvlnwurm   spsnqtdkla   afpedrsqpg   qdcrfrvtql   pngrdfhmsv
vrrrndsgt
                ylcgaislap   kaqikeslra   elrvterrae   vptahpspsp   rpagqfqlv
vgvvgllgs
                lvllvwvlav   icsraargti   garrtgqplk   edpsavpvfs   vdygeldfqw
rektpeppvp
                cvpeqteyat   ivfpsgmngts   sparrgsadg   prsaqplrpe   dghcswpl
(SEQ ID NO: 11)

```

[0065] As sequências de aminoácidos PD-L1 e PD-L2 humana podem ser encontradas em NCBI Locus No.: NP_054862 e NP_079515, respectivamente.

[0066] A sequência de aminoácidos em NCBI Locus No.: NP_054862 é reproduzida abaixo:

```

mrifavfifm   tywhllnaft   vtvpkdlyvv   eygsnmtiec   kfpvekqldl
aalivyweme
                dkniiqfvhg   eedllkvqhs   yrqrarllkd   qlslgnaalq   itdvklqdag
vyrcmisyyg
                adykritvkv   napynkinqr   ilvvdptvse   heltcqaegy   pkaeviwts

```

dhqvlsgktt

ttnskreekl fnvstlrin ttneifyct frrldepenh taelvipelp

lahppnerth

lvilgailc lgvaltfifr lrkgrmmdvk kcgiaqdtnsk kqsdthleet (SEQ

ID NO: 12)

[0067] A sequência de aminoácidos em NCBI Locus No.: NP_079515 é reproduzida abaixo:

mifllmlsl elqlhquiaal fvtvtpkely iiehgsvtl ecnfdtgshv

nlgaitaslq

kvendtsphr eratleeql plgkasfhip qvqvrdeggy qciiygvaw

dykyltlkvk

asyrkinthi lkvpemdeve ltcqatgypl aevswpnvsv pantshrtp

eglyqvtsvl

rlkpppgrnf scvfwnthvr eltlasidlq sqmeprthpt wllhifipfc

iiafifiatv

ialrkqlcqk lysskdttkr pvttkrevn sai (SEQ ID NO: 13)

[0068] Os agentes direcionados ao PD-1 em qualquer um dos aspectos ou modalidades da presente invenção incluem um anticorpo monoclonal (mAb), ou fragmento de ligação ao antígeno deste, que especificamente liga ao PD-1. Em algumas modalidades, o mAb para PD-1 especificamente liga ao PD-1 humano. O mAb pode ser um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo quimérico, e pode incluir uma região constante humana. Em algumas modalidades, a região constante humana é selecionada a partir do grupo consistindo nas regiões constantes IgG1, IgG2, IgG3 e, e nas modalidades preferidas, a região constante humana é uma região constante IgG1 ou IgG4. Em algumas modalidades, o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado a partir do grupo consistindo em fragmentos de Fab, Fab'-SH, F(ab')₂, scFv e Fv.

[0069] Os Exemplos de mAbs que ligam ao PD-1 humano, e úteis

em vários aspectos e modalidades da presente invenção, são descritos na Patente US No. 8.552.154; Patente US No. 8.354.509; Patente US No. 8.168.757; Patente US No. 8.008.449; Patente US No. 7.521.051; Patente US No. 7.488.802; WO2004072286; WO2004056875; e WO2004004771.

[0070] Outras proteínas de ligação ao PD-1 úteis em qualquer um dos aspectos e modalidades da presente invenção incluem uma imunoadesina que especificamente liga a PD-1, e de maneira preferível especificamente liga ao PD-1 humano, por exemplo, uma proteína de fusão contendo a porção extracelular ou de ligação ao PD-1 de PD-L1 ou PD-L2 fundida a uma região constante tal como uma região Fc de uma molécula de imunoglobulina. Os exemplos de moléculas de imunoadesina que especificamente ligam ao PD-1 são descritos na WO2010027827 e WO2011066342. As proteínas de fusão específicas úteis como o antagonista de PD-1 no método de tratamento, medicamentos e usos da presente invenção incluem AMP-224 (também conhecido como B7-DCIg), que é uma proteína de fusão PD-L2-FC e liga ao PD-1 humano.

[0071] OPDIVO/nivolumab é um anticorpo monoclonal completamente humano comercializado pela Bristol Myers Squibb direcionado contra o receptor de superfície de célula humana imunorreguladora negativa PD-1 (célula de morte programada-1 ou morte programada-1/PCD-1) com atividade de imunopotenciamento. Nivolumab liga a e bloqueia a ativação de PD-1, uma proteína de transmembrana da superfamília Ig, através de seus ligantes PD-L1 e PD-L2, resultando na ativação das células T e respostas imunes mediadas por célula tumorais ou patógenos. O PD-1 ativado regula negativamente a ativação da célula T e a função efetora através da inibição da ativação do caminho de P13k/Akt. Outros nomes para o nivolumab incluem: BMS-936558, MDX-1106, e ONO-4538. A sequência de aminoácidos para nivolumab e os métodos de uso e fabricação são descritos na Patente US No. US 8.008.449.

[0072] KEYTRUDA/pembrolizumab é um anticorpo anti-PD-1 comercializado para o tratamento do câncer no pulmão pela Merck. A sequência de aminoácidos de pembrolizumab e métodos de uso são divulgados na Patente US No. 8.168.757.

[0073] Por “agente direcionado ao PD-L1” é intencionado significar qualquer composto químico ou molécula biológica capaz de ligar ao PD-L1. Em algumas modalidades, o agente direcionado ao PD-L1 é uma proteína de ligação ao PD-L1.

[0074] O termo “proteína de ligação ao PDL1” ou “proteína de ligação ao PD-L1” como aqui usado se refere aos anticorpos e outras formações proteicas, tais como os domínios que são capazes de ligar ao PD-L1. Em alguns exemplos, o PD-L1 é PD1 humano. O termo “proteína de ligação ao PD-L1” pode ser usado permutavelmente com a “proteína de ligação ao antígeno PD-L1.” Deste modo, como é entendido na técnica, os anticorpos anti-PD-L1 e/ou proteínas de ligação ao antígeno PD-L1 seriam considerados proteínas de ligação ao PD-L1. Como aqui usado, “proteína de ligação ao antígeno” é qualquer proteína, incluindo, mas não limitado aos anticorpos, domínios e outras formações aqui descritas, que ligam a um antígeno, tal como PD-L1. Como aqui usado “porção de ligação ao antígeno” de uma proteína de ligação ao PD-L1 incluiria qualquer porção da proteína de ligação a PD-L1 capaz de ligar ao PD-L1, incluindo, mas não limitado a, um fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno.

[0075] Em algumas modalidades, o agente direcionado ao PD-L1 é um antagonista de PD1 e bloqueia a ligação de PD-L1 expressada em uma célula cancerosa ao PD-1 expressado em uma célula imune (célula T, célula B ou célula NKT) e também pode bloquear a ligação de PD-L2 expressada em uma célula cancerosa ao PD-1 expressado em célula imune.

[0076] O PD-L1 é um membro da família B7 que é expressado em muitos tipos celulares, incluindo APCs e células T ativadas (Yamazaki *et*

al. (2002) *J. Immunol.* 169:5538). PD-L1 liga tanto a PD-1 quanto a B7-1. Ambas as ligações de B7-1 expressados na célula T através de PD-L1 e a ligação de PD-L1 expressado pela célula T por B7-1 resultam na inibição da célula T (Butte *et al.* (2007) *Immunity* 27:111). Também há a evidência de que, como outros membros da família B7, PD-L1 também pode prover sinais coestimuladores para as células T (Subudhi *et al.* (2004) *J. Clin. Invest.* 113:694; Tamura *et al.* (2001) *Blood* 97:1809). PD-L1 (o cDNA de PD-L1 humano é composto da sequência de base mostrada por EMBL/GenBank Acc. No. AF233516 e o cDNA PD-L1 de camundongo é composto da sequência de base mostrada em NM.sub.--021893) que é um ligando de PD-1, é expressado nas então chamadas células que apresentam antígeno (APCs) tais como monócitos ativados e células dendríticas (*Journal of Experimental Medicine* (2000), vol. 19, edição 7, p 1027-1034). Estas células apresentam as moléculas de interação que induzem uma variedade de sinais indutivos imunológicos para os linfócitos T, e PD-L1 é uma destas moléculas que induzem o sinal inibidor por PD-1. Foi revelado que o estímulo do ligando PD-L1 inibiu a ativação (proliferação celular e indução de várias produções de citocina) dos linfócitos T que expressam o PD-1. A expressão de PD-L1 foi confirmada não somente em células imunocompetentes, mas também em um certo tipo de linhagens de células tumorais (linhagens celulares derivadas de leucemia monocítica, linhagens celulares derivadas de células mamárias, linhagens celulares derivadas de carcinomas hepáticos, linhagens celulares derivadas de neuroblastos, e linhagens celulares derivadas de carcinomas de mama) (*Nature Immunology* (2001), vol. 2, edição 3, p. 261-267).

[0077] Os anticorpos anti-PD-L1 e métodos para fabricá-los são conhecidos na técnica. Tais anticorpos ao PD-L1 podem ser policlonais ou monoclonais, e/ou recombinantes, e/ou humanizados, e/ou completamente humanos. Os anticorpos PD-L1 estão em desenvolvimento como agentes

imunomoduladores para o tratamento de câncer.

[0078] Os anticorpos PD-L1 exemplares são divulgados na Patente US No. 9.212.224; Patente US No. 8.779.108; Patente US No 8.552.154; Patente US No. 8.383.796; Patente US No. 8.217.149; Publicação de Pedido US No. 20110280877; WO2013079174; e WO2013019906. Os anticorpos exemplares adicionais para PD-L1 (também indicados como CD274 ou B7-H1) e métodos para o uso são divulgados na Patente US No. 8.168.179; Patente US No. 7.943.743; Patente US No. 7.595.048; WO2014055897; WO2013019906; e WO2010077634. Os anticorpos monoclonais PD-L1 anti-humanos específicos úteis como um antagonista de PD-1 no método de tratamento, medicamentos e uses da presente invenção incluem MPDL3280A, BMS-936559, MEDI4736, MSB0010718C.

[0079] Atezolizumab é um anticorpo anti-PD-L1 monoclonal completamente humanizado comercialmente disponível como TECENTRIQ. Atezolizumab é indicado para o tratamento de alguns carcinomas uroteliais localmente avançados ou metastáticos. Atezolizumab bloqueia a interação de PD-L1 com PD-1 e CD80.

[0080] Durvalumab (previamente conhecido como MEDI4736) é um anticorpo humano monoclonal direcionado contra PD-L1. Durvalumab bloqueia a interação de PD-L1 com PD-1 e CD80. Durvalumab é comercialmente disponível como IMFINZI®.

[0081] Os anticorpos para PD-L1 (também indicados como CD274 ou B7-H1) e os métodos para o uso são divulgados na Patente US No. 7.943.743; Patente US No. 8.383.796; US20130034559, WO2014055897, Patente US No. 8.168.179; e Patente US No. 7.595.048. Os anticorpos PD-L1 estão em desenvolvimento como agentes imuno-moduladores para o tratamento de câncer.

[0082] Como aqui usado o termo “agonista” se refere a uma

proteína de ligação ao antígeno incluindo, mas não limitada a um anticorpo, que no contato com um receptor de co-sinalização causa um ou mais dos seguintes (1) estimula ou ativa o receptor, (2) intensifica, aumenta ou promove, induz ou prolonga uma atividade, função ou presença de um receptor e/ou (3) intensifica, aumenta, promove ou induz a expressão do receptor. A atividade agonista pode ser medida *in vitro* através de vários ensaios conhecidos na técnica tais como, mas não limitado à medição da sinalização celular, proliferação celular, marcadores da ativação da célula imune, produção de citocina. A atividade agonista também pode ser medida *in vivo* através de vários ensaios que medem os pontos finais substitutos, tais como, mas não limitados à medição da proliferação da célula T ou produção de citocina.

[0083] Como aqui usado, o termo “antagonista” se refere a uma proteína de ligação ao antígeno incluindo, mas não limitado a um anticorpo, que no contato com um receptor de co-sinalização causa um ou mais dos seguintes (1) atenua, bloqueia ou inativa o receptor e/ou bloqueia a ativação de um receptor através do seu ligando natural, (2) reduz, diminui ou encurta a atividade, função ou presença do receptor e/ou (3) reduz, diminui, anula a expressão do receptor. A atividade antagonista pode ser medida *in vitro* através de vários ensaios conhecidos na técnica tais como, mas não limitados a medição de um aumento ou diminuição na sinalização celular, proliferação celular, marcadores da ativação da célula imune, produção de citocina. A atividade antagonista também pode ser medida *in vivo* através de vários ensaios que medem os pontos finais substitutos tais como, mas não limitados à medição da proliferação da célula T ou produção de citocina.

[0084] Como aqui usado, o termo “compete em cruzado para a ligação” se refere a qualquer agente tal como um anticorpo que competirá para ligar a um alvo com qualquer um dos agentes da presente invenção. A

competição para ligação entre dois anticorpos pode ser testada através de vários métodos conhecidos na técnica, incluindo a citometria de fluxo, Descoberta de Meso Escala e ELISA. A ligação pode ser medida diretamente, significando que duas ou mais proteínas de ligação podem ser colocadas em contato com um receptor de co-sinalização e a ligação pode ser medida para uma ou outra. Alternativamente, a ligação ou atração de moléculas podem ser testadas contra a ligação ou ligante natural e quantitativamente comparadas umas com as outras.

[0085] O termo “proteína de ligação” como aqui usado se refere aos anticorpos e outras formações proteicas, tais como domínios, que são capazes de ligar a um antígeno.

[0086] O termo “anticorpo” é aqui usado no sentido mais amplo para se referir às moléculas com um domínio semelhante à imunoglobulina (por exemplo, IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE) e inclui os anticorpos monoclonais, recombinantes, policlonais, quiméricos, humanos, humanizados, multiespecíficos, incluindo os anticorpos biespecíficos, e os anticorpos heteroconjugados; um domínio variável simples (por exemplo, V_H, V_{HH}, V_L, anticorpo de domínio (dAb[®])), fragmentos de anticorpo de ligação ao antígeno, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv ligado a dissulfeto, Fv de cadeia única, scFv ligado a dissulfeto, diacorpos, TANDABS[®], etc. e versões modificadas de qualquer um dos precedentes.

[0087] Os formatos de anticorpo alternativo incluem armações alternativas em que a uma ou mais CDRs da proteína de ligação ao antígeno podem ser arranjadas em uma armação ou esqueleto de proteína que não imunoglobulina adequada, tal como um aficorpo, uma estrutura de SpA, um domínio A da classe do receptor de LDL, um avímero ou um domínio EGF.

[0088] O termo “domínio” se refere a uma estrutura de proteína dobrada que retém sua estrutura terciária independente do resto da proteína.

Os domínios são geralmente responsáveis pelas propriedades funcionais discretas das proteínas e em muitos casos podem ser adicionados, removidos ou transferidos a outras proteínas sem a perda da função do restante da proteína e/ou do domínio.

[0089] O termo “domínio de variável única” se refere a um domínio de polipeptídeo dobrado compreendendo as sequências características dos domínios variáveis de anticorpo. Este, portanto, inclui os domínios variáveis completos de anticorpo, tais como V_H , V_{HH} e V_L e domínios variáveis de anticorpo modificados, por exemplo, em que um ou mais *loops* foram substituídos pelas sequências que não são características dos domínios variáveis de anticorpo, ou domínios variáveis de anticorpo que foram truncados ou compreendem extensões N- ou C-terminais, bem como fragmentos dobrados de domínios variáveis que retêm pelo menos a atividade e especificidade de ligação do domínio de comprimento total. Um domínio variável único é capaz de ligar um antígeno ou epítipo independentemente de uma região ou domínio diferente variável. Um “anticorpo de domínio” ou “dAb^(®)” pode ser considerado o mesmo que um “domínio variável único”. Um domínio variável único pode ser um domínio variável humano único, mas também inclui vários domínios únicos de outras espécies tais como dAbs^(®) de roedores, tubarão lixa e V_{HH} de Camelídeo. V_{HH} de camelídeos são polipeptídeos de domínio de imunoglobulina variável únicos que são derivados de espécies incluindo camelo, lhama, alpaca, dromedário, e guanaco, que produzem anticorpos de cadeia pesada naturalmente destituídos de cadeias leves. Tais domínios de V_{HH} podem ser humanizados de acordo com as técnicas padrão disponíveis na técnica, e tais domínios são considerados ser “domínios variáveis únicos”. Como aqui usado, o V_H inclui os domínios de V_{HH} de camelídeos.

[0090] Um fragmento de ligação ao antígeno pode ser fornecido por intermédio de um arranjo de uma ou mais CDRs nas estruturas

proteicas que não anticorpo. “Estrutura Proteica” como aqui usado inclui mas não é limitado a uma estrutura de imunoglobulina (Ig), por exemplo, uma estrutura de IgG, que pode ser um anticorpo de quatro cadeias ou duas cadeias, ou que pode compreender apenas a região de Fc de um anticorpo, ou que pode compreender uma ou mais regiões constantes de um anticorpo, cujas regiões constantes podem ser de origem humana ou primata, ou que pode ser uma quimera artificial das regiões constantes humanas e primatas.

[0091] A estrutura proteica pode ser uma estrutura de Ig, por exemplo, uma estrutura de IgG, ou IgA. A estrutura de IgG pode compreender alguns ou todos os domínios de um anticorpo (isto é, CH1, CH2, CH3, V_H, V_L). A proteína de ligação ao antígeno pode compreender uma estrutura de IgG selecionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou IgG4PE. Por exemplo, a estrutura pode ser IgG1. A estrutura pode consistir em, ou compreender, a região Fc de um anticorpo, ou é uma parte deste.

[0092] A afinidade é a força de ligação de uma molécula, por exemplo, uma proteína de ligação ao antígeno da invenção, a uma outra, por exemplo seu antígeno alvo, em um local de ligação único. A afinidade de ligação de uma proteína de ligação ao antígeno ao seu alvo pode ser determinada através dos métodos de equilíbrio (por exemplo, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) ou radioimunoensaio (RIA)), ou cinéticas (por exemplo, análise BIACORE®). Por exemplo, os métodos BIACORE® descritos no Exemplo 5 podem ser usados para medir a afinidade de ligação.

[0093] A avidéz é a soma total da força de ligação de duas moléculas uma a outra em múltiplos locais, por exemplo, levando em consideração a valência da interação.

[0094] Por “isolado” é intencionado significar que a molécula, tal como uma proteína de ligação ao antígeno ou ácido nucléico, seja removida do ambiente no qual este pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, a

molécula pode ser purificada a r das substâncias com as quais normalmente existiria na natureza. Por exemplo, a massa da molécula em uma amostra pode ser 95% da massa total.

[0095] O termo “vetor de expressão” como aqui usado significa um ácido nucléico isolado que pode ser usado para introduzir um ácido nucléico de interesse em uma célula, tal como uma célula eucariótica ou célula procariótica, ou um sistema de expressão livre de célula onde a sequência de ácido nucléico de interesse é expressada como uma cadeia de peptídeos tal como uma proteína. Tais vetores de expressão podem ser, por exemplo, cosmídeos, plasmídeos, sequências virais, transpósons, e ácido nucléicos lineares compreendendo um ácido nucléico de interesse. Uma vez que o vetor de expressão é introduzido em uma célula ou sistema de expressão livre de célula (por exemplo, reticulócito lisado) a proteína codificada pelo ácido nucléico de interesse é produzida pela maquinaria de transcrição/tradução. Os vetores de expressão dentro do escopo da divulgação podem prover os elementos necessários para a expressão eucariótica ou procariótica e incluem os vetores conduzidos por promotores virais, tais como os vetores conduzidos pelos promotores de CMV, por exemplo, pcDNA3,1, pCEP4, e seus derivados, vetores de expressão de *Baculovirus*, vetores de expressão de *Drosophila*, e vetores de expressão que são conduzidos pelos promotores do gene mamífero, tal como promotores do gene Ig humano. Outros exemplos incluem os vetores de expressão procarióticos, tais como os vetores conduzidos pelo promotor T7, por exemplo, pET41, vetores conduzidos pelo promotor de lactose e vetores conduzidos pelo promotor do gene de arabinose. Aqueles de habilidade comum na técnica reconhecerão muitos outros vetores de expressão e sistemas de expressão adequados.

[0096] O termo “célula hospedeira recombinante” como aqui usado significa uma célula que compreende uma sequência de ácido nucléico de

interesse que foi isolada antes da sua introdução na célula. Por exemplo, a sequência de ácido nucléico de interesse pode ser em um vetor de expressão enquanto a célula pode ser procariótica ou eucariótica. As células eucarióticas exemplares são células mamíferas, tais como, mas não limitadas a, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, 653, SP2/0, NS0, 293, HeLa, mieloma, células de linfoma ou qualquer derivado destas. Mais preferivelmente, a célula eucariótica é uma célula HEK293, NS0, SP2/0, ou CHO. *E. coli* é uma célula procariótica exemplar. Uma célula recombinante de acordo com a divulgação pode ser gerada através da transfeção, fusão celular, imortalização, ou outros procedimentos bem conhecidos na técnica. Uma sequência de ácido nucléico de interesse, tal como um vetor de expressão, transfectada em uma célula pode ser extracromossômica ou estavelmente integrada no cromossomo da célula.

[0097] Um “anticorpo quimérico” se refere a um tipo de anticorpo engeirado que contém uma região variável de ocorrência natural (cadeia leve e cadeias pesadas) derivada de um anticorpo doador em associação com luz e regiões de cadeia pesada constantes derivadas de um anticorpo aceitador.

[0098] UM “anticorpo humanizado” se refere a um tipo de anticorpo engeirado tendo suas CDRs derivadas de uma imunoglobulina de doador não humano, as partes derivadas de imunoglobulina restantes da molécula sendo derivadas de uma ou mais human imunoglobulina(s). Além disso, os resíduos que suportam a estrutura podem ser alterados para preservar a afinidade de ligação (ver, por exemplo, Queen *et al.* Proc. Natl Acad Sci EUA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, *et al.*, *Bio/Technology*, 9:421 (1991)). Um anticorpo aceitador humano adequado pode ser aquele selecionado de um banco de dados convencional, por exemplo, o banco de dados KABAT®, banco de dados Los Alamos, e banco de dados Swiss Protein, através da homologia para o nucleotídeo e sequência de

aminoácidos do anticorpo doador. Um anticorpo humano distinguido por uma homologia das regiões estruturais do anticorpo doador (em uma base de aminoácido) pode ser adequado para fornecer uma região constante de cadeia pesada e/ou uma região de estrutura variável de cadeia pesada para a inserção das CDRs doadoras. Um anticorpo aceitador adequado capaz de doar a constante de cadeia leve ou regiões de estrutura variável pode ser selecionado de uma maneira similar. Deve ser notado que as cadeias pesadas e leves de anticorpo aceitador não são requeridas para originar do mesmo anticorpo aceitador. A técnica anterior descreve as vias de produzir tais anticorpos humanizados - ver, por exemplo, EP-A-0239400 e EP-A-054951.

[0099] O termo “anticorpos completamente humanos” inclui os anticorpos tendo regiões variáveis e constantes (se presentes) derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinal humana. Os anticorpos da sequência humana da invenção podem incluir os resíduos de aminoácido não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas pela mutagênese aleatória ou específica de local *in vitro* ou através da mutação somática *in vivo*). Os anticorpos completamente humanos compreendem a sequência de aminoácidos codificada somente pelos polinucleotídeos que são basicamente de origem humana ou a sequência de aminoácidos que é idêntica a tais sequências. Como aqui intencionado significar, os anticorpos codificados pelo DNA que codifica a imunoglobulina humana inseridos em um genoma de camundongo produzido em um camundongo transgênico são anticorpos completamente humanos visto que são codificados pelo DNA que é basicamente de origem humana. Nesta situação, o DNA que codifica a imunoglobulina humana pode ser rearranjado (para codificar um anticorpo) dentro do camundongo, e as mutações somáticas também podem ocorrer. Os anticorpos codificados pelo DNA originalmente humano que

foram submetidos às mudanças em um camundongo são anticorpos completamente humanos como aqui intencionado significar. O uso de tal camundongos transgênicos torna possível selecionar anticorpos completamente humanos contra um antígeno humano. Como é entendido na técnica, os anticorpos completamente humanos podem ser feitos usando a tecnologia de visualização de fago em que uma biblioteca de DNA humano é inserida no fago para a geração de anticorpos compreendendo sequência de DNA de linha germinal humana.

[00100] O termo “anticorpo doador” se refere a um anticorpo que contribui para a sequência de aminoácidos de suas regiões variáveis, CDRs, ou outros fragmentos funcionais ou análogos destes para um primeiro parceiro de imunoglobina. O doador, portanto, provê a região de codificação de imunoglobina alterada e o anticorpo alterado expressado resultante com a especificidade antigênica e característica de atividade neutralizante do anticorpo doador.

[00101] O termo “anticorpo aceitador” se refere a um anticorpo que é heterólogo ao anticorpo doador, que contribui com toda (ou qualquer porção) da sequência de aminoácidos codificando suas regiões de estrutura de cadeia pesada ou leve e/ou suas regiões constantes de cadeia pesada e/ou leve ao primeiro parceiro de imunoglobulina. Um anticorpo humano pode ser o anticorpo aceitador.

[00102] Os termos “V_H” e “V_L” são aqui usados para se referir à cadeia pesada de região variável e região variável de cadeia leve respectivamente de uma proteína de ligação ao antígeno.

[00103] As “CDRs” são definidas como a sequência de aminoácidos da região que determina a complementariedade de uma proteína de ligação ao antígeno. Estas são as regiões hipervariáveis das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina. Existem três CDRs de cadeia pesada e três regiões de cadeia leve (ou regiões de CDR) na porção variável de uma

imunoglobulina. Deste modo, as “CDRs” como aqui usadas se referem a todas as três cadeias de CDRs pesadas, todas as três CDRs de cadeia leve, todas as CDRs de cadeias leves ou pesadas, ou pelo menos duas CDRs.

[00104] Por todo esse relatório descritivo, os resíduos de aminoácido nas sequências de domínio variável e sequências de anticorpo de comprimento total são numerados de acordo com a convenção de numeração de Kabat. De maneira similar, os termos “CDR”, “CDRL1”, “CDRL2”, “CDRL3”, “CDRH1”, “CDRH2”, “CDRH3” usados nos Exemplos seguem a convenção de numeração de Kabat. Para mais informação, ver, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1991).

[00105] Será evidente para aqueles habilitados na técnica que existem convenções para numeração alternativas para os resíduos de aminoácidos nas sequências de domínio variável e sequências de anticorpo de comprimento total. Também existem convenções de numeração alternativas para as sequências de CDR, por exemplo, aquelas apresentadas em Chothia *et al.* (1989) Nature 342: 877-883. A estrutura e dobra da proteína do anticorpo pode significar que outros resíduos são considerados parte da sequência de CDR e seriam assim entendidos por uma pessoa habilitada na técnica.

[00106] Outras convenções de numeração convencionais para as sequências de CDR disponíveis para um técnico habilitado incluem os métodos “AbM” (University of Bath) e “contato” (University College London). A região de sobreposição mínima usando pelo menos dois dos métodos de Kabat, Chothia, AbM e pode ser determinada para fornecer a “unidade de ligação mínima”. A unidade de ligação mínima pode ser uma sub-porção de um CDR.

[00107] “Identidade em por cento” entre uma sequência de ácido

nucléico analisada e uma sequência de ácido nucléico de um paciente é o valor de “Identidades”, expressado como uma porcentagem, que é calculada pelo algoritmo BLASTN quando uma sequência de ácido nucléico de um paciente tem uma cobertura analisada de 100% com uma sequência de ácido nucléico analisada depois de um alinhamento BLASTN aos pares ser realizado. Tais alinhamentos BLASTN aos pares entre uma de ácido nucléico analisada e uma sequência de ácido nucléico do paciente são realizados usando-se os ajustes padrão do algoritmo BLASTN disponível no site da internet do National Center for Biotechnology Institute com o filtro para regiões de baixa complexidade desligado.

[00108] A “identidade em por cento” entre uma sequência de aminoácidos examinada e uma sequência de aminoácidos de um sujeito é o valor das “identidades”, expressado como uma porcentagem, que é calculada pelo algoritmo BLASTP quando uma sequência de aminoácidos de um sujeito tem 100% de cobertura analisada com uma sequência de aminoácidos examinada depois de um alinhamento de BLASTP aos pares ser realizado. Tais alinhamentos BLASTP aos pares entre uma sequência de aminoácidos examinada e uma sequência de aminoácidos de um sujeito são realizadas usando-se os ajustes padrão do algoritmo BLASTP disponível no site da internet do National Center for Biotechnology Institute com o filtro para as regiões de baixa complexidade desligado.

[00109] A sequência examinada pode ser 100% idêntica à sequência do sujeito, ou pode incluir até um certo número integral de aminoácido ou alterações de nucleotídeo se comparado à sequência do sujeito tal que a identidade em% seja de menos do que 100%. Por exemplo, a sequência analisada é pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, ou 99% idêntica à sequência do sujeito. Tais alterações incluem pelo menos uma exclusão, substituição (incluindo a substituição conservativa e não conservativa), ou inserção de aminoácido, e em as ditas alterações podem

ocorrer nas posições de terminal amino- ou carbóxi- da sequência analisada ou em qualquer lugar entre aquelas posições terminais, intercaladas individualmente entre os aminoácidos ou nucleotídeos na sequência analisada ou em um ou mais grupos contíguos dentro da sequência analisada.

[00110] A identidade em % pode ser determinada através do comprimento inteiro da sequência analisada, incluindo a(s) CDR(s). Alternativamente, a identidade em % pode excluir a(s) CDR(s), por exemplo, a(s) CDR(s) é 100% idêntica à sequência do sujeito e a variação da identidade em % está na porção restante da sequência analisada, de modo que a sequência de CDR é fixa/intacta.

[00111] Em um aspecto, os métodos para tratar o câncer em um paciente em necessidade, compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao ICOS humano e uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano o sequencialmente são providos. Em uma modalidade, a administração do agente direcionado ao ICOS humano é seguida pela administração do agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano. Em uma modalidade, o agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano é administrado concomitantemente com um agente direcionado ao ICOS humano na fase após a administração do agente direcionado ao human ICOS.

[00112] Em outro aspecto, a administração do agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano é seguido pela administração do agente direcionado ao ICOS humano. Em uma modalidade, o agente direcionado ao ICOS humano é um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste. Em uma modalidade, o agente direcionado ao ICOS humano é administrado concomitantemente com um agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano na fase após a administração do agente

direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano.

[00113] Em um aspecto, um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste e um anticorpos anti-PD1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste para o uso sequencial no tratamento do câncer em um ser humano em necessidade destes são fornecidos. Em uma modalidade, a administração dos anticorpos anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração dos anticorpos anti-PD1 ou fragmento de ligação ao antígeno destes. Em uma outra modalidade, a administração dos anticorpos anti-PD1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração dos anticorpos anti-ICOS ou fragmentos de ligação ao antígeno deste.

[00114] Em um aspecto, um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste e um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste para o uso sequencial no tratamento do câncer em um ser humano em necessidade destes são fornecidos. Em uma modalidade, a administração dos anticorpos anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração do anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Em uma outra modalidade, a administração do anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração dos anticorpos anti-ICOS ou fragmentos de ligação ao antígeno destes.

[00115] Em um outro aspecto, o uso de anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno destes e um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer é provido, em que os anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno destes e um anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste são sequencialmente administrados, e em que a administração dos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno destes é seguida pela administração dos anticorpos anti-PD1 ou porção de

ligação ao antígeno deste.

[00116] Em um outro aspecto, o uso de um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste e um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste na fabricação de um medicamento para o tratamento do câncer é fornecido, em que os anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno destes e um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste são sequencialmente administrados, e em que a administração dos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno destes é seguida pela administração do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00117] A presente invenção também provê polinucleotídeos que codificam os anticorpos anti-ICOS, anticorpos anti-PD1, anticorpos anti-PDL1, ou porção de ligação ao antígeno de qualquer um dos ditos anticorpos, da presente invenção. Em uma modalidade, as células hospedeiras são providas compreendendo os polinucleotídeos codificando os anticorpos anti-ICOS, anticorpos anti-PD1, ou anticorpos anti-PDL1, ou porção de ligação aos antígenos de qualquer um dos ditos anticorpos, da presente invenção. A presente invenção também provê métodos para fabricar um anticorpos anti-ICOS, anticorpos anti-PD1, anticorpo anti-PDL1, ou uma porção de ligação ao antígeno do dito anticorpo, compreendendo as etapas de a) cultivando a célula hospedeira compreendendo um polinucleotídeo codificando um anticorpos anti-ICOS, anticorpos anti-PD1, ou anticorpo anti-PDL1 ou uma porção de ligação ao antígeno do dito anticorpo da presente invenção sob condições adequadas para expressar os ditos anticorpos anti-ICOS, anticorpos anti-PD1, ou anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno do dito anticorpo; e b) isolar o dito anticorpo anti-ICOS, anti-PD1, ou anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno do dito anticorpo.

[00118] Em um outro aspecto, um polinucleotídeo codificando um

anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, em que os anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste são sequencialmente administrados a um paciente com câncer com um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste, e em que a administração dos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração dos anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00119] Em um outro aspecto, um polinucleotídeo codificando um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, em que os anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste são sequencialmente administrados a um paciente com câncer com um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste, e em que administração dos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00120] Ainda em um outro aspecto, um polinucleotídeo codificando anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, em que os anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste são sequencialmente administrados a um paciente com câncer com anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste, e em que administração dos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste é seguida pela administração dos anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00121] Ainda em outro aspecto, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, em que o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste é sequencialmente administrado a um paciente com câncer com um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste, e em que a administração dos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno

deste é seguida pela administração do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00122] Em um outro aspecto, um vetor compreendendo o polinucleotídeo de qualquer um dos aspectos aqui contidos é aqui fornecido. Em um outro aspecto, uma célula hospedeira compreendendo o vetor de qualquer um dos aspectos aqui contidos é provida.

[00123] Ainda em um outro aspecto, um Método para fabricar um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, o método compreendendo a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo de qualquer um dos aspectos aqui contidos sob condições adequadas para expressar os anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste; e b) isolar os ditos anticorpos anti-ICOS ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00124] Em um outro aspecto, um Método para fabricar um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, o método compreendendo a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo de qualquer um dos aspectos aqui contidos sob condições adequadas para expressar os anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste; e b) isolar os ditos anticorpos anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00125] Ainda em outro aspecto, um Método para fabricar um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste é provido, o método compreendendo a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo de qualquer um dos aspectos aqui contidos sob condições adequadas para expressar o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste; e b) isolar o dito anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação ao antígeno deste.

[00126] Em uma modalidade de qualquer um dos aspectos aqui contidos, os anticorpos anti-ICOS são um agonista de ICOS. Em uma

modalidade, os anticorpos anti-ICOS compreendem um domínio V_H compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:7; e um domínio V_L compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO:8. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-ICOS compreendem um domínio V_H compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:7 e um domínio V_L compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO:8. Em uma modalidade, os anticorpos anti-ICOS compreendem um ou mais de: CDRH1 como apresentada na SEQ ID NO:1; CDRH2 como apresentada na SEQ ID NO:2; CDRH3 como apresentada na SEQ ID NO:3; CDRL1 como apresentada na SEQ ID NO:4; CDRL2 como apresentada na SEQ ID NO:5 e/ou CDRL3 como apresentada na SEQ ID NO:6 ou um equivalente direto de cada CDR em que um equivalente direto não tem mais do que duas substituições de aminoácido na dita CDR.

[00127] Em uma modalidade de qualquer um dos aspectos aqui contidos, o agente direcionado ao PD1 humano é um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação ao antígeno deste. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD1 é um antagonista de PD1. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD1 é pembrolizumab. Em uma outra modalidade, o anticorpo anti-PD1 é nivolumab. Em uma modalidade de qualquer um dos aspectos aqui contidos, o agente direcionado ao human PD-L1 é um anticorpo anti-PD-L1 ou porção de ligação ao antígeno deste. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 é um antagonista de PD1. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-L1 é durvalumab.

[00128] Em uma modalidade de qualquer um dos aspectos aqui contidos, o agente direcionado ao ICOS humano é administrado 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,

27, 28, 29, ou 30 dias consecutivos. Em uma modalidade de qualquer um dos aspectos aqui contidos, o agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano é administrado por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 dias consecutivos.

[00129] Em um aspecto, o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal (CRC), gástrico, esofágico, cervical, bexiga, mama, cabeça e pescoço, ovariano, melanoma, carcinoma de célula renal (RCC), EC de célula escamosa, carcinoma pulmonar de célula não pequena, mesotelioma, pancreático, e câncer de próstata.

[00130] Em um aspecto, a presente invenção provê um método para tratar câncer em um ser humano em necessidade deste, o método compreendendo administrar ao dito humano um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou administrar ao dito humano um anticorpo anti-PD1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Em uma modalidade, os anticorpos anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste induz a proliferação, expansão, e infiltração tumoral da célula T. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-ICOS ou fragmentos de ligação ao antígeno destes aumenta a expressão de PD-1 em uma célula T. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste aumenta a expressão de ICOS em uma célula T. Em uma modalidade, os anticorpos anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste é um isótipo de IgG4 e reduz a depleção das células T positivas para ICOS. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-ICOS ou fragmento de ligação ao antígeno deste é um isótipo de IgG4 e resultaram em uma eficácia anti-câncer aumentada se comparada a um anticorpo de isótipo IgG1 anti-ICOS.

[00131] Em uma outra modalidade o câncer é selecionada de cabeça e câncer de pescoço, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer ovariano, câncer de próstata, gliomas, glioblastoma, astrocitomas,

glioblastoma multiforme, síndrome de Bannayan-Zonana, doença de Cowden, doença de Lhermitte-Duclos, câncer de mama inflamatório, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, Rbdomiossarcoma, ependimoma, meduloblastoma, câncer renal, câncer do fígado, melanoma, câncer pancreático, sarcoma, osteosarcoma, tumor de célula gigante dos ossos, câncer de tireoide, leucemia linfoblástico da célula T, leucemia mielógena crônica, Leucemia linfocítica crônica, leucemia da célula de Hairy, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, AML, Leucemia neutrofílica crônica, Leucemia da célula T linfoblástica aguda, plasmacitoma, Leucemia da célula grande imunoblástica, leucemia da célula de Manto, leucemia megacarioblástica de mieloma múltiplo, mieloma múltiplo, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, Eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de hodgkins, linfoma que não de hodgkins, linfoma da célula T linfoblástica, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, neuroblastoma, câncer de bexiga, câncer urotelial, câncer de vulva, câncer cervical, câncer endometrial, câncer renal, mesotelioma, câncer esofágico, câncer da glândula salivar, câncer hepatocelular, câncer gástrico, câncer nasofaríngeo, câncer bucal, câncer da boca, GIST (tumor estromal gastrointestinal), e câncer testicular.

[00132] Algumas modalidades da presente invenção também compreendem administrar pelo menos um agente neo-plástico e/ou pelo menos um agente imunoestimulador ao dito ser humano.

[00133] Em um aspecto, o ser humano tem um tumor sólido. Em um aspecto, o tumor é selecionado de câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, melanoma, carcinoma da célula renal (RCC), câncer esofágico, carcinoma pulmonar de célula não pequena, câncer de próstata, câncer colorretal, câncer ovariano e câncer pancreático. Em um outro aspecto o ser humano tem um tumor líquido tal como linfoma da célula B grande difusa (DLBCL), mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica crônica (CLL),

linfoma folicular, leucemia mielóide aguda e leucemia mielógena crônica.

[00134] A presente divulgação também diz respeito a um método para tratar ou diminuir a gravidade de um câncer selecionado de: cérebro (gliomas), glioblastomas, síndrome de Bannayan-Zonana, doença de Cowden, doença de Lhermitte-Duclos, câncer de mama, de mama infamatório, tumor de Wilm, sarcoma de Ewing, Rabdomyosarcoma, ependimoma, meduloblastoma, cólon, cabeça e pescoço, rim, pulmão, fígado, melanoma, ovariano, pancreático, próstata, sarcoma, osteosarcoma, tumor de célula gigante dos ossos, tireoide, leucemia linfoblástica da célula T, leucemia mielógena crônica, leucemia linfocítica crônica, leucemia da célula de Hairy, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia neutrofílica crônica, leucemia linfoblástica aguda da célula T, plasmacitoma, leucemia da célula grande imunoblástica, leucemia da célula de Manto, leucemia megacarioblástica múltipla, mieloma múltiplo, leucemia megacariocítica aguda, leucemia promielocítica, eritroleucemia, linfoma maligno, linfoma de Hodgkins, linfoma que não de Hodgkins, linfoma linfoblástico da célula T, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, neuroblastoma, câncer de bexiga, câncer urotelial, câncer de pulmão, câncer de vulva, câncer cervical, câncer endometrial, câncer renal, mesotelioma, câncer esofágico, câncer da glândula salivar, câncer hepatocelular, câncer gástrico, câncer nasofaríngeo, câncer bucal, câncer da boca, GIST (tumor estromal gastrointestinal) e câncer testicular.

[00135] Pelo termo “tratar” e variações gramaticais destes como aqui usado, é intencionado significar uma terapia terapêutica. Em referência a uma condição particular, tratar significa: (1) melhorar a condição ou uma ou mais das manifestações biológicas da condição, (2) interferir com (a) um ou mais pontos da cascata biológica que leva a ou é responsável pela condição ou (b) uma ou mais das manifestações biológicas da condição, (3) para aliviar um ou mais dos sintomas, efeitos

ou efeitos colaterais associados com a condição ou tratamento deste, ou (4) diminuir a progressão da condição ou uma ou mais das manifestações biológicas da condição. A terapia profilática usando os métodos e/ou composições da invenção também é considerada. O técnico habilitado apreciará que “prevenção” não é um termo absoluto. Na medicina, “prevenção” é entendido se referir à administração profilática de um fármaco para diminuir substancialmente a probabilidade ou severidade de uma condição ou manifestação biológica desta, ou para atrasar o início de tal condição ou manifestação biológica desta. A terapia profilática é apropriada, por exemplo, quando um paciente é considerado em alto risco de desenvolver câncer, tal como quando um paciente tem um forte histórico de câncer na família ou quando um paciente foi exposto a um carcinogênico.

[00136] Como aqui usado, os termos “câncer,” “neoplasma,” e “tumor” são usados permutavelmente e, na forma singular ou plural, se refere às células que foram submetidas a uma transformação maligna que as torna patológicas ao organismo hospedeiro. As células de câncer primárias podem ser prontamente distintas das células não cancerosas através de técnicas bem estabelecidas, particularmente, o exame histológico. A definição de uma célula cancerosa, como aqui usada, não inclui apenas uma célula de câncer primário, mas qualquer célula derivada de um predecessor da célula cancerosa. Isto inclui as células cancerosas espalhadas por metástase, e culturas e linhagens celulares *in vitro* derivadas das células cancerosas. Quando se referindo a um tipo de câncer que normalmente se manifesta como um tumor sólido, um tumor “cl clinicamente detectável” é aquele que é detectável com base na massa tumoral; por exemplo, através de procedimentos de Raio X tais como varredura de tomografia computadorizada (CT), imageamento de ressonância magnética (MRI), raio X, ultrassom ou palpação no exame físico, e/ou que é

detectável por causa da expressão de um ou mais antígenos específicos do câncer em uma amostra obtível de um paciente. Os tumores podem ser um câncer hematopoiético (ou hematológico ou relacionado ao sangue), por exemplo, cânceres derivados das células sanguíneas ou células imunes, que podem ser indicadas como “tumores líquidos.” Os exemplos específicos das condições clínicas com base nos tumores hematológicos incluem leucemias tais como leucemia mielocítica crônica, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica aguda; malignidades da célula plasmática, tais como mieloma múltiplo, MGUS e macroglobulinemia de Waldenstrom; linfomas tais como linfoma de que não de Hodgkin, linfoma de Hodgkin; e outros.

[00137] O câncer pode ser qualquer câncer em que um número anormal de células blásticas ou proliferação celular indesejada esteja presente ou que seja diagnosticado como um câncer hematológico, incluindo malignidades tanto linfóides quanto mielóides. As malignidades mielóides incluem, mas não são limitadas a leucemia mielóide aguda (ou mielocítica ou mielogenógena ou mieloblástica) (não diferenciada ou diferenciada), leucemia promielóide aguda (ou promielocítica ou promielógena ou promieloblástica), leucemia mielomonocítica aguda (ou mielomonoblástica), leucemia monocítica aguda (ou monoblástica), eritroleucemia e leucemia megacariocítica (ou megacarioblástica). Estas leucemias podem ser indicadas juntas como leucemia mielóide aguda (ou mielocítica ou mielógena) (AML). As malignidades mielóides também incluem distúrbios mieloproliferativos (MPD) que incluem, mas não são limitados a leucemia mielógena crônica (ou mielóide) (CML), leucemia mielomonocítica crônica (CMML), trombocitemia essencial (ou trombocitose), e policitemia vera (PCV). Malignidades mielóides também incluem mielodisplasia (ou síndrome mielodisplástica ou MDS), que pode ser indicada como anemia refratária (RA), anemia refratária com blastos

em excesso (RAEB), e anemia refratária com blastos em excesso na transformação (RAEBT); bem como mielofibrose (MFS) com ou sem metaplasia angiogênica mielóide.

[00138] Os cânceres hematopoiéticos também incluem malignidades linfoides, que podem afetar os linfonodos, baços, medula óssea, sangue periférico, e/ou sítios extranodais. Os cânceres linfoides incluem as malignidades da célula B, que incluem, mas não são limitados a linfomas que não de Hodgkin da célula B (B-NHLs). Os B-NHLs podem ser indolentes (ou de grau baixo), grau intermediário (ou agressivo) ou de alto grau (muito agressivo). Os linfomas da célula B indolentes incluem linfoma folicular (FL); linfoma linfocítico pequeno (SL); linfoma de zona marginal (MZL) incluindo MZL nodal, MZL extranodal, MZL esplênico e MZL esplênico com linfócitos vilosos; linfoma linfoplasmacítico (LPL); e tecido linfóide associado com linfoma da mucosa (MALT ou zona marginal extranodal). Os B-NHLs de grau intermediário incluem linfoma da célula de manto (MCL) com ou sem envolvimento leucêmico, linfoma celular grande difuso (DLBCL), linfoma da célula folicular grande (ou grau 3 ou grau 3B) linfoma, e linfoma mediastinal primário (PML). B-NHLs de alto grau incluem linfoma de Burkitt (BL), linfoma semelhante ao de Burkitt, linfoma da célula pequena não clivada (SNCCCL) e linfoma linfoblástico. Outros B-NHLs incluem linfoma imunoblástico (ou imunocitoma), linfoma de efusão primária, linfomas associados com HIV (ou relacionados com a AIDS), e distúrbio ou linfoma linfoproliferativos pós-transplante (PTLD). As malignidades da célula B também incluem, mas não são limitadas à, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), leucemia da célula peludas (HCL), leucemia do linfócito granular grande (LGL), leucemia linfóide aguda (ou linfocítica ou linfoblástica), e doença de Castleman. A NHL também pode incluir os linfomas da célula T que não de Hodgkin (T-

NHLs), que incluem, mas não são limitados ao linfoma da célula T que não de Hodgkin de outro modo não especificado (NOS), linfoma da célula T periférica (PTCL), linfoma da célula grande anaplástica (ALCL), distúrbio linfoide angioimunoblástico (AILD), célula exterminadora natural nasal (NK)/linfoma da célula T, linfoma gama/delta, linfoma cutâneo da célula T, micoses fungóides, e síndrome de Sezary.

[00139] Os cânceres hematopoiéticos também incluem linfoma (ou doença) de Hodgkin incluindo linfoma de Hodgkin clássico, linfoma nodular de Hodgkin esclerosante, linfoma de Hodgkin de celularidade misturada, linfoma de Hodgkin predominante em linfócito (LP), linfoma de Hodgkin LP nodular, e linfoma de Hodgkin exaurido em linfócito. Os cânceres hematopoiéticos também incluem doenças ou cânceres da célula plasmática tais como mieloma múltiplo (MM) incluindo MM latente, gamopatia monoclonal de significância indeterminada (ou desconhecida ou incerta) (MGUS), plasmacitoma (ósseo, extramedular), linfoma linfoplasmacítico (LPL), Macroglobulinemia de Waldenström, leucemia da célula plasmática, e amidólise primária (AL). Os cânceres hematopoiéticos também podem incluir outros cânceres de células hematopoiéticas adicionais, incluindo leucócitos polimorfonucleares (ou neutrófilos), basófilos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas, eritrócitos e células exterminadoras naturais. Os tecidos que incluem as células hematopoiéticas aqui indicadas como “tecidos da célula hematopoiética” incluem medula óssea; sangue periférico; timo; e tecidos linfoides periféricos, tais como baço, linfonodos, tecidos linfoides associados com a mucosa (tais como os tecidos linfoides associados com os intestinos), amídalas, placas de Peyer e apêndice, e tecidos linfoides associados com outra mucosa, por exemplo, os revestimentos dos brônquios.

[00140] Como aqui usado o termo “Composto A²” significa um agente direcionado ao ICOS humano. Em algumas modalidades, o

Composto A² é um anticorpo ao ICOS humano ou a porção de ligação ao antígeno deste. Em algumas modalidades, o Composto A² é um agonista de ICOS. Adequadamente, o Composto A² significa um anticorpo monoclonal humanizado tendo uma cadeia pesada de região variável como apresentado na SEQ ID NO:7 e uma região variável de cadeia leve como apresentado na SEQ ID NO:8.

[00141] Como aqui usado o termo “Composto B²” significa um agente direcionado ao PD1 humano ou um agente para direcionar ao PD-L1 humano. Em algumas modalidades, o Composto B² é um antagonista de PD1. Em algumas modalidades, o Composto B² é um anticorpo para PD1 humano ou a porção de ligação ao antígeno deste. Em algumas modalidades, o Composto B² é um anticorpo para o PD-L1 humano ou a porção de ligação ao antígeno deste. Adequadamente, o Composto B² é nivolumab. Adequadamente, o Composto B² é pembrolizumab.

[00142] Adequadamente, as combinações desta invenção são administradas dentro de um “período especificado”.

[00143] O termo “período especificado” e variações gramaticais destes, como aqui usado, significa o intervalo de tempo entre a administração de um do Composto A² e Composto B² e o outro de Composto A² e Composto B².

[00144] Adequadamente, se os compostos são administrados dentro de um “período especificado” e não simultaneamente administrados, estes são ambos administrados dentro de cerca de 24 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 24 horas; adequadamente, estes serão ambos administrados dentro de cerca de 12 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 12 horas; adequadamente, estes serão ambos administrados dentro cerca de 11 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 11 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 10 horas

um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 10 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 9 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 9 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 8 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 8 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 7 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 7 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 6 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 6 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 5 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 5 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 4 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 4 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 3 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 3 horas; adequadamente estes serão administrados dentro de cerca de 2 horas um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 2 horas; adequadamente estes serão ambos administrados dentro cerca de 1 hora um do outro – neste caso, o período especificado será de cerca de 1 hora. Como aqui usado, a administração do Composto A² e Composto B² em uma distância de menos do que cerca de 45 minutos é considerada administração simultânea.

[00145] Adequadamente, quando a combinação da invenção é administrada por um “período especificado”, os compostos serão coadministrados por uma “duração de tempo”.

[00146] O termo “duração de tempo” e variações gramaticais deste, como aqui usado significa que ambos os compostos da invenção são administrados por um número indicado de dias consecutivos. A menos que de outro modo definido, o número de dias consecutivos não deve começar

com o início do tratamento ou terminado com o fim do tratamento, somente é necessário que o número de dias consecutivos ocorra em algum ponto durante o decorrer do tratamento.

[00147] Com relação à administração de “período especificado”:

[00148] Adequadamente, ambos os compostos serão administrados dentro de um período especificado por pelo menos um dia – neste caso, a duração de tempo será de pelo menos um dia; adequadamente, durante o decorrer do tratamento, ambos os compostos serão administrados dentro de um período especificado por pelo menos 3 dias consecutivos – neste caso, a duração do tempo será de pelo menos 3 dias; adequadamente, durante o decorrer do tratamento, ambos os compostos serão administrados dentro de um período especificado por pelo menos 5 dias consecutivos – neste caso, a duração do tempo será de pelo menos 5 dias; adequadamente, durante o decorrer do tratamento, ambos os compostos serão administrados dentro de um período especificado por pelo menos 7 dias consecutivos– neste caso, a duração do tempo será de pelo menos 7 dias; adequadamente, durante o decorrer do tratamento, ambos os compostos serão administrados dentro de um período especificado por pelo menos 14 dias consecutivos – neste caso, a duração do tempo será de pelo menos 14 dias; adequadamente, durante o decorrer do tratamento, ambos os compostos serão administrados dentro de um período especificado por pelo menos 30 dias consecutivos – neste caso, a duração do tempo será de pelo menos 30 dias.

[00149] Adequadamente, se os compostos não são administrados durante um “período especificado”, estes são sequencialmente administrados. Pelo termo “administração sequencial”, e derivados gramaticais deste, como aqui usado é intencionado que um de Composto A² e Composto B² seja administrado por dois ou mais dias consecutivos e o outro de Composto A² e Composto B² seja subsequentemente administrado por dois ou mais dias consecutivos. Durante o período de dias consecutivos

em que o Composto A² é administrado, pelo menos 1 dose, pelo menos 2 doses, pelo menos 3 doses, pelo menos 4 doses, pelo menos 5 doses, pelo menos 6 doses, pelo menos 7 doses, pelo menos 8 doses, pelo menos 9 doses, ou pelo menos 10 doses do Composto A² são administradas. Durante o período de dias consecutivos nos quais o Composto B² é administrado, pelo menos 1 dose, pelo menos 2 doses, pelo menos 3 doses, pelo menos 4 doses, pelo menos 5 doses, pelo menos 6 doses, pelo menos 7 doses, pelo menos 8 doses, pelo menos 9 doses, ou pelo menos 10 doses do Composto B² são administradas. Durante o período de dias consecutivos em que o Composto A² é administrado, o Composto A² pode ser administrado pelo menos três vezes em um dia, pelo menos duas vezes em um dia, pelo menos uma vez em um dia, ou menos do que uma vez em um dia, por exemplo, uma vez a cada 2 dias, uma vez a cada 3 dias, uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas, uma vez a cada 3 semanas, ou uma vez a cada 4 semanas. Durante o período de dias consecutivos em que o Composto B² é administrado, o Composto B² pode ser administrado pelo menos três vezes ao dia, pelo menos duas vezes ao dia, pelo menos uma vez ao dia, ou menos do que uma vez ao dia, por exemplo, uma vez a cada 2 dias, uma vez a cada 3 dias, uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas, uma vez a cada 3 semanas, ou uma vez a cada 4 semanas.

[00150] Além disso, é aqui considerado uma folga de fármaco utilizado entre a administração sequencial de um de Composto A² e Composto B² e o outro de Composto A² e Composto B². Como aqui usado, uma folga de fármaco é um período de dias depois da administração sequencial de um de Composto A² e Composto B² e antes da administração do outro de Composto A² e Composto B² onde nem o Composto A² nem o Composto B² é administrado. Adequadamente a folga de fármaco será um período de dias selecionado de: 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias e 14 dias.

[00151] A administração sequencial também pode incluir um de Composto A² e o Composto B² é administrado por dois ou mais dias consecutivos e depois tanto o Composto A² quanto o Composto B² são subsequentemente administrados por dois ou mais dias consecutivos. A administração sequencial pode incluir tanto o Composto A² quanto o Composto B² sendo administrado por dois ou mais dias consecutivos e depois um de Composto A² e Composto B² sendo subsequentemente administrado por dois ou mais dias consecutivos.

Com respeito à administração sequencial:

[00152] Adequadamente, um de Composto A² e Composto B² é administrado durante 1 a 30 dias consecutivos, seguido por uma folga opcional do fármaco, seguido pela administração do outro do Composto A² e Composto B² durante 1 a 30 dias consecutivos. Adequadamente, um de Composto A² e Composto B² é administrado durante 1 a 21 dias consecutivos, seguido por uma folga opcional do fármaco, seguido pela administração do outro do Composto A² e Composto B² durante 1 a 21 dias consecutivos. Adequadamente, um de Composto A² e Composto B² é administrado durante 1 a 14 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 1 a 14 dias, seguido pela administração do outro do Composto A² e Composto B² durante 1 a 14 dias consecutivos. Adequadamente, um de Composto A² e Composto B² é administrado durante 1 a 7 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 1 a 10 dias, seguido pela administração do outro do Composto A² e Composto B² durante 1 a 7 dias consecutivos.

[00153] Adequadamente, o Composto B² será administrado primeiro na sequência, seguido por uma folga opcional do fármaco, seguido pela administração de Composto A². Adequadamente, o Composto B² é administrado de 3 a 21 dias consecutivos, seguido por uma folga opcional do fármaco, seguido pela administração do Composto A² durante 3 a 21

dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 3 a 21 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 1 a 14 dias, seguido pela administração do Composto A² durante 3 a 21 dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 3 a 21 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 3 a 14 dias, seguido pela administração do Composto A² durante 3 a 21 dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 21 dias consecutivos, seguido por uma folga opcional do fármaco, seguido pela administração do Composto A² durante 14 dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 14 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 1 a 14 dias, seguido pela administração do Composto A² durante 14 dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 7 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 3 a 10 dias, seguido pela administração do Composto A² durante 7 dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 3 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 3 a 14 dias, seguido pela administração do Composto A² durante 7 dias consecutivos. Adequadamente, o Composto B² é administrado durante 3 dias consecutivos, seguido por uma folga de fármaco de 3 a 10 dias, seguido pela administração do Composto A² durante 3 dias consecutivos.

[00154] É entendido que uma administração em “período especificado” e uma administração “sequencial” podem ser seguidas pela repetição da dosagem ou podem ser seguidas por um protocolo de dosagem alternado e uma folga de fármaco pode preceder o protocolo de dosagem repetida ou de dosagem alternada.

[00155] Os métodos da presente invenção também podem ser utilizados com outros métodos terapêuticos de tratamento de câncer.

[00156] O Composto A² e Composto B² podem ser administrados

por qualquer via apropriada. As vias adequadas incluem oral, retal, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), intratumoralmente, vaginal e parenteral (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal e epidural). Será avaliado que a via preferida pode variar com, por exemplo, a condição do receptor da combinação e do câncer a ser tratado. Também será avaliado que cada um dos agentes administrados pode ser administrado pelas mesmas vias ou diferentes e que o Composto A² e Composto B² podem ser combinados juntos em uma composição/formulação farmacêuticas.

[00157] Em uma modalidade, um ou mais componentes de uma combinação da invenção são administrados intravenosamente. Em uma modalidade, um ou mais componentes de uma combinação da invenção são administrados oralmente. Em uma outra modalidade, um ou mais componentes de uma combinação da invenção são administrados intratumoralmente. Em uma outra modalidade, um ou mais componentes de uma combinação da invenção são administrados sistemicamente, por exemplo, intravenosamente e um ou mais outros componentes de uma combinação da invenção são administrados intratumoralmente. Em qualquer uma das modalidades, por exemplo, neste parágrafo, os componentes da invenção são administrados como uma ou mais composições farmacêuticas.

[00158] Em um aspecto, métodos são providos para o tratamento de câncer, compreendendo administrar a um ser humano em necessidade do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz de (i) um anticorpo anti-ICOS ou a porção de ligação a antígeno do mesmo, além de um ou mais diluentes, veículos, excipientes e/ou ingredientes inativos e (ii) um anticorpo anti-PD1 ou a porção de ligação a antígeno do mesmo ou um anticorpo anti-PDL1 ou a porção de ligação a antígeno do mesmo, além de um ou mais diluentes, veículos, excipientes e/ou ingredientes inativos. Em

uma modalidade de administração sequencial de um anticorpo anti-ICOS ou a porção de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo provê um efeito sinérgico comparado com a administração de cada agente como monoterapia ou concorrentemente. Em uma modalidade, de administração sequencial de um anticorpo anti-ICOS ou da porção de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo provê um efeito sinérgico comparado com a administração de cada agente como monoterapia ou concorrentemente.

[00159] Em uma modalidade, o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo compreende um domínio V_H compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO:7; e um domínio V_L compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácido como apresentada na SEQ ID NO:8.

[00160] Em uma modalidade, métodos para tratar câncer são providos em que o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado em um intervalo de tempo selecionado de uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas e uma vez a cada quatro semanas. Em uma outra modalidade, o anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado em um intervalo de tempo selecionado de uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas e uma vez a cada quatro semanas. Como é entendido na técnica o início de administração de cada agente pode ser separado por um período intersticial. o período intersticial pode ser de 12 horas, uma a seis dias, uma semana, duas semanas, três semanas, quatro semanas, cinco semanas ou seis semanas. Por via de exemplo, um anticorpo anti-ICOS poderia ser administrado no Dia 1 de

tratamento com um período intersticial de duas semanas antes do início da terapia de anticorpo anti-PD1 que começaria no Dia 14. Em um aspecto, o tratamento com o dito anticorpo anti-ICOS continuaria com a administração de uma única infusão IV em um intervalo de tempo de, por exemplo, a cada uma, duas, três ou quatro semanas. Similarmente, o tratamento com o dito anticorpo anti-PD1 continuaria com a administração de uma única infusão IV em um intervalo de tempo de, por exemplo, a cada uma, duas, três ou quatro semanas.

[00161] Em uma modalidade, o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado como uma infusão IV. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado como uma infusão IV. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado como uma infusão IV. Em um aspecto, o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado antes do anticorpo anti-PD1 ou da porção de ligação a antígeno do mesmo ou o anticorpo anti-PD1 ou a porção de ligação a antígeno do mesmo. Em uma modalidade, a administração do anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é iniciada em um ponto de tempo selecionado de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas depois do início da administração do dito anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo. Em um aspecto, o anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado antes do anticorpo anti-ICOS ou da porção de ligação a antígeno do mesmo. Em uma modalidade, o período intersticial entre o início do anticorpo anti-PD1 ou terapia anti-PDL1 e o início da terapia com o anticorpo anti-ICOS é selecionado de 1 dia, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas e 6 semanas.

[00162] Em uma modalidade, o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e o dito anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo são administrados ao dito ser humano até que o dito ser humano mostre progressão da doença ou toxicidade inaceitável. Em uma modalidade, os métodos são providos para o tratamento de câncer compreendendo adicionalmente administrar pelo menos um agente antineoplástico e/ou pelo menos um agente imunomodulador ao dito ser humano.

[00163] Tipicamente, qualquer agente antineoplástico que tenha atividade contra um tumor suscetível sendo tratado pode ser coadministrado no tratamento de câncer na presente invenção. Os exemplos de tais agentes podem ser encontrados em Cancer Principles and Practice of Oncology por V.T. Devita, T.S. Lawrence e S.A. Rosenberg (editores), 10^a edição (5 de dezembro de 2014), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Uma pessoa de habilidade comum na técnica seria capaz de discernir quais combinações de agentes seriam úteis com base nas características particulares dos fármacos e do câncer envolvido. Os agentes antineoplásticos típicos úteis na presente invenção incluem, mas não são limitados a, agentes antimicrotúbulo ou antimitóticos tais como diterpenóides e alcalóides vinca; complexos da coordenação da platina; agentes de alquilação tais como mostardas nitrogenadas, oxazafosforinas, alquilsulfonatos, nitrosoureas e triazenos; agentes antibióticos tais como actinomicinas, antraciclinas e bleomicinas; inibidores da topoisomerase I tais como camptotecinas; inibidores da topoisomerase II tais como epipodofilotoxinas; antimetabólitos tais como análogos de purina e pirimidina e compostos antifoliato; hormônios e análogos hormonais; inibidores do caminho da transdução de sinal; inibidores de angiogênese da tirosina cinase não receptora; agentes imunoterapêuticos; agentes

proapoptóticos; inibidores da sinalização do ciclo celular; inibidores de proteassomas; inibidores da proteína de choque térmico; inibidores do metabolismo de câncer; e agentes de terapia gênica de câncer tais como células T geneticamente modificadas.

[00164] Os exemplos de um ingrediente ou ingredientes ativos adicionais para o uso em combinação ou coadministrados com os presentes métodos ou combinações são agentes antineoplásticos. Os exemplos de agentes antineoplásticos incluem, mas não são limitados a agentes quimioterapêuticos; agentes imunomoduladores; imunomoduladores; e adjuvantes imunoestimuladores.

EXEMPLOS

[00165] Os seguintes exemplos ilustram vários aspectos não limitantes desta invenção.

Exemplo 1

[00166] O projeto de estudo do anticorpo anti-ICOS / anticorpo anti-PD1 concorrentes e estudo de dosagem em fases conduzido é mostrado na FIG. 1. A FIG. 2 é um esquemático mostrando o procedimento de estudo de anticorpo anti-ICOS / anticorpo anti-PD1 concorrentes e estudo de dosagem em fases. Mostrado no fundo da FIG. 2 está uma tabela listando anticorpos usados no estudo. Nas FIGS. 3-7, FIGS. 8A-8C, FIGS. 9A-9C e FIGS. 10-14, “Rt ICOS” se refere a “anticorpo anti-ICOS de rato;” “Rt PD1” se refere a “anticorpo anti-PD1 de rato.” “Rt IgG2A” se refere a “IgG2A de rato;” “Rt IgG2B” se refere a “IgG2B de rato.”

Monoterapia:

[00167] Como mostrado nas FIGS. 3, 4, 8B, 10 e 11, o anticorpo ICOS anticamundongo de rato (17G9) 100 µg ou 10 µg mostrou taxa de crescimento de tumor (FIG. 3, FIG. 4, FIG. 8B) e sobrevivência global (40%) (FIG. 10, FIG. 11) similares.

[00168] O anticorpo anti-PD1 anticamundongo de rato (200 µg) não

teve nenhum efeito sobre a taxa de crescimento de tumor (FIG. 3, FIG. 4, FIGS. 8A-8B). A sobrevivência global foi de 10% (FIG. 10, FIG. 11).

Combinação:

[00169] No dia 10, a dosagem concorrente de anticorpo anti-ICOS (100 µg ou 10 µg) combinada com anticorpo anti-PD1 mostrou eficácia antitumor sinérgica comparada com o regime de dosagem mono ou em fases (FIGS. 3-7, 8A-8C, 9A-9C).

[00170] Camundongos no Grupo 12 tratados com apresentação de anti-ICOS / anti-PD1 acompanhando a dosagem mostraram aumento surpreendente e inesperado na sobrevivência de longa duração. Considerando a sobrevivência de longa duração de camundongo (dia 67 após a 1ª dose), 60% dos camundongos do Grupo 12 (apresentação de anti-ICOS seguida por 6 doses de anti-PD1) mostraram resposta completa (6 camundongos foram livres de tumor, 1 camundongo encontrado morto devido aos anticorpos antifármaco (ADA)) (FIG. 10, FIG. 12, FIG. 14). Vinte por cento (20%) dos camundongos do Grupo 11 (apresentação de anti-ICOS seguida por 6 doses de IgG2A de rato) mostraram resposta completa (3 camundongos foram livres de tumor, 3 camundongos foram encontrados mortos devido aos ADA) (FIG. 10, FIG. 12, FIG. 14); os dados são comparáveis aos dados da monoterapia anti-ICOS. Trinta por cento (30%) dos camundongos do Grupo 8 (apresentação anti-PD1 seguida por 3 doses de anti-PD1+ IgG2b de rato) mostraram resposta completa (3 camundongos estão livres de tumor) (FIG. 10, FIG. 12, FIG. 13); isto mostrou melhor sobrevivência global do que 3 doses de anti-PD1 (10%, 1 camundongo livre de tumor). Vinte por cento (20%) dos camundongos do Grupo 9 (apresentação anti-PD1 seguida por 3 doses de anti-PD1+ anti-ICOS) mostraram resposta completa (3 camundongos foram livres de tumor, 3 camundongos foram encontrados mortos devido aos ADA) (FIG. 10, FIG. 12, FIG. 13). Os ADA ocorreram na 4ª e 5ª doses.

[00171] Os resultados aqui descritos no Exemplo 1 foram obtidos com os seguintes materiais e métodos.

Camundongos, inoculação de tumor e tratamento

[00172] Todos os estudos foram conduzidos de acordo com o GSK Policy on the Care, Welfare and Treatment of Laboratory Animals e foram revisados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) no GSK ou pelo processo de revisão ética na instituição onde o trabalho foi realizado. Camundongos BALB/c fêmeas de 6-8 semanas de idade (Envigo) foram utilizados para estudos *in vivo* em uma instalação AAALAC plenamente oficialmente reconhecida.

[00173] $5,0 \times 10^4$ células/camundongo de células de tumor de carcinoma colônico de camundongo CT26 (ATCC CRL-2638) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito. Os dados de volume de tumor e peso corporal foram coletados usando o pacote de software Study Director[®] (Studylog Systems, South San Francisco, CA, USA). O volume de tumor foi calculado usando a fórmula: Volume de tumor (mm)³ = 0,52* l *w² onde w = largura e l = comprimento, em mm, do tumor. Quando os tumores atingiram aproximadamente 50 a 100 mm³, os camundongos foram randomizados em vários grupos (n = 10/grupo de tratamento) com base no volume de tumor usando o método de amostragem estratificado no software Log[®] do estudo antes do início do tratamento. A medição de tumor de mais do que 2.000 mm³ para um camundongo individual e/ou desenvolvimento de ulcerações abertas no tumor e/ou perda de peso corporal maior do que 20% resultou nos camundongos sendo removidos do estudo. A dosagem começou no dia da randomização. Os camundongos receberam os anticorpos anti-ICOS de camundongo (clone 7E,17G9) e/ou anti-PD1 de camundongo (clone RMP1-14) ou solução salina via injeção intraperitoneal duas vezes por semana começando no dia da randomização para um total de 3 doses de anti-ICOS e 3 ou 6 doses de anti-PD1 para a

dosagem concorrente e sequencial respectivamente. De modo a avaliar a atividade antitumoral de combinar os anticorpos monoclonais anti-ICOS e anti-PD-1, os camundongos foram dosados duas vezes por semana com anti-ICOS (clone 7E,17G9, IgG2b de rato 100 µg) ou seu controle de isótipo (IgG2b de rato 100 µg) junto com anti-PD-1 (clone RMP1-14, IgG2a de rato 200 µg) ou seu controle de isótipo (IgG2a de rato 200 µg) concorrentemente. Para os experimentos envolvendo a dosagem sequencial, a dosagem com anticorpo anti-ICOS começou depois das 3 doses de anti-PD1 o que significa que as últimas 3 das 6 doses anti-PD1 foram dadas em combinação com anti-ICOS ou a dosagem anti-PD1 começou depois que todas as 3 doses do anticorpo anti-ICOS foram completadas. Controles de isótipo apropriados também foram utilizados em um regime de dosagem similar.

[00174] Os dados são plotados usando o software Graphpad® e a análise estatística foi realizada pela Statistician.

Exemplo 2

Caracterização de um Anticorpo agonista anti-ICOS IgG4 que evoca ativação de célula T e antitumor responses sozinhas e com bloqueio de PD-1

[00175] Está descrita no Exemplo 2 a caracterização da atividade imunostimulatória e antitumor de um anticorpo agonista anti-ICOS humanizado não exaustiva, com uma ênfase na importância da escolha do isótipo para eficácia ótima e provê base lógica forte para explorar isto em pacientes com câncer como um agente único e em combinação com o bloqueio do ponto de checagem de PD-1.

[00176] O CoEstimulador de célula T Indutível (ICOS) é um receptor coestimulador restrito de célula T cuja expressão é induzida nas células T ativadas no acoplamento do receptor de célula T. Nós demonstramos que o agonismo de ICOS evoca ativação potente de célula

T, mobilização de células T para o sítio de tumor e respostas antitumor em modelos de camundongo singênicos. Nossos dados indicam que a escolha de isótipo para o anticorpo agonista é crucial para evitar a citotoxicidade dependente de Fc e a depleção de células T efetoras (T_{eff}), como observado com uma versão IgG1 do anticorpo testado. Além disso, nossos dados sugerem que o nível de expressão de ICOS nas células T reguladoras (T_{reg}), apesar de alto, oferece uma janela estreita para a depleção seletiva de T_{regs} na maioria dos tumores, devido aos níveis sobrepostos de ICOS no T_{eff} e à suprarregulação de ICOS na presença de bloqueio do ponto de checagem. A exploração de isótipos levou à seleção de um anticorpo agonista anti-ICOS IgG4 humanizado (H2L5 IgG4PE) para desenvolvimento clínico. Nós apresentamos a caracterização da atividade imunológica e potencial terapêutico deste anticorpo agonista de ICOS, correntemente sendo investigado sozinho e em combinação com pembrolizumab em um primeiro estudo clínico em seres humanos.

Introdução

[00177] O coestimulador de célula T indutível (ICOS) é um receptor coestimulador com homologia estrutural e funcional para a superfamília CD28/CTLA-4-Ig (Hutloff, A. *Nature* 397: 263-266 (1999)). A expressão de ICOS é suprarregulada pela estimulação de antígeno e a sinalização de ICOS induz a produção de citocinas tanto T_H1 quanto T_H2 e proliferação de células T efetoras (T_{eff}). A expressão de ICOS foi observada nas células T_H17 em repouso, auxiliar folicular T (T_{FH}) e T reguladoras (T_{reg}); entretanto, diferente de CD28, o mesmo não é altamente expresso na maioria das populações de célula T ingênua e de memória no repouso (Fazilleau, N. *et al.* *Nat Immunol.* 8(7): 753-61. (2007), Paulos, C. M. *et al.* *Sci Transl Med.* 2(55): 55-78. (2010)). ICOS desempenha um papel crucial na sobrevivência e expansão de T_{eff} e T_{reg} durante uma resposta imune (Burmeister, Y. *et al.* *J Immunol.* 180(2): 774-82. (2008)) e foi mostrado

ser crítico para o desenvolvimento e função de T_H17 (Paulos, C. M. *et al.* *Sci Transl Med.* 2(55): 55-78. (2010), Guedan, S. *et al.* *Blood* 124(7): 1070-80. (2014)).

[00178] Os dados emergentes de pacientes tratados com anticorpos anti-CTLA-4 sugerem que as células T de memória expressando ICOS pode, ajudar a mediar as respostas imunes antitumor e a sobrevivência de longa duração (Liakou, C. I. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(39): 14987-92. (2008); Di Giacomo, A. M. *et al.* *Cancer Immunol Immunother.* 62(6): 1021-8. (2013); Carthon, B. C. *et al.* *Clin Cancer Res.* 16(10): 2861-71. (2010); Vonderheide, R. H. *et al.* *Clin Cancer Res.* 16(13): 3485-94. (2010)). ICOS foi mostrado ser crítico para a atividade antitumor anti-CTLA-4 em camundongos (Fu, T. He, Q., Sharma, P. *Cancer Res.* 71(16): 5445-54. (2011); Fan, X, *et al.* *J Exp Med.* 211(4): 715-25. (2014)) e relatos anteriores sustentam o conceito de que a ativação de ICOS nas células T CD4 e CD8 usando ligante de ICOS de murino recombinante tem potencial antitumor (Ara, G. *et al.* *Int. J Cancer.* 103(4): 501-7 (2003)). O ligante ICOS humano (ICOS-L) foi mostrado ligar tanto CTLA-4 quanto CD28 além de ICOS, o que limita o uso potencial de ICOS-L recombinante como um produto terapêutico nos seres humanos (Yao, S. *et al.* *Immunity* 34(5), 729-40. (2011)); necessitando um método terapêutico alternativo para ativar ICOS em pacientes com câncer.

[00179] Aqui, nós descrevemos a caracterização imunológica e antitumor de um anticorpo monoclonal (mAb) agonista de IgG4 anti-ICOS humanizado primeiro-em-classe H2L5 IgG4PE, designado para liberar agonismo de ICOS ótimo por intermédio da ligação cruzada do receptor Fc gama ($Fc\gamma R$), com mínima citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e atividade de fagocitose; reduzindo deste modo o risco de depleção de T_{eff} . Os dados pré-clínicos compreensivos aqui descritos, sustentam o teste clínico de H2L5 IgG4PE, correntemente sendo

investigado sozinho e em combinação com pembrolizumab em um estudo clínico primeiro-em-ser humano.

Resultados

Desenvolvimento de um anticorpo monoclonal (mAb) agonista de ICOS anti-ser humano potente e seletivo

[00180] Nós realizamos a geração de um mAb de ICOS agonístico anti-ser humano pela imunização de camundongos com domínio extracelular de ICOS. Um destes mAbs foi humanizado e expresso como um IgG4 humano com 2 mutações Fc (ácido glutâmico para leucina no resíduo 235) (Kabat, E. A., *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publication no. 91-3242. (1991)) e substituição de prolina no lugar de serina no resíduo 228 (numeração EU) para reduzir a troca do braço do fragmento de ligação a antígeno (Fab) com IgG4 nativa (Manjula, P. *et al.* The Journal of Immunology. 164: 1925-1933. (2000), Rispens, T. *et al.* J. Am. Chem. Soc. 133 (26): 10302–10311. (2011)). O H2L5 IgG4PE resultante daqui em diante aludido como “H2L5”.

[00181] H2L5 ligou ao ICOS humano com uma afinidade de 1,34 nM (FIG. 15A), que é aproximadamente 17 vezes mais alto do que a interação de ICOS-L/CD275 nativo (FIG. 15B). H2L5 não se ligou ao ICOS de murino ou ao CD28 ou CTLA-4 humanos, as duas proteínas estruturalmente relacionadas mais próximas. Isto contrasta com o ICOS-L humano nativo, que se liga tanto a CTLA-4 quanto a CD28 (Yao, S. *et al.* Immunity 34(5), 729-40. (2011)). H2L5 bloqueou a ligação de ICOS/ICOS-L pela citometria de fluxo e competiu parcialmente ($\leq 50\%$) com ICOS-L na ligação ao ICOS nas concentrações acima de 1 $\mu\text{g/mL}$ nos imunoenaios MSD (FIGS. 22A-22B). H2L5 também se ligou às células T tanto CD4 quanto CD8 em amostras de PBMC ativadas de doadores humanos saudáveis (FIG. 15C). ICOS foi anteriormente mostrado ativar

AKT em resposta à ligação de ICOS-L nas células T humanas (Okamoto, N. *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 310(3): 691-702. (2003)); as células T CD4 humanas primárias pré-ativadas demonstraram um aumento em pAKT e pGSK3 β em resposta ao tratamento com H2L5 (FIG. 15D). H2L5 significativamente aumentou a ativação de célula T CD4 e CD8, quando usado em um formato ligado à placa junto com anti-CD3, como medido pela expressão (FIG. 15E) e proliferação (FIG. 15F) de CD69. Ativação mínima foi observada com H2L5 na ausência de tratamento anti-CD3, indicando que o mesmo não tem atividade superagonista sob estas condições de ensaio.

[00182] O anticorpo H2L5 ligado à placa induziu um aumento dependente da dose nas citocinas T_H1, T_H2 e T_H17, IFN- γ , TNF- α , IL-17a, IL-10, IL-6 e a um grau menor IL-2, IL-5 e IL-13 em PBMC de doadores saudáveis (HD) (FIG. 15G, FIG. 23A, FIG. 33). Um perfil similar de indução de citocina foi observado em PBMC de pacientes NSCLC, com indução forte de IFN- γ e níveis mais baixos de outras citocinas incluindo TNF- α , IL-10 e IL-2 (FIG. 15H, FIG. 34). Um aumento dependente da dose na ativação de marcadores de célula T: CD25, OX40 e CD69 nas células T tanto CD4 quanto CD8 também foi observado com HD seguindo a estimulação com anti-CD3 e H2L5 ligados à placa (FIG. 23B). Com células T CD3⁺ humanas isoladas, o tratamento com H2L5 levou a um aumento significativo na expressão de mRNA do fator de transcrição T_H1 T-Bet (FIG. 15I) assim como a molécula citotóxica Granzime-B (FIG. 15J). Uma diminuição significativa na expressão de L-Selectina foi observada, indicando uma transição para um fenótipo efetor ativado (FIG. 15K). A capacidade do anticorpo H2L5 ligado à placa para coestimular células T isoladas *ex vivo* de tumores desagregados na presença de anti-CD3 depois de 6 dias de cultura, também foi avaliada. Um aumento dependente da concentração e robusto em IFN- γ foi observado em 9/10 doadores (FIG.

15L), junto com a indução menos robusta de IL-17 e IL-10 comparado com PBMC saudáveis, assim como níveis indetectavelmente baixos de citocinas T_H2 (IL-5 e IL-13) (FIG. 24A-D). Aumentos significantes nos marcadores de ativação OX40 (FIG. 15M), CD25 (FIG. 15N) e LAG3 (FIG. 25A) foram observados nas células T CD8, além de um aumento modesto nas células CD8+PD-1+ e células CD4+CD25+Foxp3+(T_{reg}) (FIGS. 25B-25D). Apenas porcentagem baixa de células expressando ICOS-L foi observada com a maioria dos doadores (FIG. 25C).

[00183] Ao todo, estes dados mostram que H2L5 é um agonista de ICOS potente, capaz de dirigir a ativação e proliferação de célula T, mas não é um superagonista capaz de dirigir a ativação de célula T na ausência de estimulação de TCR.

O isótipo de anticorpo e o engrenamento de FcγR são críticos para a função de H2L5

[00184] A reticulação mediada por FcγR é crítica para a função de anticorpo agonista (Dahal, L. N. *et al.*. Immunol Rev. 268(1): 104-22. (2015); Furness A. J. *et al.* Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014)). Os resultados descritos na FIG. 15 utilizaram anticorpo ligado à placa, que supera a necessidade quanto à reticulação de FcγR e sugere que um isótipo de anticorpo capaz de engrenar FcγR e a mediação da reticulação é chave para se obter agonismo de ICOS ótimo. Para avaliar formalmente isto, nós clonamos as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de H2L5 e as expressamos como isótipos de IgG humana diferentes (IgG1, IgG2, IgG4PE e IgG1 deficiente em Fc [substituições de aminoácido (AA) L235A e G237A) (Bartholomew, M. *et al.* Immunology 85(1): 41-8 (1995)). A ligação das variantes de isótipo H2L5 diferentes foi determinada contra FcγRI, FcγRIIa (H131), FcγRIIa (R131), FcγRIIb, FcγRIIIa (V158) e FcγRIIIa (F158) humanos e demonstraram padrões esperados de ligação (FIG. 35). A IgG4PE conteve duas substituições AA de IgG4 humana

nativa; ácido glutâmico para leucina no resíduo 235 (Kabat, E. A., *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. U.S. Dept. of Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publication no. 91-3242. (1991)) e substituição de prolina no lugar da serina no resíduo 228 (numeração EU) para reduzir a troca do braço do fragmento de ligação a antígeno (Fab) com IgG4 nativo (Manjula, P. *et al.* The Journal of Immunology. 164: 1925-1933. (2000), Rispens, T. *et al.* J. Am. Chem. Soc. 133 (26): 10302–10311. (2011)) e ligação diminuída para ativar Fc γ R e C1q, enquanto retém a ligação ao Fc γ RIIb inibidor. No ensaio de PBMC o anticorpo de IgG1 H2L5 diminuiu a proliferação de célula T tanto CD4 quanto CD8 quando adicionado em solução em mais do que 50% dos doadores testados (FIG. 16A). Ao contrário, as variantes de isótipo deficientes em IgG2, IgG4PE e Fc de H2L5 não resultaram em inibição substancial da proliferação de célula T CD4 ou CD8 em nenhum dos doadores testados, enquanto o formato IgG4PE de H2L5 resultou em proliferação aumentada em um subconjunto dos doadores (FIG. 16A). Nós em seguida testamos se o efeito inibidor de IgG1 de H2L5 foi devido à ADCC via células NK na mistura de PBMC. Nas PBMCs de 10 doadores saudáveis (HD), o efeito inibidor de IgG1 de H2L5 nas populações tanto CD4 quanto CD8 foi perdido quando as células NK foram removidas da reunião de PBMC (FIG. 16B). As variantes de isótipo H2L5 foram também testadas em um ensaio repórter que detecta engrenamentos de Fc γ RIIIa, o Fc γ R de ativação primária responsável pela ADCC mediada por NK nos seres humanos. Embora a IgG1 de H2L5 induzisse um aumento significativo na sinalização da luciferase, quando incubada com células T ativadas, nem IgG4PE de H2L5 nem anticorpos deficientes em Fc de H2L5 induziu a sinalização mediada por Fc γ RIIIa (FIG. 26A). Adicionalmente, IgG1 de H2L5 induziu a morte da célula T em uma maneira dependente de NK enquanto nem IgG4PE nem H2L5 deficiente em Fc não resultaram em

nenhum aumento significativo na morte de célula quando comparado com os isótipos de controle (FIG. 16C).

[00185] Estudos anteriores relataram que a densidade de receptor pode influenciar a susceptibilidade das células T para matar pelo ADCC, levando à depleção potencial preferencial de subconjuntos diferentes de célula T, que podem diferir no microambiente tumoral comparado com o tecido linfóide (Furness A. J. *et al.* Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014)). O nível de expressão de ICOS em CD4, CD8 e T_{reg} recém isolados de tumores diferentes foi determinado pela citometria de fluxo. Embora houvesse expressão mais alta observada nas T_{reg} vs células T CD4 e CD8, isto foi heterogêneo com alguns tumores mostrando níveis de sobreposição entre estas populações; conseqüentemente, a alta expressão de ICOS não foi um traço distinto de T_{reg} (FIG. 16D). Para avaliar adicionalmente a contribuição relativa de isótipo Fc sobre a depleção potencial pela ADCC, as células CD4, CD8 e T_{reg} foram purificadas diretamente de pacientes com câncer diferentes e os níveis de densidade do receptor de ICOS foi correlacionada com a capacidade da IgG1 ou isótipo IgG4PE de H2L5 para estimular FcγRIIIA em um ensaio repórter *ex vivo* (FIG. 16E, FIG. 26B). As células T isoladas de tumores não estimularam FcγRIIIa quando incubadas com o isótipo IgG4PE de H2L5; ao passo que a incubação com IgG1 de H2L5 levou a alguma estimulação (variável). Em alguns tumores, o engrenamento do receptor de FcRγIIIa foi observado com T_{reg}, CD4 e CD8, especialmente nas doses de 1 a 10 µg/mL sustentando a ideia de que a deleção de ADCC seletiva de T_{reg} sem afetar CD4 e CD8 pode não ser universalmente possível em todos os tumores (por exemplo células T CD4 convencionais de amostra de paciente de Mama 1001202 induziram estimulação similar para a T_{reg} nas doses de 1 a 10 µg/ml; FIG. 16F, FIG. 26B).

[00186] Com base nos dados acima, o isótipo selecionado para

desenvolvimento foi o anticorpo engenheirado IgG4PE, H2L5.

H2L5 induz agonismo mediado por Fc γ R de ativação de célula T dependente de TCR.

[00187] H2L5 foi testado com células T CD4 humanas isoladas tanto em um formato ligado à placa (anticorpo imobilizado) assim como em solução. H2L5 no formato imobilizado, que simula a reticulação dependente de Fc γ R ligado à membrana, induziu níveis significativamente maiores de IFN- γ comparado com o anticorpo solúvel (FIG. 17A). A importância do engrenamento de Fc γ R para a atividade agonista de H2L5 ótima foi confirmada adicionalmente em um ensaio de PBMC humana ativada, onde H2L5 resultou em >2 vezes de indução de IFN- γ ; ao passo que a versão deficiente em Fc de H2L5 não teve nenhuma indução da atividade de citocina comparada com o controle de isótipo (FIG. 17B). As versões IgG4PE e deficiente em Fc de H2L5 também foram testadas em uma reação de linfócito mista (MLR) modificada. O mAb H2L5 IgG4PE proveu >2 vezes de indução de IFN- γ ao passo que o mAb H2L5 deficiente em Fc não teve nenhuma atividade comparada com o controle de isótipo (FIG. 17C). Em seguida, um ensaio de cocultura casado com doador de monócito de célula T CD4 /CD14 foi utilizado para determinar se os monócitos expressando Fc γ R aumentaram o potencial agonístico de H2L5 solúvel. Como o formato de ensaio MLR, H2L5 apenas induziu IFN- γ quando testado como um isótipo IgG4PE; o anticorpo deficiente em Fc não mostrou nenhuma indução de citocina significante comparado com o controle de isótipo. A adição de monócitos, que são conhecidos expressar Fc γ Rs incluindo isoformas de Fc γ RII, resultou em um aumento significativo na produção de citocina induzida por H2L5 IgG4PE comparado com células T sozinhas. A interação com Fc γ RIIB foi mostrada ser crítica para a atividade agonística de outros anticorpos imunomoduladores alvejando os receptores da família do TNF- α assim como CD28 (Bartholomew, M. *et al.*

Immunology 85(1): 41-8 (1995); Bartholomaeus, P. *et al.* J Immunol. 192(5): 2091-8. (2014)). Ao contrário, a adição de um anticorpo bloqueando Fc γ R completamente inibiu a indução de citocina induzida por H2L5 (FIG. 17D). Estes resultados indicam que H2L5 pode alcançar o engrenamento de Fc γ R por intermédio de Fc γ RIIB como observado com outros anticorpos agonistas de IgG4 (Bartholomaeus, P. *et al.* J Immunol. 192(5): 2091-8. (2014), Hussain, K. *et al.* Blood 125 (1): 102-110 (2015)), enquanto evita a morte pela ADCC de células T ICOS⁺, como observado com o isótipo IgG1.

[00188] Para avaliar a sua localização e mobilização na superfície celular, H2L5 foi fluorescentemente rotulado, adicionado às culturas de célula T CD3⁺ primárias humanas ativadas, juntas com DCs e imageadas. Seguindo a ligação, H2L5 rapidamente polarizou na superfície da célula T. As células T mobilizadas começaram a varrer a cultura até que a ligação com uma célula dendrítica (DC) foi iniciada. Em casos onde as células T foram em contato celular com DCs, H2L5 acumulou no ponto de contato (FIG. 17E). Estudos adicionais usando coculturas de DC humana e células T demonstraram que H2L5 foi rapidamente colocalizado com CD28 e a um grau menor CD4 nos capuzes polarizados de células T ativadas assim como nas sinapses imunes subsequentes que formaram na ligação da célula T à DC (FIG. 17F). Estes resultados indicam que ICOS induz a mobilização de célula T humana e é colocado na sinapse imune a seguir da ativação de célula T.

H2L5 induz um fenótipo de memória efetora e atividade antitumor *in vivo*

[00189] A funcionalidade *in vivo* de H2L5 foi avaliada em uma PBMC humana enxertada no modelo de camundongo NSG implantado com tumores A2058. Este modelo induz uma resposta da Doença do Enxerto versus Hospedeiro (GVHD) e foi usado anteriormente para estudar a atividade de célula T efetora e de memória (23). No sangue de

camundongos tratados com H2L5, o número de células T humanas diminuiu em uma maneira dependente da dose (FIG. 18A), enquanto que um aumento correspondente na expressão de CD69 (representando a ativação de célula T) foi observada (FIG. 18B). A versão deficiente em Fc de H2L5 mostrou tendências similares, se bem que mais fracas, do que H2L5 IgG4PE sugerindo que o desaparecimento de células não foi devido às ADCC. H2L5 induziu um aumento dependente da dose em células efetoras de memória (T_{EM}) $CD4^+CD45RO^+CD62L$ (FIG. 18C) e células efetoras CD8 terminalmente diferenciadas (TEMRA) $CD8^+CD45RO^-CD62L^-$ (FIG. 18D). H2L5 foi em seguida testado em camundongos NSG enxertados com PBMC humanas abrigando tumores HCT116 ou A549. A detecção de ligação de H2L5 às células T ICOS+ ($CD4$, $CD8$ e T_{reg}), por um anticorpo rotulado fluorescente anti-IgG4 humano, foi observada no sangue e tumor nas doses de 0,4 e a um grau menor 0,04 mg/kg demonstrando engrenamento do alvo nos camundongos carregando os tumores A549 (FIG. 18E, FIGS. 27A-27B). Os camundongos tratados com anticorpo anti-PD-1 IgG4 (Keytruda) também mostraram a detecção de anticorpo ligado usando o mesmo reagente de detecção. O tratamento de camundongos com H2L5 foi associado com um aumento na razão $CD8:T_{reg}$ nos tumores A549, comparáveis àquele observado nos camundongos tratados com anti-PD-1. (FIG. 18F). H2L5 resultou na inibição do crescimento de tumor significante tanto no modelo de tumor HCT116 quanto no A549 (FIGS. 18G-18H). No modelo A549 onde a resposta de GVHD foi menos severa, a inibição do crescimento de tumor resultou em aumento dependente da dose na sobrevivência além de 50 dias (FIG. 18I). Estes experimentos sugerem que as doses de 0,4 mg/kg, que correlacionam com o engrenamento bem-sucedido do receptor ICOS, resultam em efeitos farmacológicos subsequentes associados com a ativação de célula T no sangue e tumor e redução do crescimento de tumor.

O isótipo Fc de anticorpo anti-ICOS de murino influencia a eficácia em tumores singênicos

[00190] Estudos na literatura usando CTLA-4, PD-L1, OX40 e CD40 mostraram que a seleção do isótipo Fc de mAbs pode significativamente influenciar a eficácia em modelos de tumor diferentes (Dahal, L. N. *et al.* Immunol Rev. 268(1): 104-22. (2015); Furness A. J. *et al.* Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014)). Para gerar um anticorpo anti-ICOS de camundongo substituto equivalente a uma IgG4 humana em termos de ligação de Fc γ R, (FIG. 36) o anticorpo ICOS anticamundongo 7E-17G9 foi clonado nos isótipos IgG1 e mIgG2a de murino (m) e testados em 2 modelos de tumor diferentes. O anticorpo 7E-17G9 mostrou atividade agonística no formato ligado à placa com anti-CD3 (FIG. 28). No modelo EMT6 o anticorpo mIgG1 mostrou maior eficácia do que a mIgG2a especialmente nas doses mais altas (>5 mg/kg, 100 μ g/camundongo) tanto com sobrevivência (FIG. 19A) quanto inibição do crescimento de tumor (FIG. 29A). Entretanto, ambos os isótipos mostraram eficácia dependente da dose apenas modesta como monoterapia no modelo CT26 (FIG. 19B, FIG. 29B). Como descrito acima para a IgG1 humana, o anticorpo depletor de mIgG2a pode ser menos eficaz do que o mIgG1, visto que o mesmo tem o potencial para depletar tanto T_{eff} quanto T_{reg}. Uma razão CD8:T_{reg} significativamente mais alta (FIG. 19C) foi observada para EMT6 vs CT26, antes do tratamento (100 mm³) e tanto o modelo EMT6 quanto o CT26 mostraram um aumento na porcentagem de células CD4 e CD8 e T_{reg} positivas em ICOS em tumor vs baço (FIG. 19D, FIG. 30) mas porcentagem mais alta de células positivas em ICOS CD8 foi observada no baço em EMT6 vs CT26 (80% vs 10%). Embora níveis mais altos de expressão de ICOS em T_{reg} de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) fossem observados tanto para tumores EMT6 quanto para CT26, os níveis de ICOS nos TILs CD8 foram aproximadamente 10 vezes mais altos em

EMT6 do que CT26 (30.000 vs 3000 MFI). Isto sugere que a expressão de ICOS alta em CD8 tanto na periferia quanto no tumor pode estar associada com a resposta com a atividade agonística do anticorpo mIgG1 no modelo EMT6 (FIGS. 19E-19G). Para explorar adicionalmente mecanismos do mAb anti-ICOS agonista nos camundongos carregando tumores mamários EMT6, efeitos na diversidade de TCR foram investigados; mudanças significantes no número de clones de TCR circulantes únicos e um aumento correspondente na clonalidade de TCR no sangue de camundongos tratados com mAb ICOS foi observado (FIGS. 31A-31C). A maioria dos clones que expandiram no sangue de camundongo em resposta ao tratamento com mAb agonista de ICOS também foram encontrados nos tumores (FIG. 19H). Estas verificações indicam que uma pequena reunião de clones de célula T reativos em tumor expandem em resposta ao tratamento com mAb ICOS.

Caracterização do caminho de ICOS / ICOS-L em cânceres humanos

[00191] Para explorar adicionalmente a tradução de um mAb agonista de ICOS como um anticorpo antitumoral terapêutico, tumores sólidos humanos da base de dados TCGA foram classificados pela expressão de mRNA ICOS (FIG. 26). A expressão mais alta foi observada no câncer da cabeça e pescoço, gástrico, esofágico, melanoma, NSCLC, cervical e mamário. A expressão foi confirmada em NSCLC pelo singleplex IHC (FIG. 32). Conforme o modo do mAb agonista de H2L5 de ação é planejada para fenocopiar a atividade de ICOS-L, a coexpressão de mRNA para ICOS e ICOS-L foi analisada nestes tipos de tumor (FIG. 20A). A expressão de ICOS frequentemente não foi coexpressa com ICOS-L, sustentando a hipótese de que H2L5 pudesse aumentar a sinalização de ICOS de baixo nível nestes tumores. Nós também avaliamos a expressão relativa de PD-L1 nas mesmas amostras. A expressão de PD-L1 foi associada com infiltração aumentada de célula T e usado como um

biomarcador preditivo para enriquecer pacientes respondendo ao tratamento anti-PD-1/PD-L1 em indicações diferentes. No geral houve uma clara associação entre PD-L1 e a expressão de ICOS mas isto foi variável entre indicações diferentes (FIG. 20A). Estes resultados foram confirmados pelo tingimento de IHC para a expressão de CD4, CD8 e FOXP3 e tendeu a localizar com ICOS nos infiltrados imunes em NSCLC (FIG. 20B).

[00192] A presença de tipos de célula chaves no microambiente tumoral foi analisada pela citometria de fluxo em biópsias de tipos de tumor diferentes. Da população de leucócito CD45+, as células T CD3 pareceram ser o tipo de célula dominante, variando de 20 a 80%; outros tipos de célula tais como as células B, macrófagos, monócitos, células NK e DC foram também presentes (FIG. 20C). Estes tipos de células expressam FcγR incluindo FcγRIIb, que podem prover a reticulação requerida para a atividade agonística de H2L5 no microambiente tumoral (Furness A. J. *et al.* Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014)). A composição das subpopulações de célula T produziram em média CD4 (68%), CD8 (30%) e T_{reg} (2%) embora houvesse heterogeneidade considerável entre tumores diferentes. Quando tipos de tumor foram analisados separadamente, a heterogeneidade entre CD8 e T_{reg} foi clara com NSCLC e RCC mostrando uma alta razão de CD8/T_{reg} (FIG. 20D). Análise adicional pelo IHC multiplex foi realizada para caracterizar a expressão ICOS de subtipos de célula T diferentes. A coexpressão de ICOS foi observada em uma proporção de células CD3+PD-1+, especialmente na cabeça e pescoço, esofágico, NSCLC e melanoma sustentando uma base lógica para o tratamento de combinação com terapias anti-PD-1 (FIGS. 20E-20F).

[00193] Em seguida, os efeitos da coestimulação de H2L5 sobre a expressão de gene pelas células T humanas purificadas foram determinados usando o painel de formação de perfil Human PanCancer-Immune para identificar uma assinatura do gene ICOS. Comparado com anti-CD3

sozinho, 120 genes foram diferencialmente induzidos com 85 suprarregulados e 35 infrarregulados (FIG. 20G). Diversos genes ou caminhos imunorrelacionados foram induzidos pelo H2L5 comparado com o anti-CD3 sozinho incluindo citocinas T_H1 e quimiocinas, a função e citotoxicidade de célula T e membros da família de TNF (FIG. 38). Os genes de topo identificados a partir de tumores EMT6 de camundongo tratados com 7E,17G9 que sobrepuseram com a assinatura induzida pelo ICOS humano são mostrados na FIG. 20H. Esta informação está sendo usada para guiar o desenvolvimento de uma assinatura transcricional de ICOS para monitorar efeitos farmacodinâmicos de H2L5 em estudos clínicos iniciais.

O tratamento com agonista ICOS induz PD-1/PD-L1 em tumores e demonstra atividade aumentada em combinação com bloqueio anti-PD-1.

[00194] PD-L1, um gene responsivo ao IFN- γ conhecido, assim como PD-1, aumentou significativamente nos tumores de camundongos tratados com mAb de ICOS (FIGS. 21A-21B). As PBMCs humanas foram coletadas de seis pacientes com câncer e tratados com H2L5, que resultou em um aumento significativo na expressão de PD-1 nas células T tanto CD4 quanto CD8 (FIG. 21C). Além disso, pacientes com NSCLC e melanoma tratados com terapias anti-PD-1 mostraram um aumento na expressão de ICOS nas células T CD4 em sangue periférico comparado com pré-tratamento (FIG. 21D). Portanto, nós testamos se a combinação com um anticorpo bloqueador de PD-1 aumentaria a atividade antitumor do mAb agonista de ICOS. O mAb agonista de ICOS (7E17G9 isótipo mIgG1) foi dosado sozinho ou em combinação com anticorpo anti-PD-1 em camundongos com tumores EMT6 estabelecidos (150 mm^3). A combinação resultou em uma resposta antitumor aumentada e sobrevivência de longa duração (90% dos camundongos) quando comparados com tratamento de monoterapia com os anticorpos ICOS ou PD-1 sozinhos (FIG. 21E). A

combinação de H2L5 e anti-PD-1 (pembrolizumab) também foi avaliada no modelo de camundongo humanizado e resultou em resposta antitumor realçada aos tumores A549 comparada com a monoterapia sozinha (FIG. 21F). Estes dados mostram que a adição de um anticorpo agonista de ICOS significativamente melhorou a atividade antitumor induzida por um anticorpo PD-1.

[00195] H2L5 foi adicionalmente testado sozinho ou em combinação com pembrolizumab em tumores primários ressecados de 6 pacientes com NSCLC em um ensaio *ex vivo*. Embora o tratamento com H2L5 sozinho resultasse em um aumento significativo no IFN- γ em 4/6 das amostras de tumor NSCLC testadas, a combinação de H2L5 e pembrolizumab resultou em um aumento significativo no IFN- γ quando comparado com o pembrolizumab sozinho e um aumento em 5/6 amostras quando comparada com o tratamento com H2L5 sozinho (FIG. 21G). A combinação de H2L5 com pembrolizumab também foi testada em um ensaio de MLR humano alogênico modificado onde o tratamento de combinação resultou em níveis de IFN- γ aumentados quando comparado com o agente sozinho em 3/3 pares de doadores saudáveis diferentes (FIG. 21H).

Debate

[00196] Nós apresentamos a primeira caracterização completa da atividade imunológica e potencial terapêutico de um agonista de ICOS anti-mAb de IgG4 humanizada primeiro-na-classe, H2L5. Nós demonstramos que o anticorpo agonista H2L5 IgG4PE induz ativação e expansão clonal significantes de células T tanto CD4 quanto CD8 *in vitro* e *in vivo*. Estas células T têm função efetora aumentada através da expressão aumentada de citocinas T_H1 tais como IFN- γ , assim como produção aumentada de fatores citotóxicos tais como Granzima B. As células T ativadas pelo anticorpo ICOS demonstraram localização de tecido aumentada para tumores com

acúmulo e infiltração significantes resultando em respostas antitumor. Antes dos relatos usando camundongos ICOS^{-/-} e ICOS-L^{-/-} assim como anticorpos bloqueadores para ICOS-L demonstraram a importância de ICOS para a expansão, sobrevivência e função de células T_{EM} tanto CD4 quanto CD8 em camundongos (4, 24-25). Adicionalmente, pacientes com deficiência imune variável comum, que é distinguida por uma perda homozigótica de ICOS, foram verificados ter menos células T de memória, especificamente aquelas que são CD62L^{baixa} (26). Nossos estudos usando um novo anticorpo agonista humano específico de ICOS confirmaram o papel de ICOS para induzir esta população de células T de memória, provendo um método terapêutico viável para alvejar este mecanismo importante nos seres humanos.

[00197] Nós mostramos que a forma engendrada de IgG4 que incorpora as mutações S228P e L235E (numeração EU) relativa à IgG4 humana nativa é o isótipo de anticorpo preferido em relação à IgG1 para se obter função agonista contra ICOS humano. Estas mudanças AA impedem trocas heterogêneas com IgG4 nativa (Rispen, T. *et al.* J. Am. Chem. Soc. 133 (26): 10302–10311. (2011)). O isótipo IgG4PE também reduziu a ligação ao FcγR ativador e C1q comparado com a IgG1 humana, diminuindo deste modo o potencial citotóxico de H2L5 que resultaria na depleção de células T positivas em ICOS através de mecanismos dependentes de anticorpo ou dependentes de complemento, respectivamente (Manjula, P. *et al.* The Journal of Immunology. 164: 1925-1933. (2000)). Nossos estudos *in vitro* têm mostrado que o isótipo IgG1 de H2L5 (o isótipo inicial de H2L5 planejado para desenvolvimento) é capaz de matar as células T CD4 e CD8 ativadas expressando altos níveis de ICOS, assim como reduzir a sua proliferação em uma maneira dependente de NK; isto não foi observado com o isótipo IgG4PE. Importaneamente, o isótipo IgG4PE retém a ligação funcional ao FcγRIIb (o FcγR inibidor),

crítico para possibilitar a atividade agonista contra diversos receptores imunes estimulatórios (Bartholomaeus, P. *et al.* J Immunol. 192(5): 2091-8. (2014); Hussain, K. *et al.* Blood 125 (1): 102-110 (2015), Aalberse, R. C. e Schuurman, J. Immunology 105(1): 9–19. (2002); Schuurman J. e Parren P. W. Curr Opin Immunol. (2016); White A. L. *et al.* J Immunol. 187(4): 1754-63. (2011); White A. L. *et al.* J Immunol 193 (4): 1828-1835 (2014); Dahal R. *et al.* Cancer Cell. 29(6): 820-31. (2016); Yu X. *et al.* Cancer Cell 33 (4): 664-675 (2018)), que também podem ser essenciais para a atividade agonista de ICOS e associados com efeitos antitumor nos seres humanos. A seleção do isótipo IgG4PE foi sustentada adicionalmente pelos estudos *in vivo* usando o anticorpo substituto antimurino ICOS 7E17G9, onde o isótipo IgG1 de murino mostrou maior eficácia do que a deleção do anticorpo IgG2a no modelo singênico EMT6. A IgG1 de murino tem um perfil similar à IgG4 humana, com baixa ligação para ativar receptores de Fc γ R, embora retenha a ligação a alguns receptores de Fc γ incluindo, Fc γ RIIB inibidor e induzindo a reticulação dependente de Fc para melhorar o agonismo do anticorpo anti-ICOS; ao passo que a IgG2a de murino pode ligar o Fc γ R ativador, igual à IgG1 humana e é capaz de mediar a deleção eficaz. Estudos realizados com CTLA-4, PD-L1, OX40 e CD40 mostraram que a seleção do isótipo Fc de mAbs pode significativamente influenciar a eficácia em modelos de tumor diferentes; entretanto, isto precisa ser otimizado para cada alvo, dependendo dos níveis de expressão relativa nos diferentes tipos de célula (por exemplo CD8 vs T_{eff} vs T_{reg}) e modo de ação do anticorpo (agonismo/deleção) e especificidade de epítipo (Dahal, L. N. *et al.* Immunol Rev. 268(1): 104-22. (2015), Furness A. J. *et al.*, Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014), Yu X. *et al.* Cancer Cell 33 (4): 664-675 (2018)). Tumores humanos *ex vivo* contêm proporções variáveis de células B, macrófagos e DCs, conhecidos expressar Fc γ RIIB, que é crítico para mediar a reticulação de Fc γ R requerida para H2L5 no microambiente

tumoral (Furness A. J. *et al.* Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014), Hussain, K. *et al.* Blood 125 (1): 102-110 (2015), Aalberse, R. C. e Schuurman, J. Immunology 105(1): 9–19. (2002); Schuurman J. e Parren P. W. Curr Opin Immunol. (2016); White A. L. *et al.* J Immunol. 187(4): 1754-63. (2011); White A. L. *et al.* J Immunol 193 (4): 1828-1835 (2014); Dahal R. *et al.* Cancer Cell. 29(6): 820-31. (2016); Yu X. *et al.* Cancer Cell 33 (4): 664-675 (2018)). Um equilíbrio no favorecimento de Fc γ RIIB inibidor vs Fc γ R ativador é frequentemente observado no ambiente imunossupressivo de tumores humanos, que pode favorecer a reticulação de H2L5 e realçar a sua atividade agonista (Furness A. J. *et al.* Trends in Immunology 35(7): 290-298 (2014), Dahal, L. *et al.* Cancer Research 77 (13) 3619-3631 (2017)).

[00198] Dada a atividade agonística de H2L5 descrito acima, um fator que deve ser considerado, é a expressão de ICOS nas células T_{reg} no microambiente tumoral. A relação de subconjuntos de células T positivas em ICOS sobre a resposta ao anticorpo substituto 7E,17E7 IgG1 de murino nos modelos de tumor de murino EMT-6 e CT26 foi explorada. Uma razão mais alta de ICOS+ CD8:T_{reg} foi observada na linha de base no modelo EMT6 vs CT26 em tumores, que pode ser um fator condutor para a eficácia maior no modelo EMT6 observada com 7E,17G9 IgG1. Similarmente, no modelo de camundongo humanizado, a redução de tumor pelo H2L5 foi associada com uma razão CD8:T_{reg} aumentada. Neste modelo, a resposta ao tratamento com monoterapia de H2L5 foi similar ao tratamento anti-PD-1. Estes resultados sugerem que a presença de T_{reg} positivo em ICOS não impede a capacidade de um agonista de ICOS de prover benefício terapêutico.

[00199] Tumores humanos expressam proporções variáveis de T_{eff} e T_{reg} CD4 e CD8, com variabilidade considerável entre tipos de tumor. A porcentagem de células positivas em ICOS e o nível de expressão de ICOS

foi verificada ser heterogênea entre tipos diferentes de célula, com uma tendência para níveis mais altos de ICOS no T_{reg} embora em muitos pacientes haja sobreposição entre a expressão de ICOS no T_{reg} vs células T CD4 e CD8. O isótipo IgG1 mas não o isótipo IgG4 do anticorpo anti-ICOS H2L5 foi capaz de ligar e induzir a ativação do ensaio repórter da luciferase de Fc γ RIIIA com T_{reg} purificado *ex vivo* e em algum grau células CD8 e CD4. Embora a atividade mediada pela IgG1 neste sistema de ensaio fosse verificada correlacionar com a densidade do receptor de ICOS, como foi relatado com outros alvos tais como CTLA-4, OX40 e GITR (19), a expressão diferencial de ICOS na T_{reg} vs T_{eff} foi menos proeminente. Além disso, visto que a expressão de ICOS no T_{eff} é realçada com tratamento anti-PD-1 e anti-CTLA-4, isto sugere que possa não haver uma janela terapêutica grande para os isótipos IgG1 para mediar a depleção seletiva de T_{reg} em relação ao T_{eff} *in vivo*. Com base nos dados descritos acima, as estratégias para o desenvolvimento de H2L5 incluem seleção de tipos de tumor que tenham uma alta razão CD8: T_{reg} e alta expressão de ICOS nas células T CD8, (por exemplo, NSCLC) e desenvolvimento de combinações razoáveis com agentes que diminuam a abundância de T_{reg} ou limitem a sua função.

[00200] Um parceiro de combinação racional sustentado pelos nossos dados é um anticorpo bloqueador PD-1/PD-L1. O tratamento com anticorpo agonista de ICOS significativamente induziu PD-1 nas células T humanas assim como a expressão de PD-1 e PD-L1 em tumores de camundongos tratados; além disso, o tratamento anti-PD-1 também foi mostrado induzir a expressão de ICOS nas células T_{eff} CD4 e CD8. Igual a atividade combinatória observada nos camundongos, o agonista de ICOS humano H2L5 em combinação com o anticorpo bloqueador PD-1, pembrolizumab, demonstrou produção de citocina aumentada em relação a cada agente sozinho em ensaios de célula imune humana *ex vivo*. Esta

indução robusta de IFN- γ pelo H2L5 IgG4PE sustenta a base lógica de combinação de anti-PD-1 visto que o IFN- γ é conhecido atuar na retroalimentação negativa pela suprarregulação de PD-L1 (Mandal, M. *et al.* *Clinical Cancer Research* 22(10): 2329-2334).

[00201] O tratamento com agente único com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1 tem demonstrado taxas de resposta entre 15 e 30% através de muitos tumores sólidos (por exemplo vesical, cabeça e pescoço, pulmonar) (Hoos, A. *Nat. Rev. Drug Disc.* 15(4): 235-47. (2016)). Os dados clínicos emergentes usando anticorpos PD-1 ou PD-L1 em combinação com outros agentes tem mostrado sinais de atividade aumentada em alguns cenários, entretanto com toxicidade substancial adicionada em alguns casos (Larkin, J. *et al.* *N Engl J Med.* 373: 23-34. (2015); Forde P.M., *et al.* *New England Journal of Medicine* (2018); Xu, X. *et al.* *Int. J Cancer.* 142: 2344-2354 (2018)). Diversos biomarcadores preditivos têm mostrado mecanismo de resposta e resistência ao tratamento anti-PD-1 e sustentam a base lógica para combinações (Gibney G. T. *et al.* *Lancet Oncology* 17(12): 542-551(2016); Tumeq P. C. *et al.* *Nature.* 515 (7528): 568-71. (2014); Taube, T. M. *et al.* *Clin. Cancer Research.* 20 (19): 5064-5074 (2014)). Foi mostrado que a carga mutacional tumoral, é um correlato da geração de neoantígenos que estimulam a expansão do repertório específico de tumor endógeno e está associado com a resposta à terapia anti-PD-1 (Schumacher, T. N. e Schreiber, R. D. *Science* 348: 69-74 (2015)). A clonalidade e o grau de infiltração de célula T em tumores foram recentemente mostrados ser um prognosticador positivo importante para resultados de imunoterapia em câncer (Xu, X. *et al.* *Int. J Cancer.* 142: 2344-2354 (2018)). Nossas verificações demonstram que com o anticorpo substituto de murino, clones de TCR foram expandidos e compartilhados tanto entre sangue quanto tumor. Além disso, H2L5, que induz a proliferação, expansão e infiltração em tumor das células T, pode ser

complementar a outros agentes imunoterapêuticos com mecanismos distintos de ação.

Os resultados descritos no Exemplo 2 foram obtidos usando os seguintes materiais e métodos:

Materiais e Métodos

Anticorpo H2L5 humanizado

[00202] H2L5 é uma variante humanizada do clone mAb de murino 422,2 obtido do laboratório de Daniel Olive, Institut Paoli-Calmettes, INSERM (Marseille, França). O anticorpo de murino foi gerado usando tecnologia de hibridoma padrão pela imunização de camundongos BALB/c intraperitonealmente com ICOS-Fc humano recombinante usando células COS7.

Linhagens de célula e culturas de célula primária

[00203] As linhagens de célula de tumor de murino EMT6 (ATCC# CRL-2755) e CT26 (ATCC# CRL-2638) e linhagens de célula humanas A549 (ATCC# CCL-185) A2058 (ATCC# CRL-11147), HCT116 (ATCC# CCL-247) foram expandidas e congeladas na recepção e usadas em passagem baixa (≤ 10 passagens) para inoculação aos camundongos. Antes do uso *in vivo*, as linhagens de célula foram testadas pela PCR e confirmadas negativas quanto aos patógenos incluindo micoplasma usando o painel CLEAR inclusivo de camundongo/rato (Charles River Research Animal Diagnostic Services).

[00204] Todo o material de paciente foi obtido com o consentimento por escrito informado apropriado de acordo com as diretrizes do GSK human biological sample management (HBSM) e SOP. O sangue integral em tubos de heparina sódica (BD Biosciences) e tecidos de tumor cirurgicamente ressecados de pacientes com câncer foram obtidos da Avaden Biosciences (Seattle) enviados durante a noite por correspondência postal. As células T primárias ou PBMC de doadores humanos saudáveis

foram purificadas a partir do sangue integral coletado em tubos com heparina sódica nas unidades de doação de sangue na GSK com consentimento apropriado e de acordo com as diretrizes da GSK HBSM. As PBMC foram isoladas pela centrifugação de gradiente de densidade através de Histopaque. As células T foram isoladas pela seleção negativa usando o kit Dynabeads® Untouched® Human T Cell (Life Technologies) ou kits de enriquecimento de célula T CD4 ou CD8 humana RosetteSep (StemCell) para ensaio de ligação e funcionais. As células T isoladas foram pré-ativadas com anti-CD3 (clone OKT3, eBioscience) e anti-CD28 (clone CD28,2, eBioscience) ligados à placa durante 48 a 96 horas para suprarregular a expressão de ICOS.

Camundongos, inoculação de tumor e tratamento

[00205] Todos os estudos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da GSK no Care, Welfare and Treatment of Laboratory Animals e foram revisados pelo Institutional Animal Care and Use Committee na GSK ou pelo processo de revisão ética na instituição onde o trabalho foi realizado. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade (Harlan/Envigo) foram utilizados para os estudos *in vivo* em uma instalação AAALAC totalmente reconhecida. 5×10^4 células/camundongo de carcinoma colônico de camundongo CT26 ou 1×10^5 células de tumor de carcinoma mamário de camundongo EMT6 foram inoculados subcutaneamente no flanco direito. Antes do início de tratamento, os camundongos ($n = 10$ /grupo de tratamento) foram randomizado com o pacote de software Study Director (Studylog Systems) quando os tumores atingiram 100 mm^3 a menos que de outro modo especificado. ANOVA foi usado para garantir similaridade entre os grupos ($P > 0,9$). O investigador do estudo foi cego durante a alocação de grupo e avaliou o resultado final para garantir que as distribuições de grupo fossem aceitáveis para o início do estudo ($P > 0,9$).

[00206] Com base na variabilidade interindivíduo nas taxas de crescimento de tumor de 5 estudos separados no modelo singênico CT26, 10 camundongos por grupo foram justificados como o número ideal necessário para observar um efeito de tamanho de aproximadamente 0,8 entre os grupos de controle e tratados com fármaco e para gerar dados estatisticamente significantes.

[00207] Os camundongos carregando tumor receberam o anti-ICOS de camundongo (clone 7E,17G9) em fundos isotípicos diferentes ou H2L5 e/ou anti-PD-1 de camundongo (clone RMP1-14) ou um controle de isótipo em solução salina por intermédio da injeção intraperitoneal duas vezes por semana começando no dia da randomização para um total de 6 doses. A medição de tumor de mais do que 2.000 mm³ para um camundongo individual e/ou desenvolvimento de ulcerações abertas resultaram nos camundongos sendo removido do estudo.

Estudos de ligação

[00208] A afinidade e cinéticas da ligação de H2L5 ao ICOS humano ou de cinomolgo extracelular recombinante rotulado com Fc de coelho (gerado internamente) foram determinadas usando um Biacore[®] T200 (GE Healthcare[®]). Os dados de ligação de ICOS foram ajustados a um modelo de cinética 1:1 usando o software de análise de dados T200. A ligação da superfície celular de H2L5 tanto às células T CD4 e CD8 recém isoladas inativadas quanto CD3/CD28 ativadas foi determinada por intermédio da detecção de FITC de IgG anti-ser humano, de cadeia leve capa (Sigma) ligando ao H2L5 pela citometria de fluxo.

Anticorpos

[00209] Os seguintes anticorpos anti-ser humano foram usados para a análise de citometria de fluxo, CD4 (RPA-T4, BD Biosciences), CD8 (RPA-T8, Biolegend), CD69 (FN50, Biolegend), OX40 (ACT-35, eBioscience), Ki67 (B56, BD Biosciences), ICOS (ISA3, eBioscience). Os

seguintes anticorpos anticamundongo foram usados para a análise de citometria de fluxo: CD3 (145-2C11, BD Biosciences), CD4 (RM4-5, BD Biosciences), CD8 (53-6,7, BD Biosciences), CD25 (PC61, BD Biosciences), CD44 (IM7, Biolegend), CD62L (MEL14, BD Biosciences), FOXP3 (Fjk-16s, eBioscience), ICOS (C398,4a, Biolegend), Ki67 (16A8, Biolegend). A apoptose foi medida usando o kit Annexin V com 7-AAD (Biolegend). Para a análise de citometria de fluxo do modelo de camundongo com PBMC humana os seguintes anticorpos foram usados: CD45 (HI30, BD Biosciences), CD3 (UCHT1, Biolegend), CD4 (SK3, BD Biosciences), CD45RO (UCHL1, Biolegend), CD62L (SK11, BD Biosciences). p-AKT (S473, #4060 e T308, #13038), Akt total (#9272), pGSK3- α (#5558), GSK3- α total (#12456), pS6 (S235/236, #2211 e S240/244, #5364), S6 total (#2317) e pERK (#9101) (todos da Cell Signaling Technology) foram usados para Western Blots.

Ensaio de ADCC

[00210] PBMC integral ou PBMC esgotada em NK foram ativadas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ligados à placa. As células foram incubadas com anticorpos anti-ICOS (H2L5 IgG1, H2L5 IgG4PE e H2L5 Fc-deficiente) ou anticorpos de controle na concentração final de 10 μ g/mL durante 24 horas. As células foram tingidas com anticorpos anti-CD8 e CD4 seguido pela incubação com corante NIR Live/Dead (Invitrogen). As células tingidas foram analisadas pela citometria de fluxo (FACSCanto, BD Biosciences) para medir a morte de célula T com base no tingimento com corante de célula NIR Live/Dead.

[00211] No bioensaio repórter de engrenamento de Fc γ RIIIa (Promega), células T CD4 anti-CD3/CD28 pré-ativadas foram incubadas com os anticorpos anti-ICOS e de controle durante 45 minutos antes da adição de células efetoras Jurkat-Fc γ RIIIA-NFAT-luciferase em uma razão de célula E:T de 6:1. Reagente de luciferase A-GLO foi adicionado a cada

poço depois de 6 horas de tratamento e a intensidade de luminescência medida para determinar o engrenamento entre as células T alvos e as células efectoras em uma leitora de placas Victor (Perkin Elmer). As populações de CD4, CD8 e T_{reg} foram purificadas a partir de cada PBMC de doador pré-ativadas com anti-CD3/CD28 ou células de tumor desagregadas e testadas diretamente *ex vivo* na razão E:T de 6:1 na presença de anticorpos H2L5 IgG1 ou IgG4PE.

Ensaio funcionais

[00212] H2L5 foi testado em ensaios de PBMC humanas em um formato ligado à placa com estimulação de CD3 concorrente usando PBMC recém isoladas ou em um formato solúvel em PBMC pré-estimulada com CD3/CD28 como descrito mais no princípio. Para PBMC de pacientes com câncer, uma etapa de repouso durante a noite foi incluída antes do início do tratamento. 10 µg/mL de pembrolizumab solúvel foram usados nos ensaios *in vitro* para estudar os efeitos de combinação. As concentrações de citocina nos sobrenadantes destes ensaios foram medidos usando kits de detecção de mesoescala (MSD) multiplex humana (Meso Scale Diagnostics) encomendados com antecedência.

[00213] Os monócitos humanos foram isolados do sangue integral de doadores humanos saudáveis, usando MicroBeads CD14 (Miltenyi Biotec) para o ensaio de cultura mista de célula T:monócito. A célula T e monócitos foram igualados por doador. As células T CD3/CD28 pré-estimuladas e monócitos foram misturados na razão 2:1 em meios livres de soro AIM-V e cultivados juntos com dynabeads anti-CD3 (Life Technologies), 100 IU de IL-2 recombinante humana e 100 ng/ml de M-CSF (Peprotech) antes da incubação com H2L5 solúvel ou outros anticorpos de controle a 37°C durante 4 dias. 20 µg/mL de bloco Fc humano (B564220) (BD biosciences) ou mAb anti-CD32 (MCA1075EL, Clone AT10) (AbD serotec) foram usados para testar o papel da reticulação

de Fc γ R.

[00214] Para os ensaios de MLR, monócitos (Lonza, Suíça) foram cultivados em meios LGM-3 (Lonza) suplementados com GM-CSF e IL-4 (Pepro Tech) durante 9 dias para diferenciar em mDCs e TNF α (R&D Systems) por um dia adicional antes de usar no ensaio MLR. A mistura de mDC-célula T (razão 1:10) foi tratada com 10 μ g/mL de H2L5 solúvel deficiente em Fc ou os anticorpos de controle de isótipo cada um na presença de grânulos anti-CD3 em uma razão 1:10 de grânulo para célula (Life Technologies) ou mistura de peptídeo CEFT (0,02 μ g/mL) (JPT Peptide Technologies) durante 4 dias antes de coletar os sobrenadantes para análise de citocina pelo MSD.

[00215] Os tumores primários de paciente foram dissociados usando o dissociador de tecido GentleMACS (Miltenyi Biotec). TIL foram expandidos em meios RPMI suplementados com IL-2 (Baldan *et al.*, 2015) antes de tratar com anti-CD3 mais H2L5. Alternativamente, as células dissociadas de tumor foram diretamente cultivadas *ex vivo* durante até 6 dias a seguir da estimulação com anti-CD3 mais H2L5 com 100 ng/ml de IL-2 adicionados depois de 24 horas.

[00216] Para os ensaios de PBMC testando isótipos H2L5 diferentes, cones de leucócito anonimizados de doadores saudáveis foram obtidos da National Blood Service at Southampton General Hospital, UK e usados dentro de 4 horas. O uso de amostras humanas foi aprovado pelos comitês de ética locais de acordo com a Declaração de Helsinki. As PBMC foram isoladas pela centrifugação de gradiente de densidade (Lymphoprep) e cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies) suplementadas com glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM), penicilina e estreptomicina (100 IU/mL) a 37°C em 5% de CO₂.

[00217] Os ensaios de proliferação foram realizados como anteriormente detalhados (35). Em resumo, PBMC frescas foram rotuladas

com 1 μM de éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) e cultivadas em alta densidade ($1 \times 10^7/\text{mL}$) durante 48 horas antes das estimulações de anticorpo. Para a estimulação de PBMC, as células foram transferidas para dentro de placas de 96 poços de fundo redondo a 1×10^5 por poço e estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OKT3 (ligado à placa) e 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mAbs H2L5 (solúvel). No dia 6, as células foram rotuladas com anti-CD8-e450 (SK-1, eBioscience) e anti-CD4-APC (RPA-T4, Insight Biotechnology) e a proliferação avaliada pela diluição com CFSE em um citômetro de fluxo FACSCantoII (BD Biosciences). Os resultados são expressos como % de células divididas comparadas com as células não estimuladas. A depleção de NK foi realizada usando microgrânulos CD56 (Miltenyi Biotec) de acordo com as instruções do fabricante após 48 horas de cultura de alta densidade (Hussain *et al.* Blood 2014).

Estudos de imunofluorescência

[00218] As células T não estimuladas e CD3/CD28 estimuladas foram bloqueadas com Fc com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bloco Fc humano (B564220) (BD biosciences) ou mAb anti-CD32 (MCA1075EL, Clone AT10) (AbD serotec) para testar o papel da reticulação com $\text{Fc}\gamma\text{R}$ e depois tratadas com 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo rotulado frio (anti-ICOS ou controle de isótipo IgG4PE) em gelo durante 1 hora. As células foram lavadas em tampão frio e transferidas a 37°C durante vários tempos (0, 5, 15, 30 minutos e 1 hora) para permitir o tráfico de proteína antes de fixar com 4% de paraformaldeído (Sigma) recém preparados. Amostras 1 ou 2 horas depois do pulso inicial a 37°C foram repulsadas com anti-ICOS rotulado com Alexa Fluor 647 durante 30 minutos a 37°C , lavadas e fixadas em paraformaldeído. As células foram transferidas para lamínulas revestidas com Poli-L-lisina durante 15 minutos e depois mantadas em lâminas em ProLong Gold com DAPI (Invitrogen). A análise das amostras foi realizada usando um microscópio ZEISS LSM510 Meta Confocal com uma lente de

imersão em óleo 63X.

Expressão de gene de célula T humana

[00219] Sangue integral foi obtido de doadores voluntários saudáveis (n = 6) na Unidade de Doação de Sangue no local da GSK e as células T foram purificadas usando RosetteSep[®] Human T-Cell Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies) como descrito acima. As células foram recolocadas em suspensão (5×10^6 células/mL) em meio de cultura AIM-V (Gibco) e incubadas em placas de 96 poços (Falcon) que foram sequencialmente pré-revestidas com 0,6 µg/mL de mAb CD3 anti-ser humano de camundongo (eBioscience) e 10 µg/mL de ICOS anti-ser humano ou mAbs de controle de isótipo correspondentes –IgG2 α κ de camundongo (eBioscience) e IgG4PE. Depois de 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células foram pelotizadas, colocadas em suspensão em tampão RLT (Qiagen) e armazenadas a -80°C para isolamento de RNA. O RNA total foi extraído usando o Kit RNeasy Mini QIAcube (Qiagen). Os níveis de expressão de RNA foram determinados pelo NanoString nCounter Analysis System. 50 ng de RNA foi usado em cada reação para a assinatura de gene usando NanoString Human PanCancer Immune profiling CodeSet de acordo com as instruções do fabricante. Os dados brutos foram normalizados usando controles positivos embutidos e genes de manutenção (nCounter Expression Data Analysis Guide, NanoString). ArrayStudio (OmicSoft) e GraphPad Prism (GraphPad Software) foram usados para a análise adicional e gráficos.

Ensaio de competição de ICOS/ICOS-L

[00220] Placas MSD foram incubadas durante a noite a 4°C com 10 µg/mL de proteína ICOS recombinante (R&D Systems) diluídos em PBS. As placas foram lavadas e bloqueadas antes da adição de controle de isótipo ou H2L5 em uma curva de dose de 7 pontos. Depois da incubação durante a noite e lavagens, as placas foram incubadas com 1 µg/mL de

ligante de ICOS humano (B7-H2) (R&D Systems) seguido pela incubação com 10 µg/mL de ligante de anticorpo ICOS anti-ser humano biotilado (B7-H2) (R&D Systems). Estreptavidina sulforrotulada a 10 µg/mL em Diluente 100 foi usada para a detecção do ligante biotilado. As placas foram lidas imediatamente a seguir da adição de tampão de Leitura MSD em um MSD MESO Quick Plex SQ 120 e os dados analisados no software MSD workbench. A citometria de fluxo também foi usada para investigar a competição entre ICOS de superfície celular expressos pelas células T anti-CD3/CD28 ativadas e ICOS-L pela H2L5. As células T ativadas foram incubadas com concentrações diferentes de ICOS-L recombinante e depois incubadas com H2L5 e o MFI das células ICOS CD4+ e ICOS CD8+ determinado.

Modelo de Camundongo com PBMC Humana

[00221] Camundongos NOD/SCID/IL-2R γ nulos adultos imunodeficientes (NSG) (Jackson Labs) foram injetados com PBMC humana (20×10^6 por camundongo) pela injeção intravenosa via a veia da cauda. Os camundongos foram implantados com linhagens de célula de tumor humana A2058, A549, HCT116 (1×10^6) 1 a 3 dias após a injeção de PBMC humana; camundongos foram administrados com controle de isótipo ou anticorpos ICOS anti-humanos nas doses variando de 0,004 mg/kg a 1,2 mg/kg pela injeção intraperitoneal duas vezes por semana durante 3 semanas. Os camundongos carregando tumor receberam os anticorpos anti-ICOS de camundongo (clone 7E,17G9) em fundos de isótipo diferentes ou H2L5 e/ou Pembrolizumab (Merck; NDC#0006-3026-02) ou controles de isótipo em solução salina via injeção intraperitoneal duas vezes por semana começando no dia da randomização durante um total de 6 doses. As medições de tumor de mais do que 2.000 mm³ para um camundongo individual e/ou desenvolvimento de ulcerações abertas resultaram nos camundongos sendo removidos do estudo.

[00222] Os baços e sangue integral foram coletados após a eutanização em 24 horas após a 2^a ou 4^a dose de anticorpos. Esplenócitos foram isolados pela dissociação mecânica seguida pela lise de RBC com tampão de lise LCK (Lonza) e tingimento de anticorpo ao passo que o sangue integral foi tingido com os anticorpos apropriados antes da lise de RBC com FACSlyse (BD Biosciences). Todas as amostras foram avaliadas pela citometria de fluxo no FACScanto (BD) como descrito abaixo.

Western Blotting

[00223] As células T ativadas foram tratadas com H2L5 ou um controle de isótipo durante até 48 horas. As células T CD4⁺ foram pré-estimuladas com CD3/CD28 Dynabeads[®] (ThermoFisher) em uma razão de célula para grânulo de 1:20 durante 48 horas, deixadas repousar na ausência de estimulação durante 24 horas e depois tratadas com anticorpo de controle de isótipo ou H2L5 (10 µg/mL) na presença de anticorpo anti-CD3 ligado à placa. As células foram lisadas com tampão de lise de célula (Cell Signaling Technologies) contendo inibidores de protease e fosfatase (Roche). 25 a 30 µg de proteína foram conduzidos em 4 a 12% de géis Bis-Tris (Invitrogen) e transferidos sobre membranas de nitrocelulose (Invitrogen). As membranas foram bloqueadas usando Tampão de Bloqueio LI-COR Odyssey e subsequentemente imunomanchados usando os anticorpos primários e secundários e escaneados em um sistema de imageamento LI-COR Odyssey.

Análise de FACS

[00224] A ligação não específica sobre as células T ativadas foi bloqueada pela incubação com bloco Fc de ser humano ou camundongo (Miltenyi Biotec) como apropriado antes da incubação com anticorpos de detecção para marcadores de superfície celular conjugados com fluoróforos diferentes em gelo durante 30 minutos. Para o tingimento intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas usando o conjunto Transcription

Factor Buffer (BD biosciences). Depois da compensação, os dados foram adquiridos em FACS Canto II ou Fortessa (BD biosciences) e analisados com o software FACSDiva (BD) ou Flowjo (Treestar).

Imunohistoquímica

[00225] A detecção pela imunohistoquímica de ICOS em câncer pulmonar de célula não pequena (NSCLC), câncer mamário (BrCA) TNBrCa e câncer colorretal (CRC), foi realizada usando um mAb CD278 anti-ser humano de coelho (clone SP98; Spring Biosciences) on um Leica Bond RX com reagentes de plataforma associados. DAB (3,3'-diaminobenzidina) foi usado para a detecção alvo. Seções foram contratingidas com Hematoxilina (Todas as barras de escala = 20 μ m).

[00226] A plataforma Clariant MultiOmyx (Neogenomics, Califórnia), um ensaio de imunofluorescência multiplexado (SE) foi usado para avaliar a expressão de ICOS, PD-1, CD3, CD4 e CD8 entre outros marcadores de célula T nos tecidos de tumor FFPE obtidos de fornecedores aprovados pelo grupo GSK HBS como descrito acima. O processo iterativo incluiu uma rodada de tingimento com um anticorpo conjugado a Cy3 e Cy5 cada um e imageamento, seguido pela inativação do corante, imageamento de fundo de fluorescência e subtração do fundo antes de repetir este ciclo para todos os marcadores no painel.

Análise estatística

[00227] Testes de ANOVA de uma via ou t de Student foram usados como especificado na legenda da figura. Os dados foram analisados com o software GraphPad Prism (GraphPad) e os valores p de $<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,005$; **** $P < 0,0001$).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar câncer em um paciente em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao ICOS humano e uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano sequencialmente, em que a administração do agente direcionado ao ICOS humano é seguido pela administração do agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao ICOS humano é um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS é um agonista de ICOS.

4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS compreende um domínio V_H compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO:7; e um domínio V_L compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácido como apresentada na SEQ ID NO:8.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS compreende um domínio V_H compreendendo a sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO:7 e um domínio V_L compreendendo a sequência de aminoácido como apresentada na SEQ ID NO:8.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao PD1 humano é um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado

pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é um antagonista de PD1.

8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é pembrolizumab.

9. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é nivolumab.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao PD-L1 humano é um anticorpo anti-PD-L1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD-L1 é um antagonista de PD1.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao ICOS humano ou anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao PD1 humano ou PD-L1 humano ou anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo anti-PD-L1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é administrado uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal (CRC), gástrico, esofágico, cervical, vesical, mamário, da cabeça e pescoço, ovariano, melanoma, carcinoma de célula renal (RCC), célula escamosa EC, carcinoma pulmonar de célula não pequena, mesotelioma, câncer pancreático e prostático.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 14, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao ICOS humano ou anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo, é administrado como uma infusão intravenosa (IV).

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 33, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao PD1 humano ou PDL1 humano ou anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, é administrado como uma infusão intravenosa (IV).

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o início de administração do agente direcionado ao PD1 humano ou PDL1 humano ou anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, é iniciado em um ponto de tempo selecionado dentre 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas depois do início da administração do agente direcionado ao ICOS humano ou anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o agente direcionado ao ICOS humano ou o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e o agente direcionado ao PD1 humano ou PDL1 humano ou o anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo ou o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, são administrados ao dito ser humano até que o dito ser humano mostre progressão da doença ou toxicidade inaceitável.

19. Anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para uso sequencial no tratamento de câncer em um ser humano em necessidade do mesmo, em que a administração do anticorpo anti-ICOS é seguida pela administração do

anticorpo anti-PD1.

20. Anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para uso sequencial no tratamento de câncer em um ser humano em necessidade do mesmo, em que a administração do anticorpo anti-ICOS é seguida pela administração do anticorpo anti-PD-L1.

21. Anticorpo anti-PD1 ou anticorpo anti-PD-L1 de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 ou anticorpo anti-PD-L1 é um antagonista de PD-1.

22. Anticorpo anti-PD1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 e 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é pembrolizumab.

23. Anticorpo anti-PD1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 e 21, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 é nivolumab.

24. Anticorpo anti-ICOS de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS é um anticorpo agonista direcionado a ICOS.

25. Anticorpo anti-ICOS de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS compreende um domínio V_H compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO:7; e um domínio V_L compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácido como apresentada na SEQ ID NO:8.

26. Anticorpo anti-ICOS de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS compreende um domínio VH compreendendo a sequência de

aminoácido apresentada na SEQ ID NO:7 e um domínio V_L compreendendo a sequência de aminoácido como apresentada na SEQ ID NO:8.

27. Anticorpo anti-ICOS de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 26 19 a 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-ICOS é administrado uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas.

28. Anticorpo anti-PD1 ou um anticorpo anti-PD-L1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-PD1 ou anticorpo anti-PD-L1 é administrado uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas.

29. Anticorpo anti-ICOS e anticorpo anti-PD1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 e 21 a 28 ou um anticorpo anti-ICOS e anticorpo anti-PD-L1 de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 29, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal (CRC), gástrico, esofágico, cervical, vesical, mamário, da cabeça e pescoço, ovariano, melanoma, carcinoma de célula renal (RCC), célula escamosa EC, carcinoma pulmonar de célula não pequena, mesotelioma, câncer pancreático e prostático.

30. Uso de um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, em que o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo são sequencialmente administrados e em que a administração do anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é seguida pela administração do anticorpo anti-PD1 ou

porção de ligação a antígeno do mesmo.

31. Uso de um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, em que o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo são sequencialmente administrados e em que a administração do anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é seguida pela administração do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

32. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é sequencialmente administrado a um paciente com câncer com um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo e em que a administração do anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é seguido pela administração do anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

33. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é sequencialmente administrado a um paciente com câncer com um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo e em que a administração do anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é seguido pela administração do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

34. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é

sequencialmente administrado a um paciente com câncer com um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e em que a administração do anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é seguida pela administração do anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

35. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo é sequencialmente administrado a um paciente com câncer com um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo e em que a administração do anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo é seguida pela administração do anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

36. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 32 a 35.

37. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido na reivindicação 36.

38. Método para fabricar um anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o método compreende a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo como definido na reivindicação 32 ou 33 sob condições adequadas para expressar o anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo; e b) isolar o dito anticorpo anti-ICOS ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

39. Método para fabricar um anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o método compreende a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo como definido na reivindicação 34 sob condições

adequadas para expressar o anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo; e b) isolar o dito anticorpo anti-PD1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

40. Método para fabricar um anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o método compreende a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo o polinucleotídeo como definido na reivindicação 35 sob condições adequadas para expressar o anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo; e b) isolar o dito anticorpo anti-PDL1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

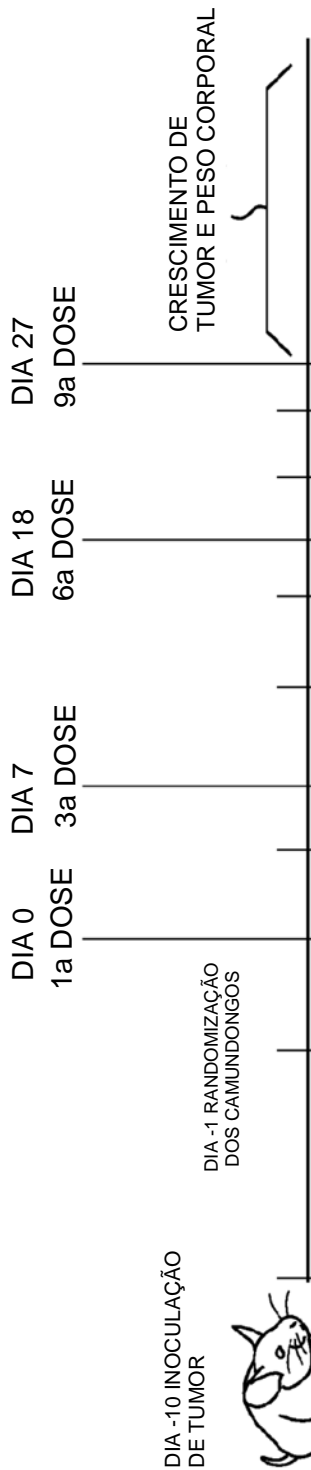
PLANEJAMENTO DE ESTUDO

GRUPO	TRATAMENTO	Nº TOTAL DE CAMUNDONGOS	DOSAGEM CONCORRENTE VS EM FASES
1	SOLUÇÃO SALINA	10	3 DOSES
2	IgG2b de rato 100ug + IgG2a de rato 200ug	10	3 DOSES
3	PD1 - 200ug + IgG2b de rato 100ug	10	3 DOSES
4	ICOS 100ug + IgG2a de rato 200ug	10	3 DOSES
5	ICOS 10ug + IgG2a de rato 200ug	10	3 DOSES
6	PD1 - 200ug + ICOS 100ug	10	3 DOSES
7	PD1 - 200ug + ICOS 10ug	10	3 DOSES
8	PD1 - 200ug (APRESENTAÇÃO DE 3 DOSES) + IgG2b de rato 100ug	10	Em fases; PD1 apresentação de 3 doses → IgG2b de rato 3 DOSES + PD1 3 DOSES
9	PD1 - 200ug (APRESENTAÇÃO DE 3 DOSES) + ICOS 100ug	10	Em fases; PD1 3 doses → ICOS 3 DOSES + PD1 3 DOSES
10	RAT IgG2a 200ug (APRESENTAÇÃO DE 3 DOSES) + ICOS 100ug	10	Em fases; IgG2A de rato 3 DOSES → ICOS 3 DOSES + PD1 3 DOSES
11	ICOS - 100ug (APRESENTAÇÃO DE 3 DOSES) + IgG2a de rato 200ug	10	Em fases; ICOS apresentação de 3 doses → IgG2a de rato 6 DOSES
12	ICOS - 100ug (APRESENTAÇÃO DE 3 DOSES) + PD1 200ug	10	Em fases; ICOS 3 doses → PD1 6 DOSES
13	RAT IgG2b - 100ug (APRESENTAÇÃO DE 3 DOSES) + PD1 200ug	10	Em fases; IgG2b de rato 3 DOSES → + PD1 6 DOSES

FIG. 1

PROCEDIMENTO DE ESTUDO

- CAMUNDONGOS: BALB/C FÊMEAS, 10 CAMUNDONGOS/GRUPO
- LINHAGEM DE TUMOR: CT26



ANTICORPO	CLONE	FORNECEDOR	Nº CAT
IgG2a DE RATO	2A3	BIOXCELL	BE0089
PD1 ANTICAMUNDONGO DE RATO	RMP1-14	BIOXCELL	BE00146
IgG2b DE RATO	LTF2	BIOXCELL	BE0090
ICOS ANTICAMUNDONGO DE RATO	7E.17G9	BIOXCELL	BE0059

FIG. 2

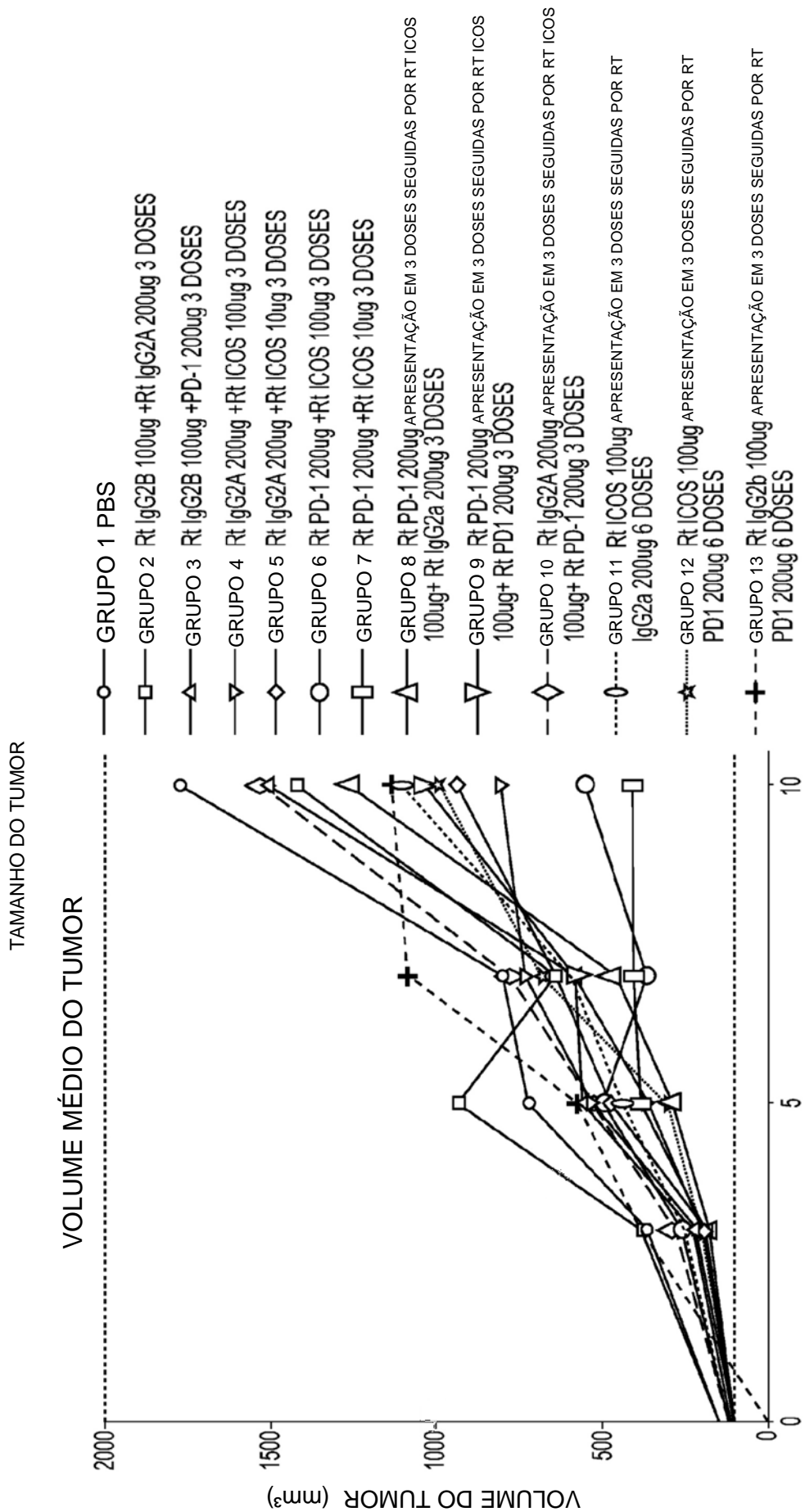


FIG. 3

TAMANHO DO TUMOR - DOSAGEM CONCORRENTE

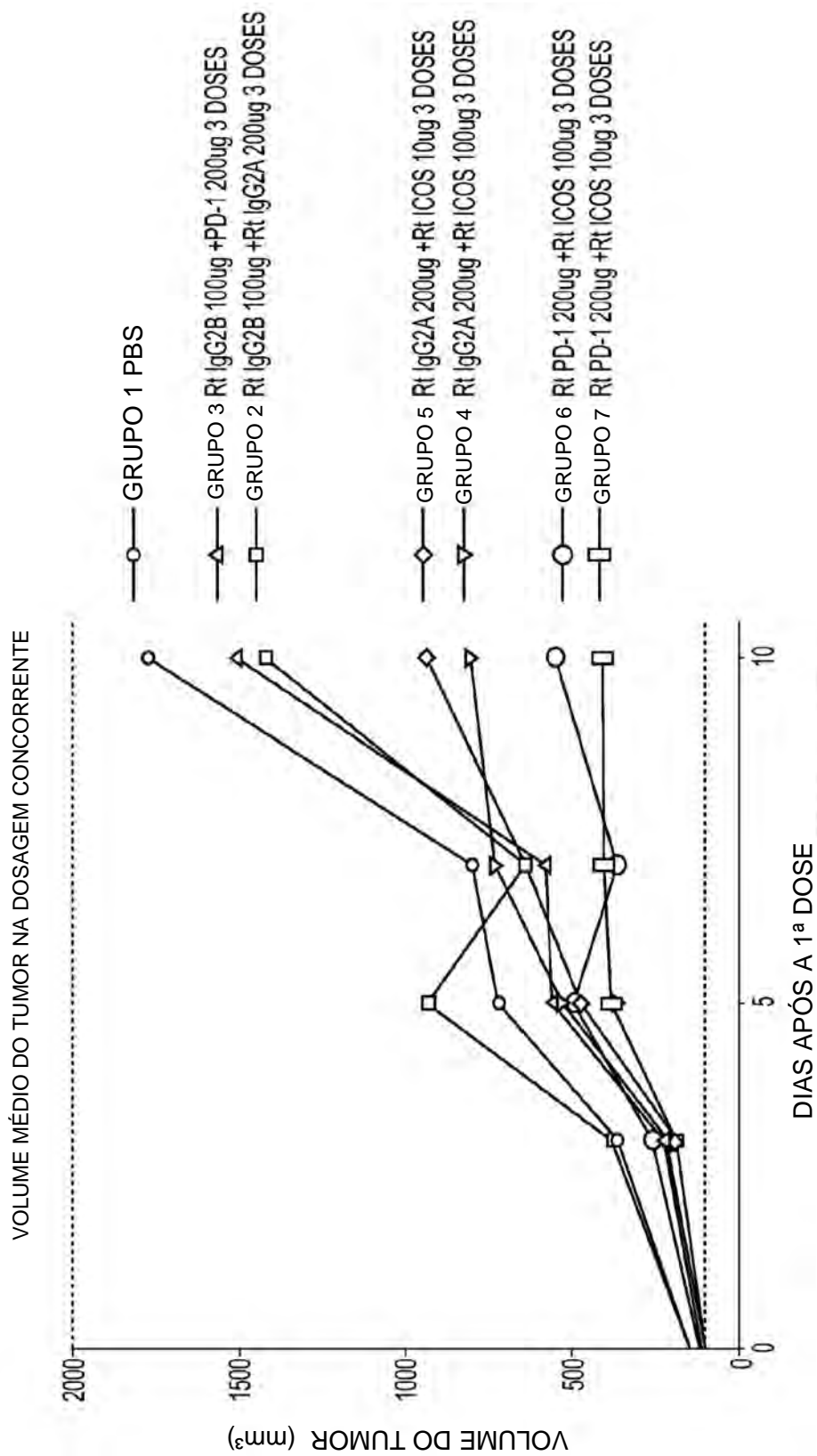
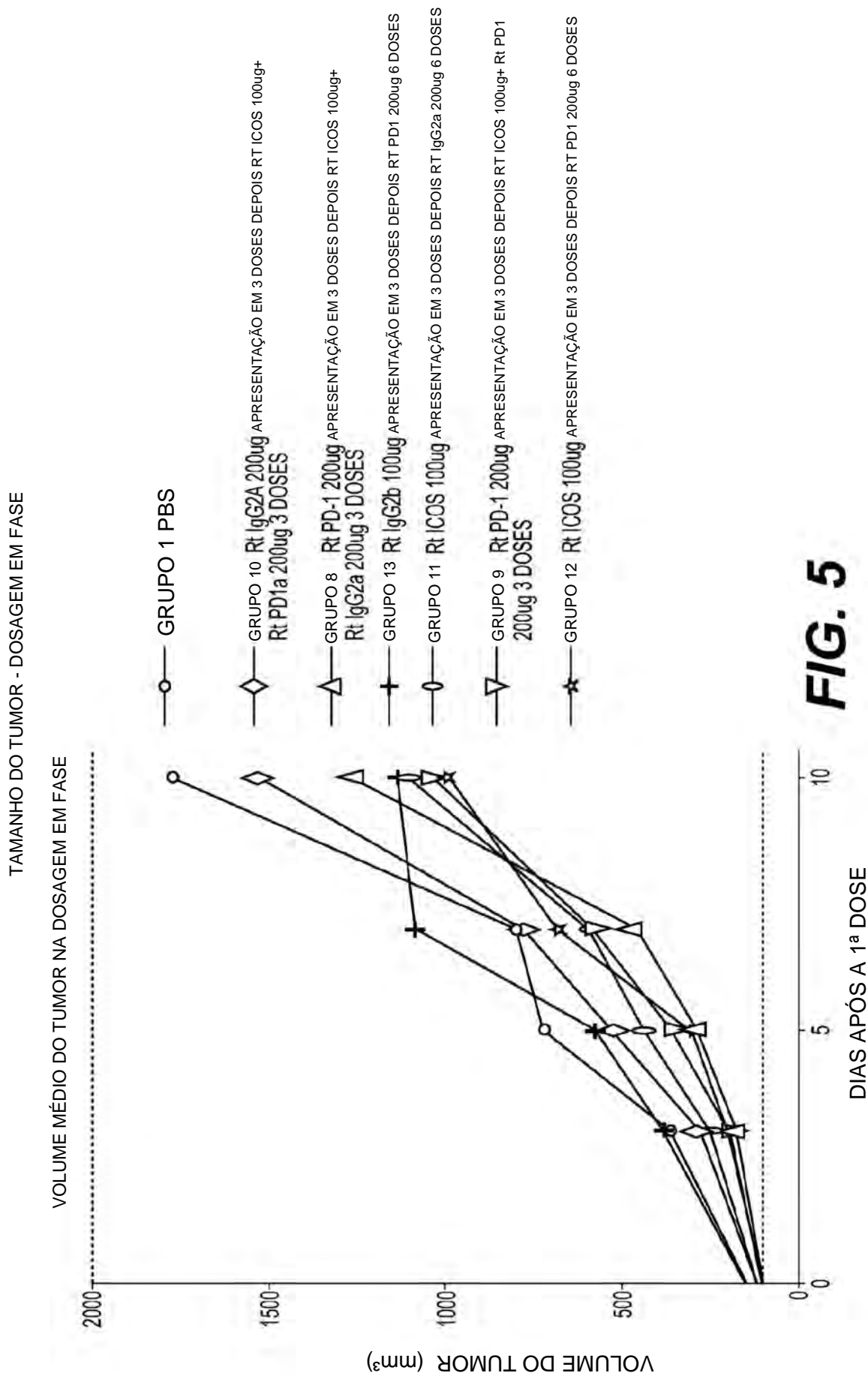
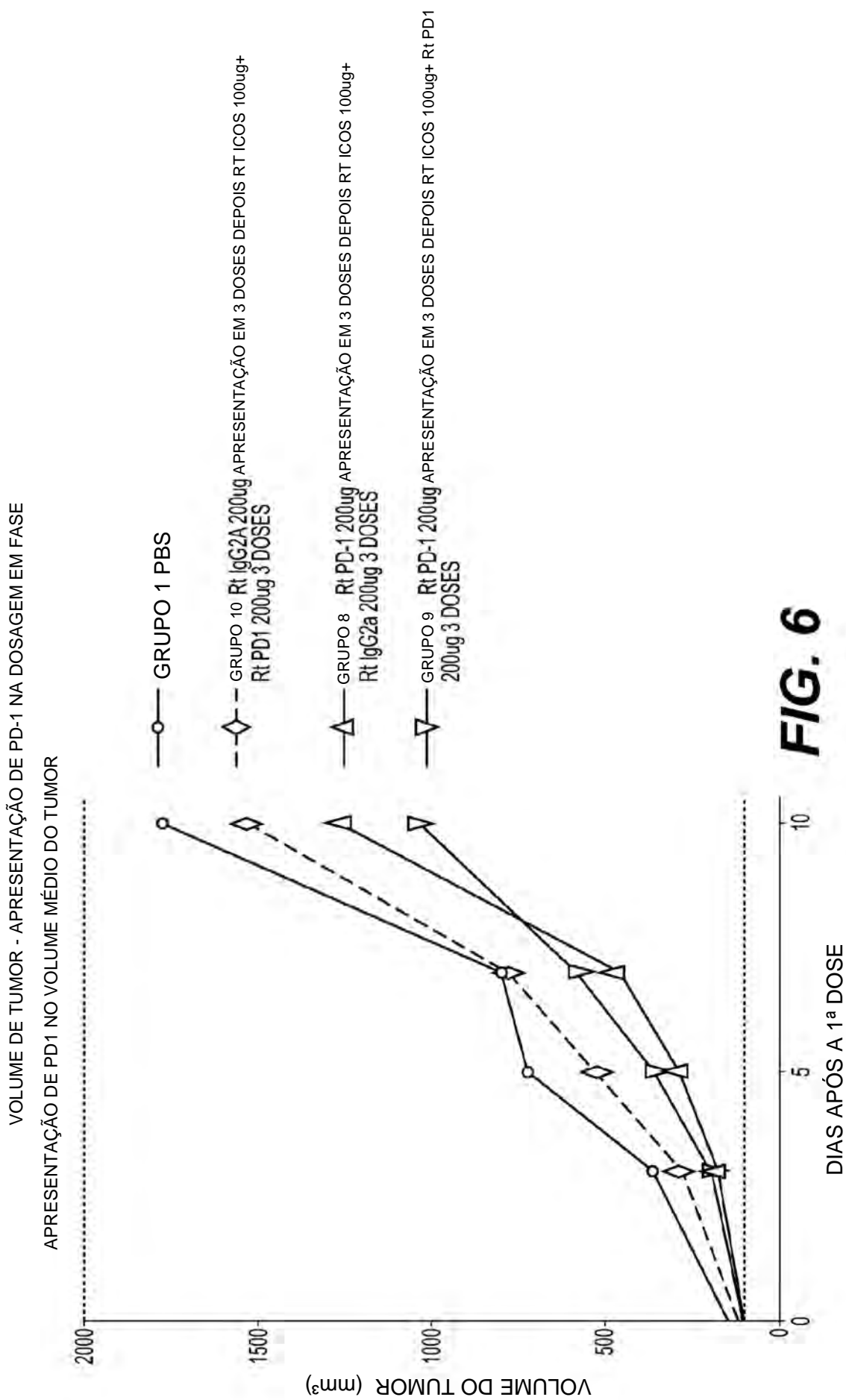


FIG. 4





VOLUME DE TUMOR - APRESENTAÇÃO DE ICOS NA DOSAGEM EM FASE

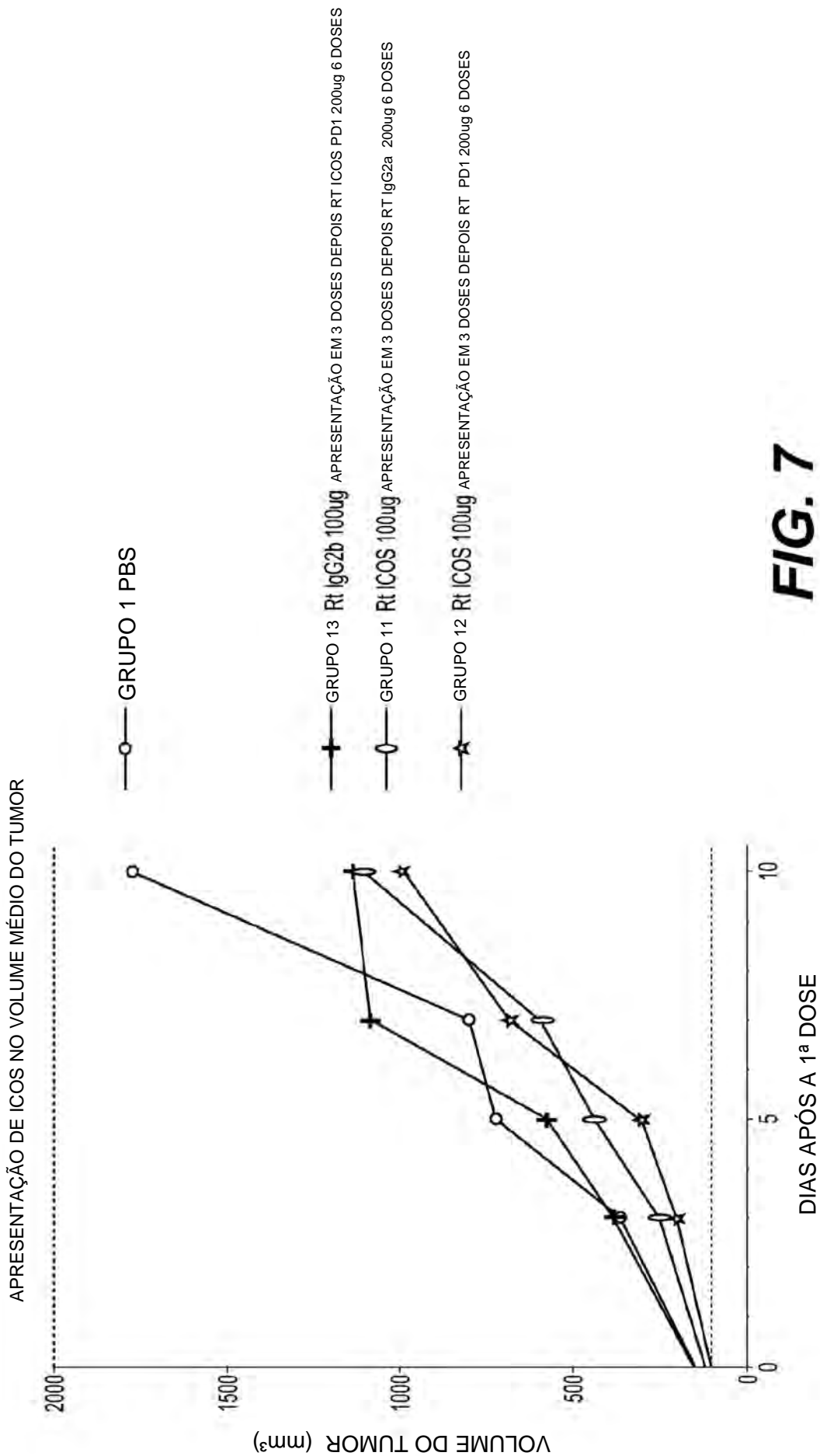


FIG. 7

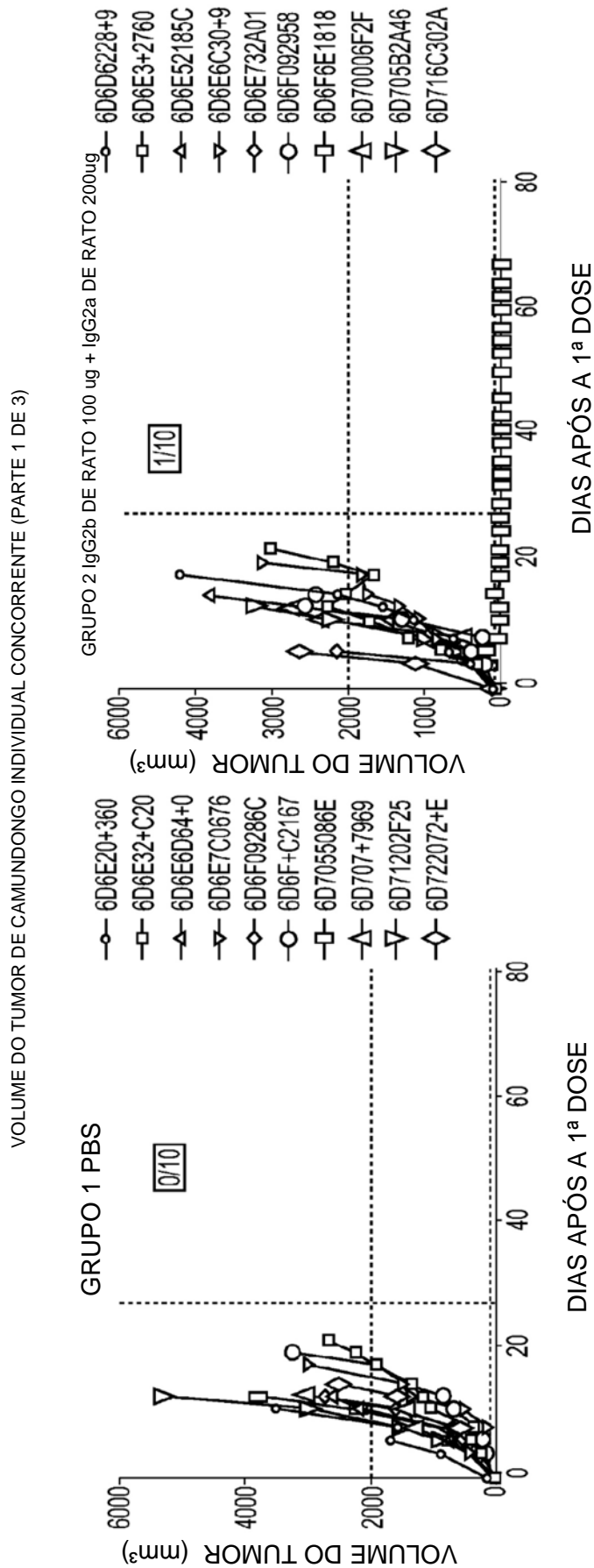


FIG. 8A

VOLUME DO TUMOR DE CAMUNDONGO INDIVIDUAL - CONCORRENTE (PARTE 2 DE 3)

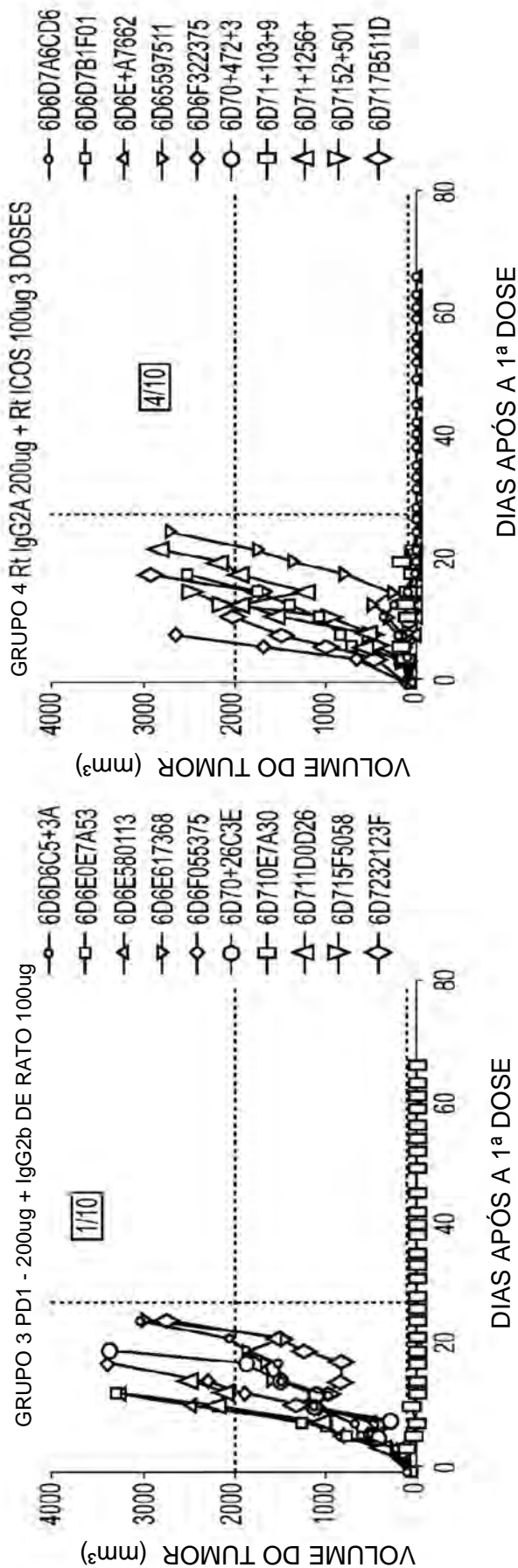


FIG. 8B

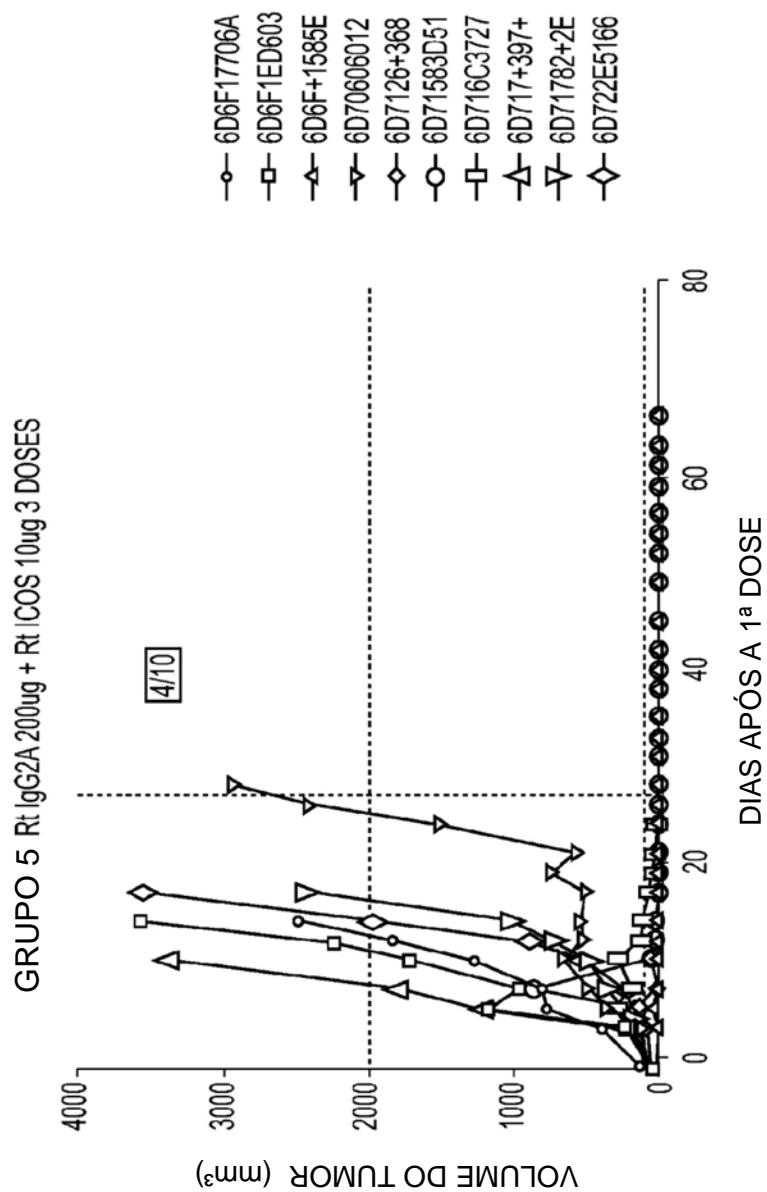


FIG. 8B CONT.

VOLUME DO TUMOR DE CAMUNDONGO INDIVIDUAL - CONCORRENTE (PARTE 3 DE 3)

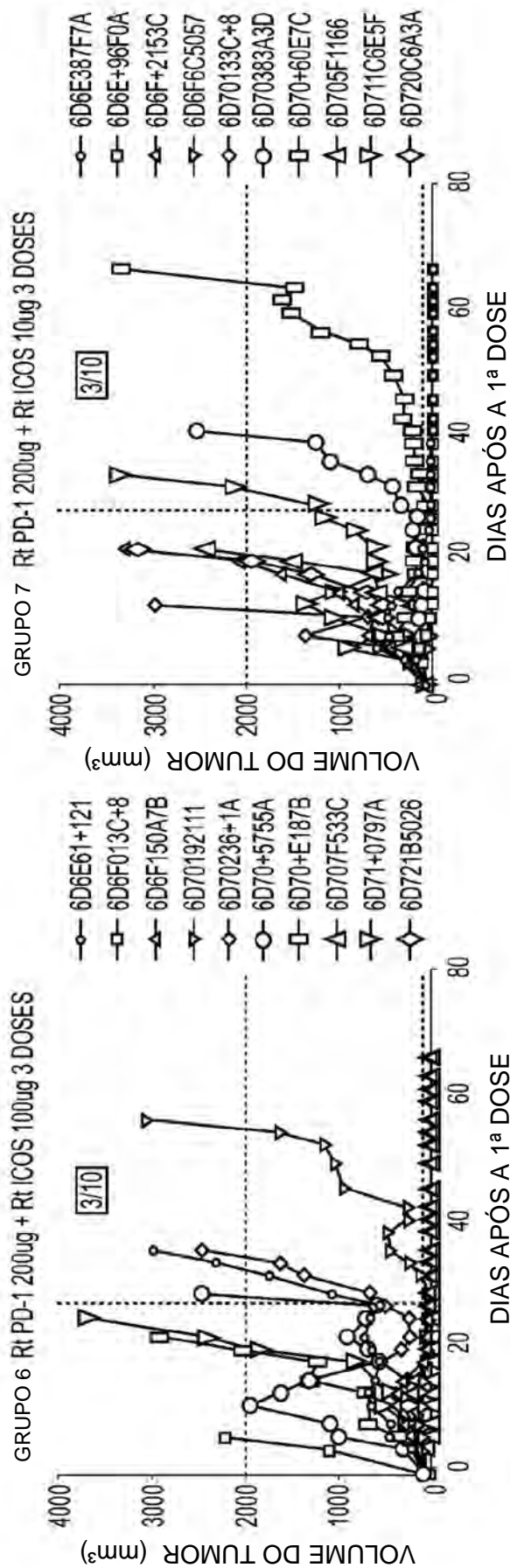


FIG. 8C

VOLUME DO TUMOR DE CAMUNDONGO INDIVIDUAL - EM FASES (PARTE 1 DE 3)

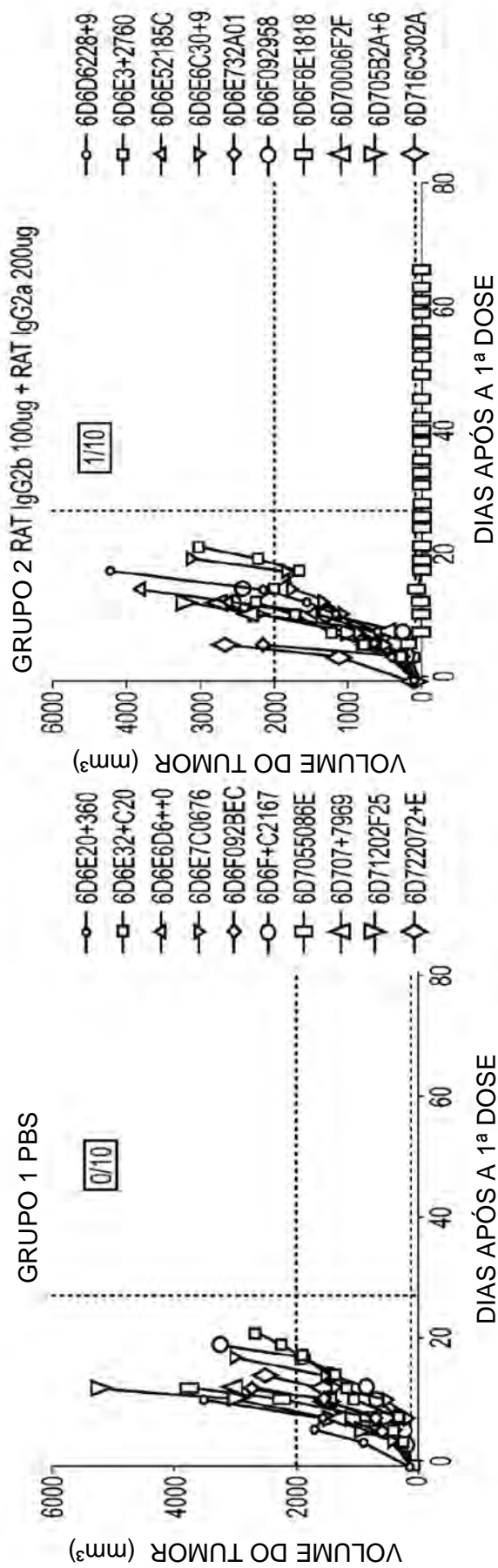


FIG. 9A

VOLUME DO TUMOR DE CAMUNDONGO INDIVIDUAL-EM FASES (PARTE 2 DE 3)

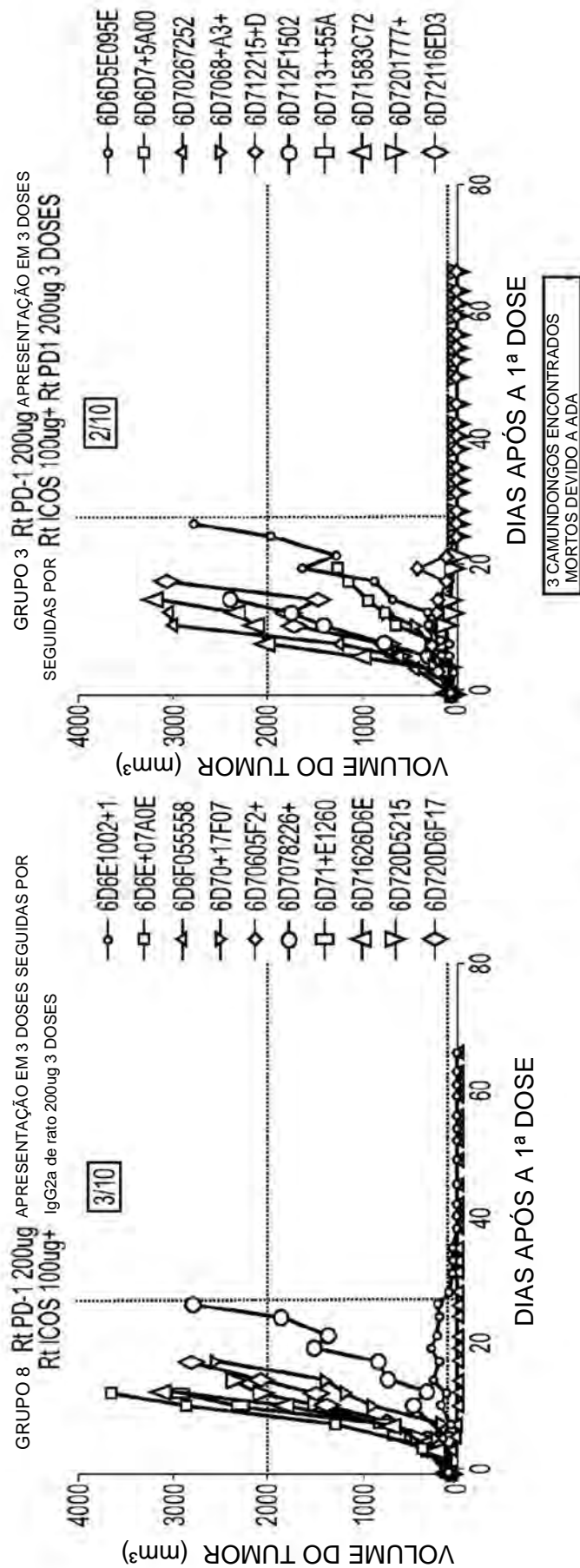


FIG. 9B

GRUPO 10 IgG2a DE RATO 200ug
 APRESENTAÇÃO EM 3 DOSES SEGUIDAS
 POR Rt ICOS 100ug+ Rt IgG2a 200ug 3 DOSES

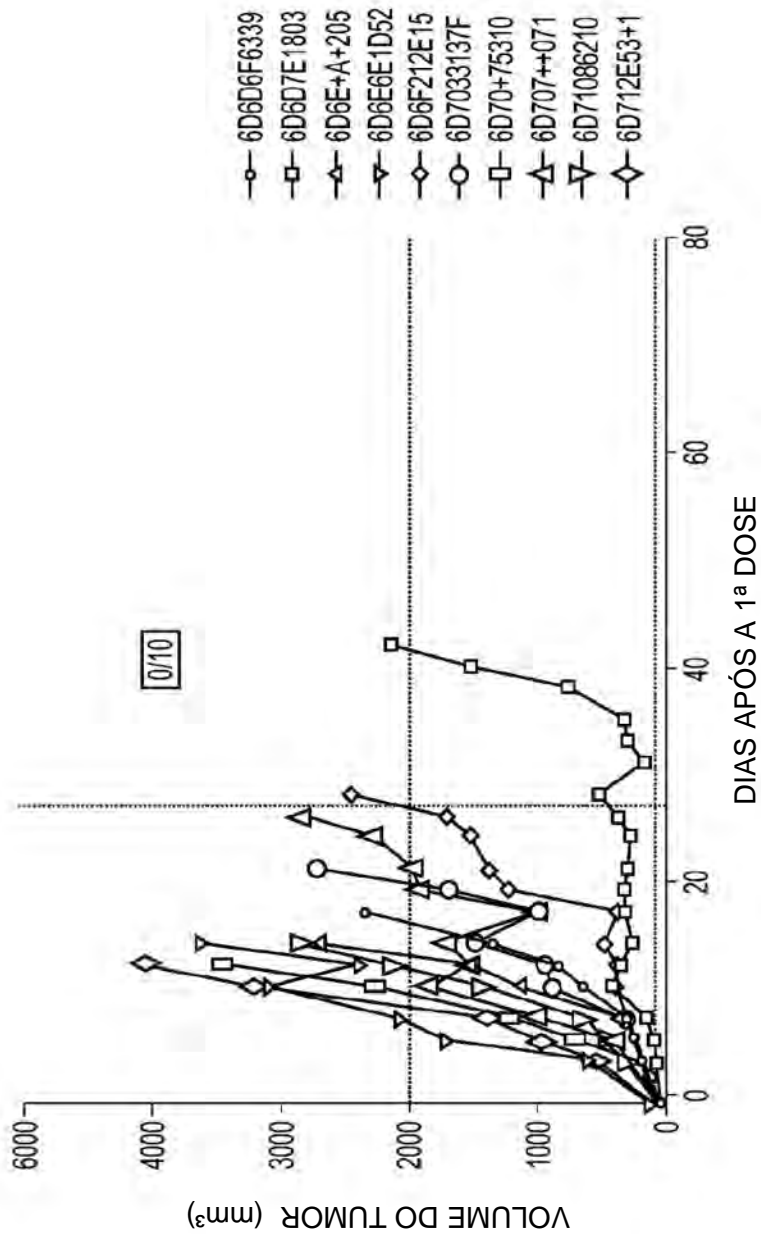


FIG. 9B CONT.

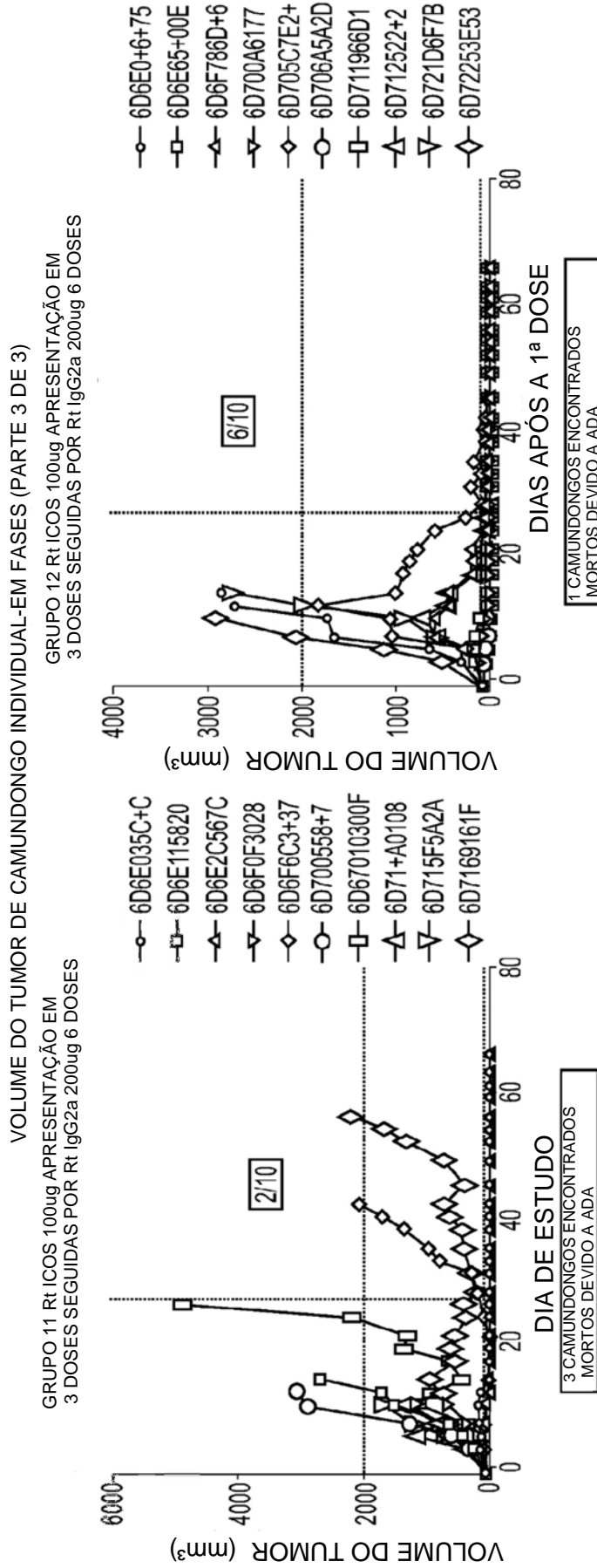


FIG. 9C

GRUPO 13 Rt IgG2b 100ug APRESENTAÇÃO EM
3 DOSES SEGUIDAS POR Rt PD1 200ug 6 DOSES

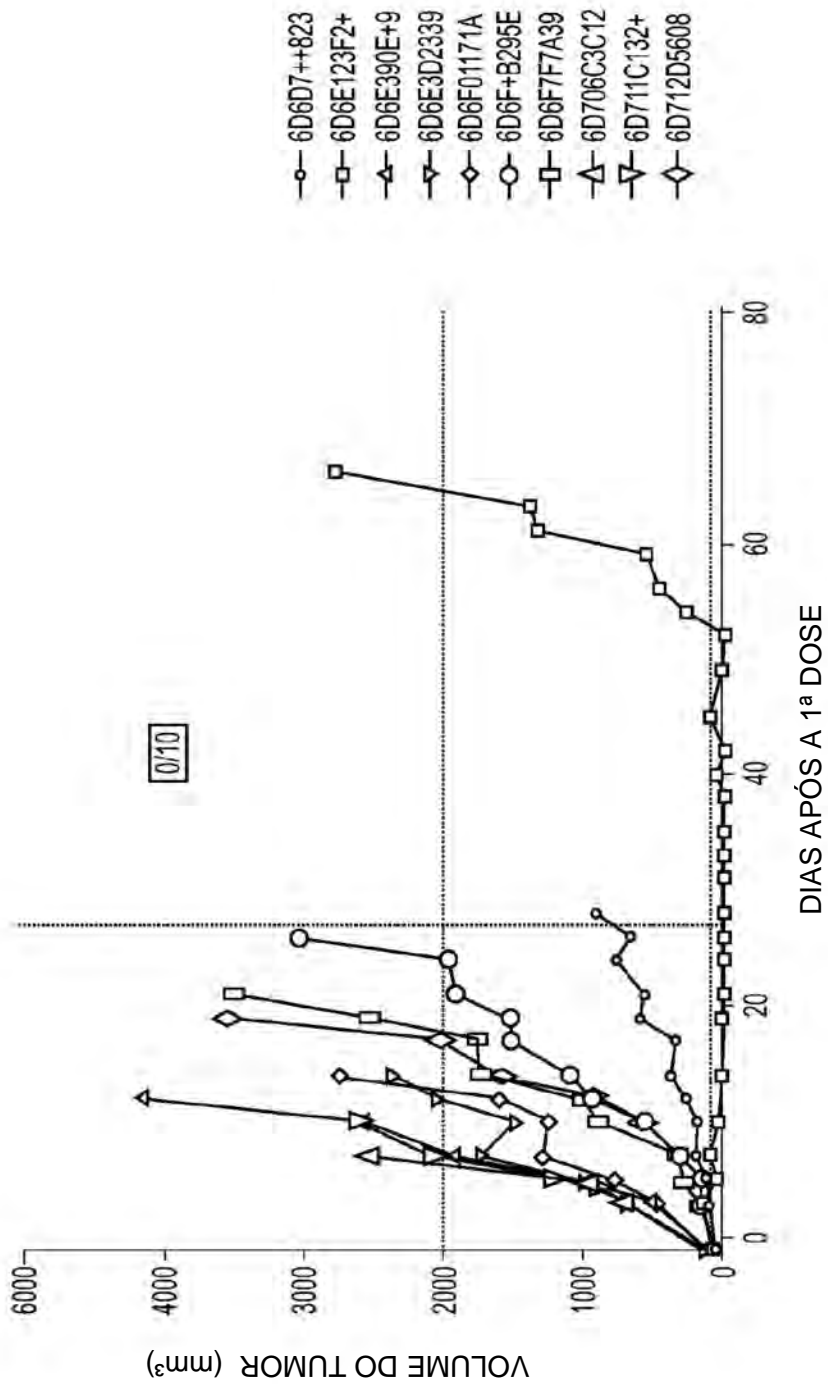


FIG. 9C CONT.

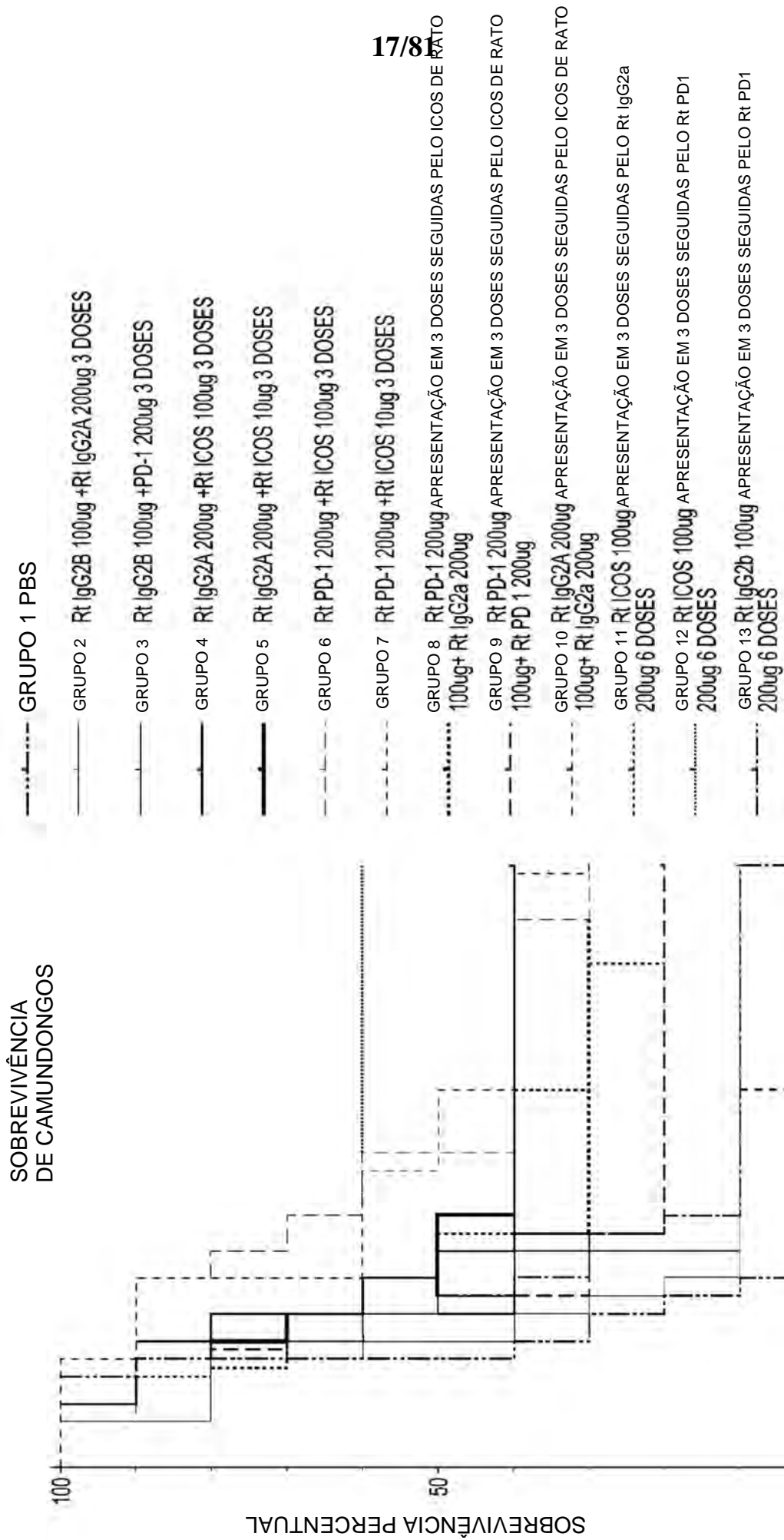


FIG. 10

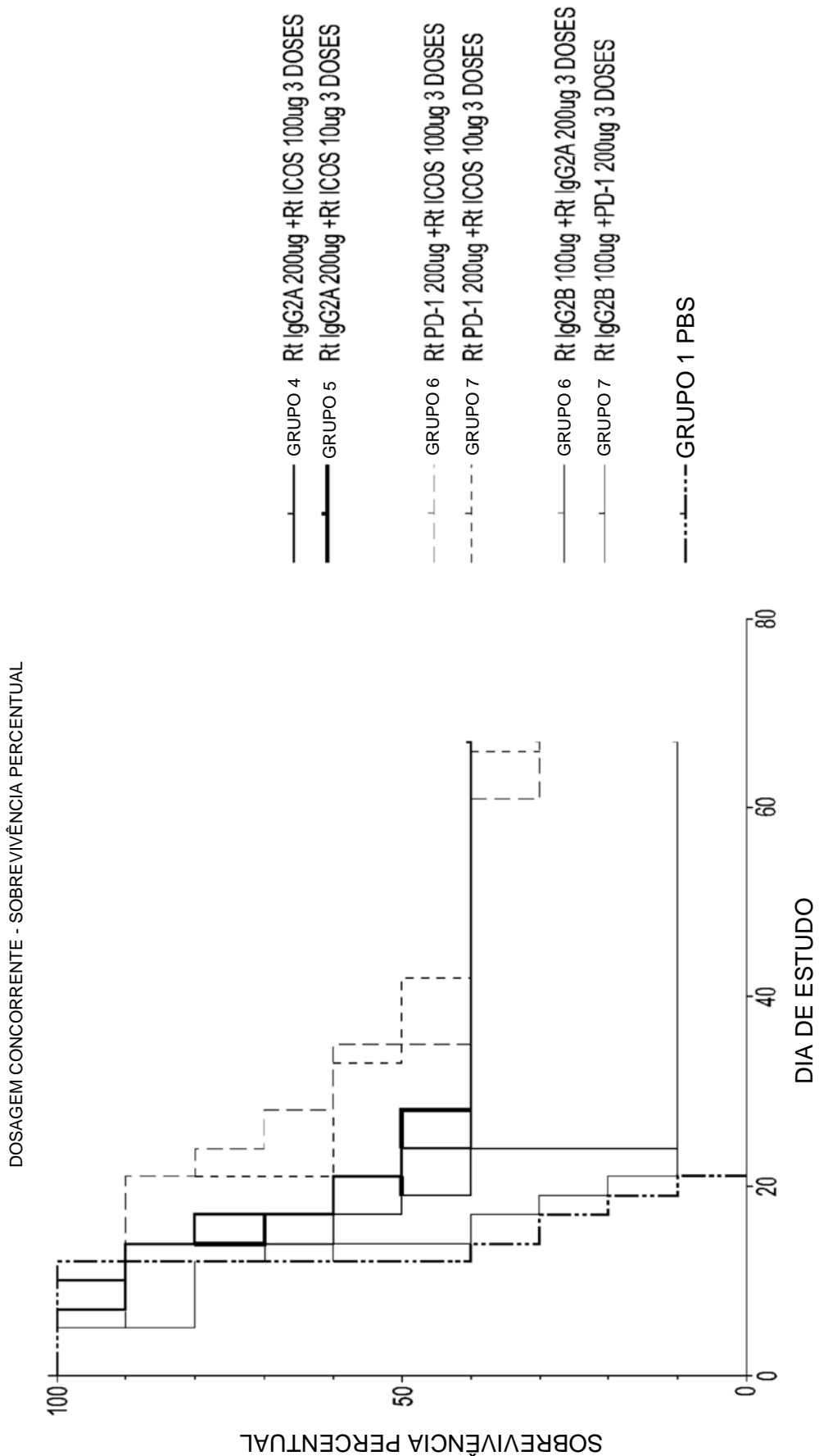


FIG. 11

SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS - DOSAGEM EM FASES

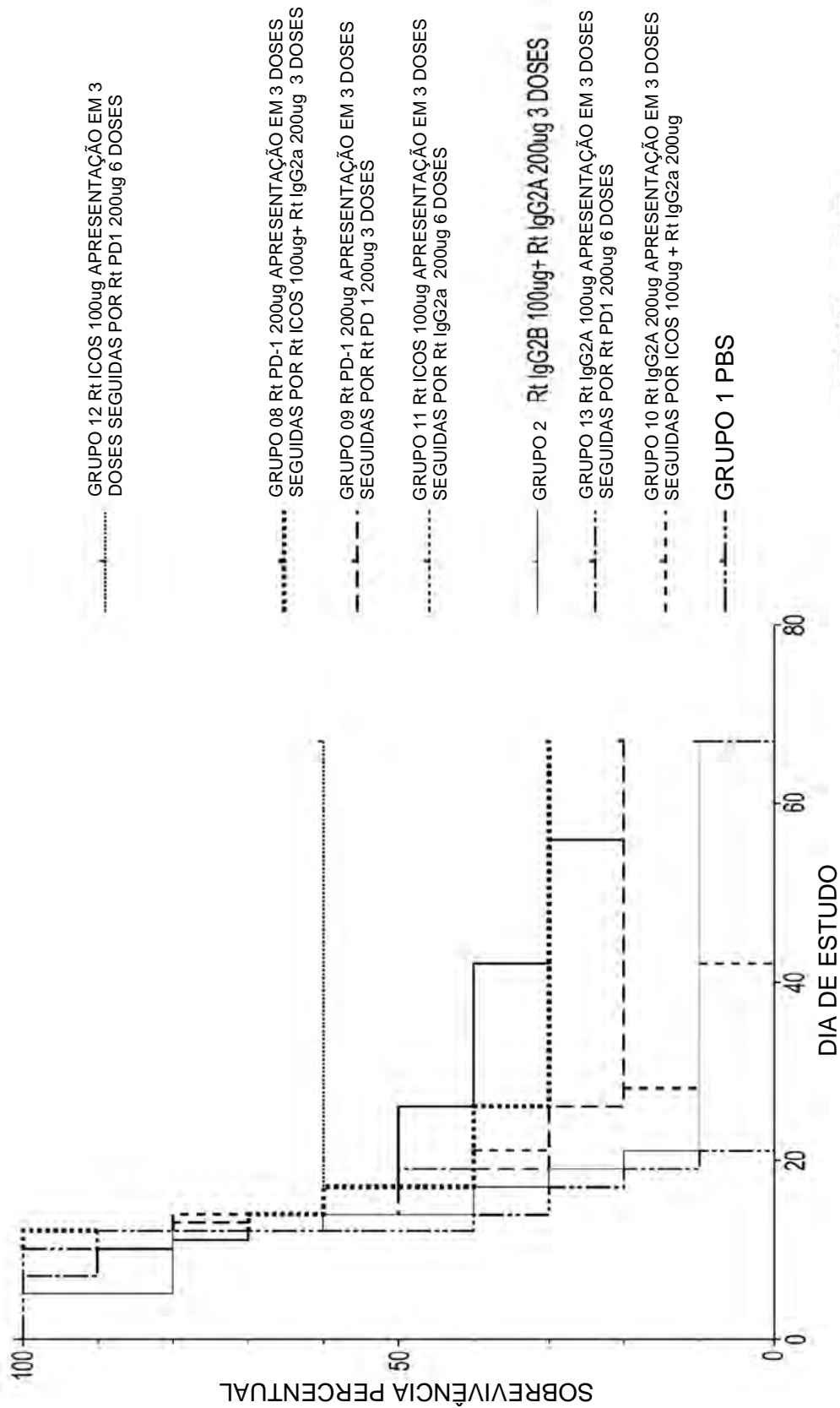


FIG. 12

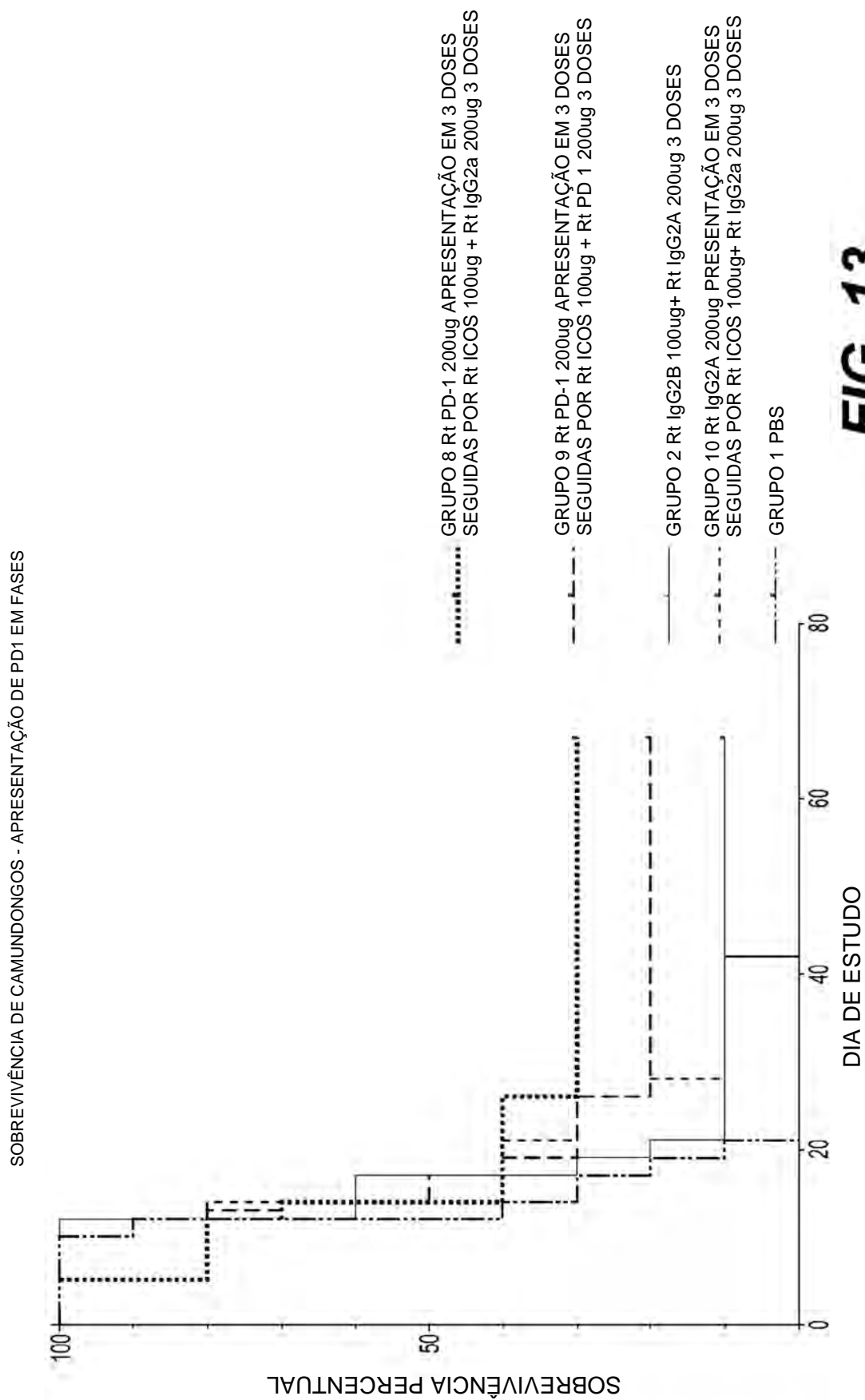


FIG. 13

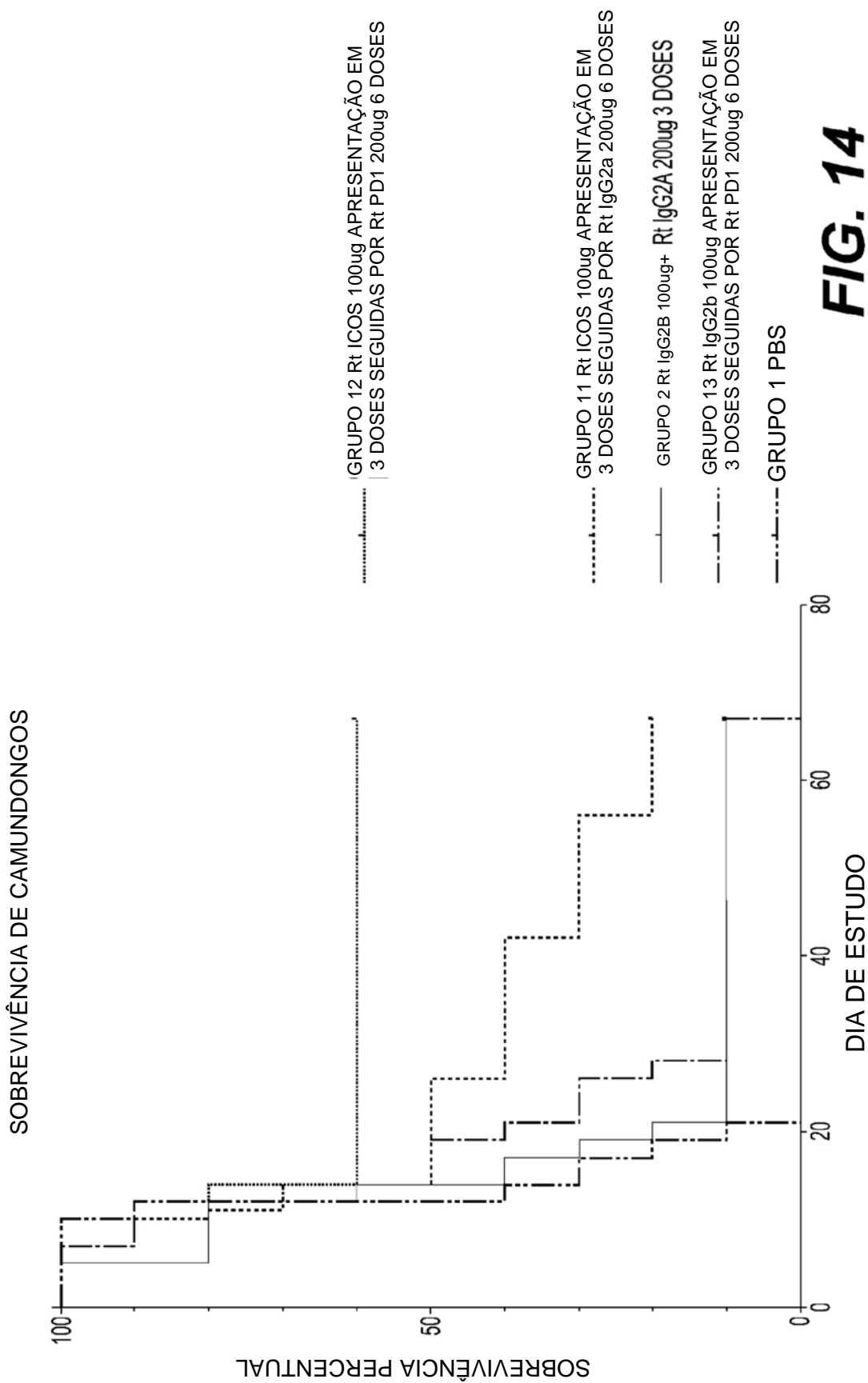


FIG. 14

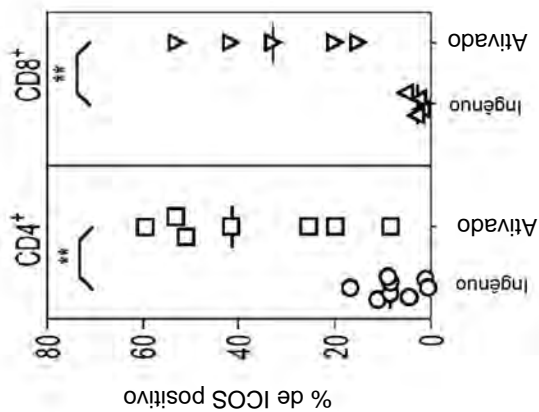


FIG. 15C

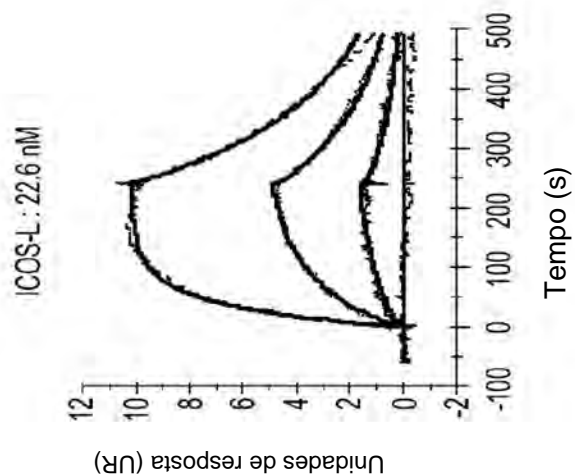


FIG. 15B

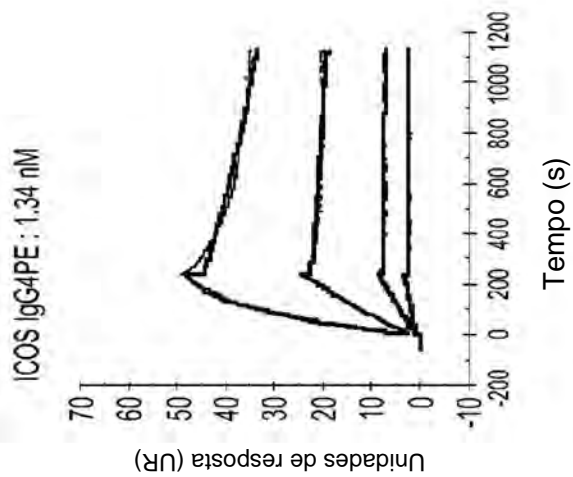


FIG. 15A

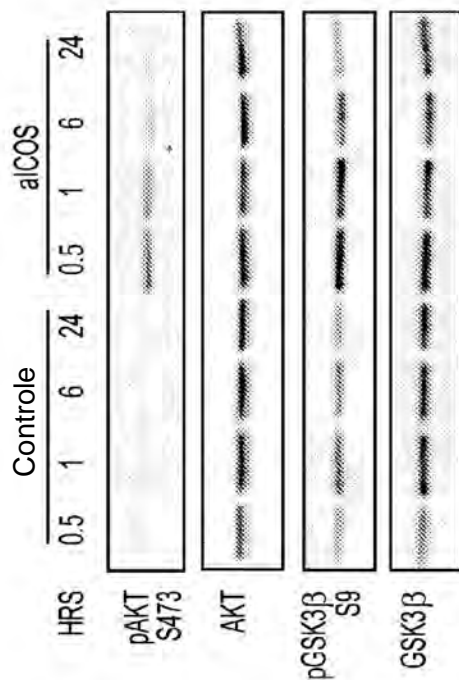


FIG. 15D

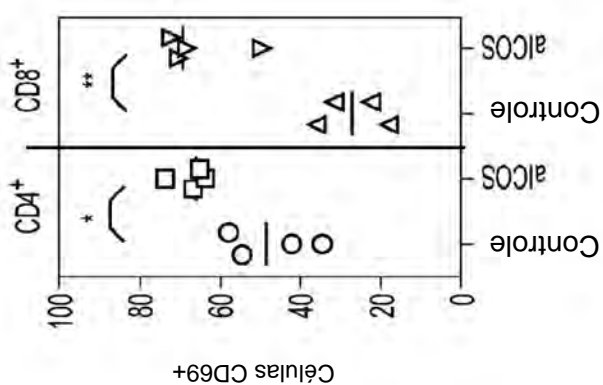


FIG. 15E

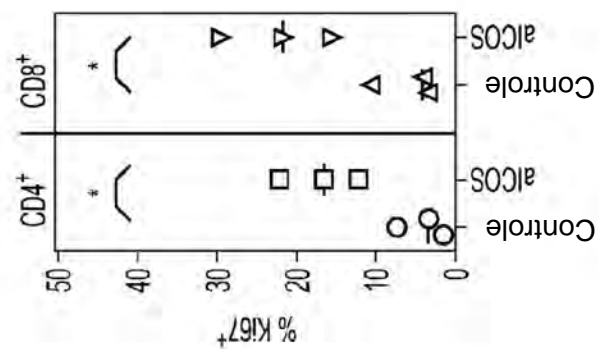


FIG. 15F

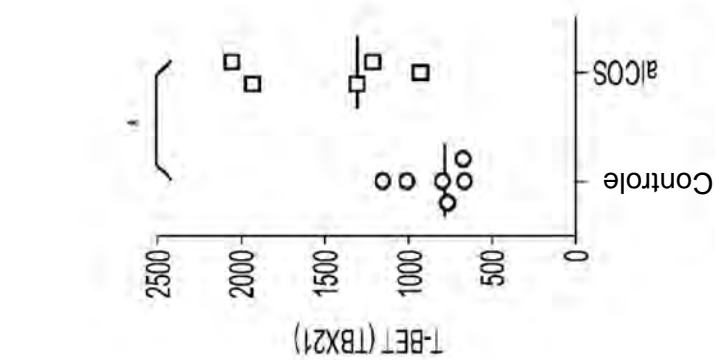


FIG. 15I

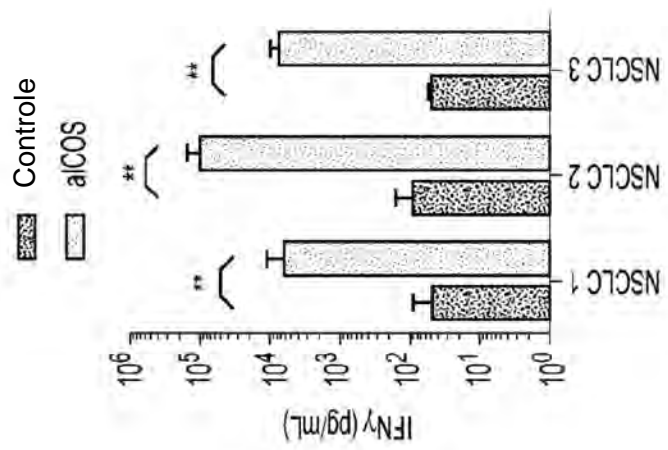


FIG. 15H

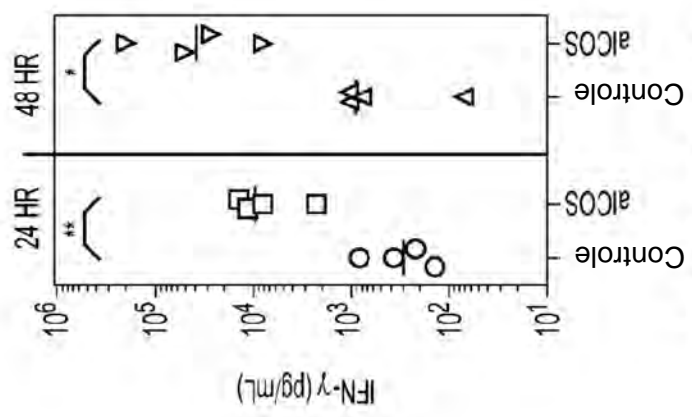


FIG. 15G

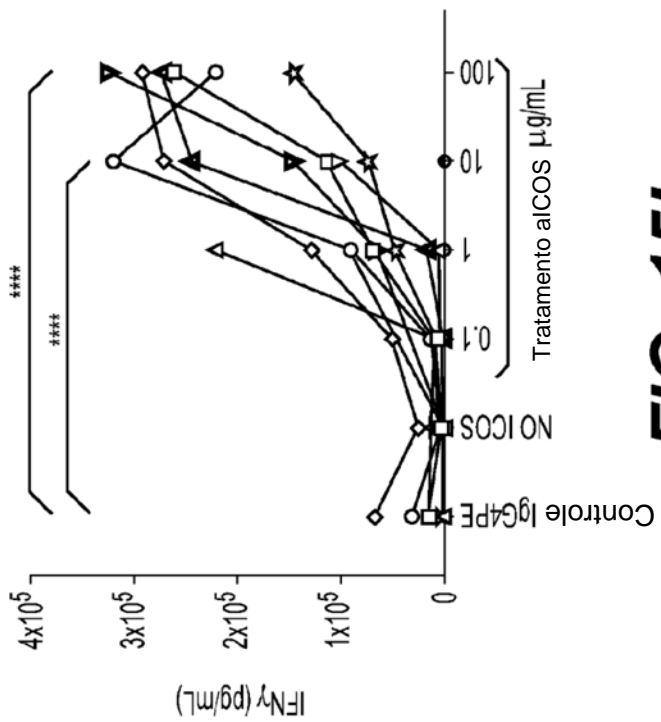


FIG. 15L

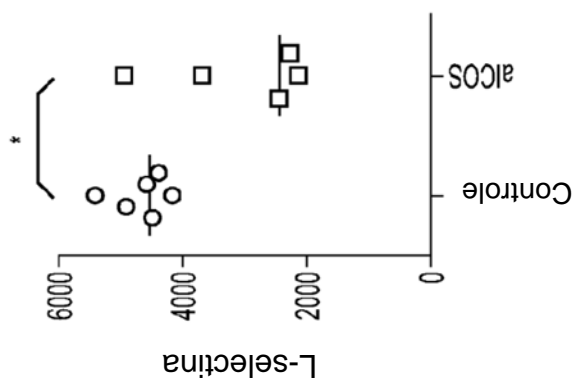


FIG. 15K

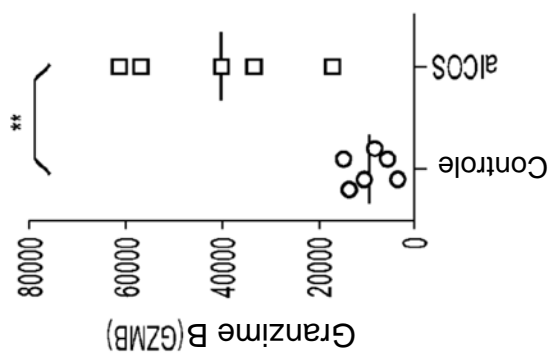


FIG. 15J

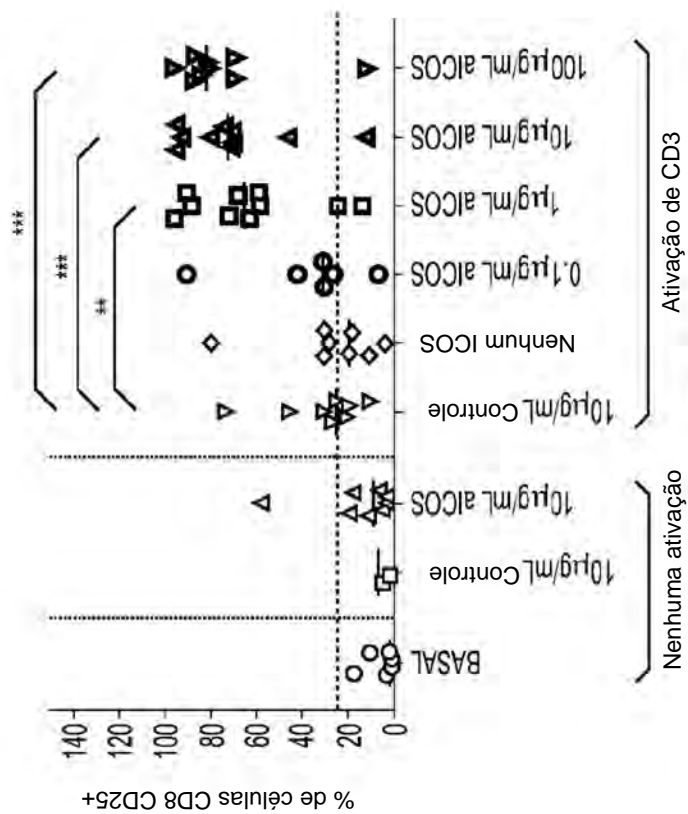


FIG. 15N

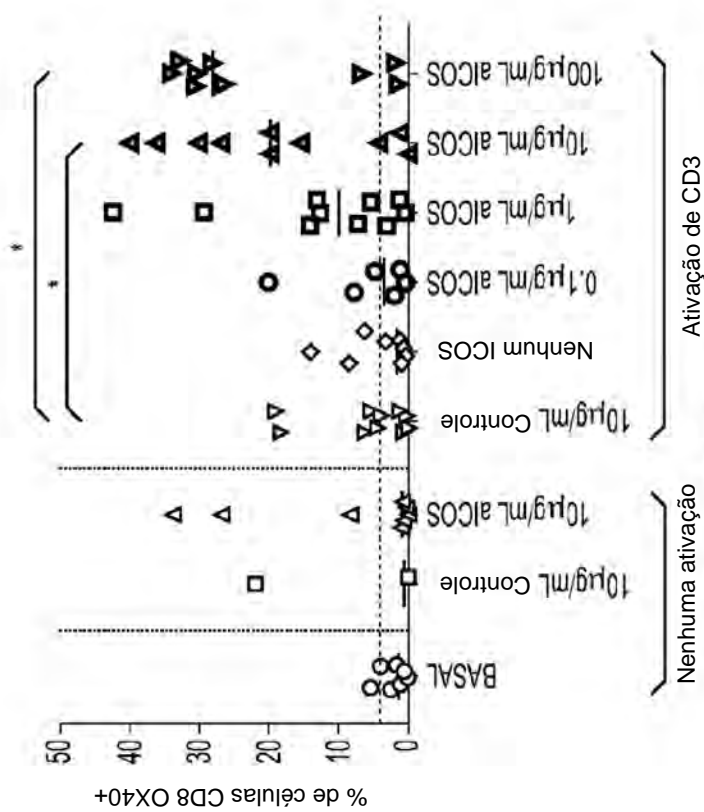


FIG. 15M

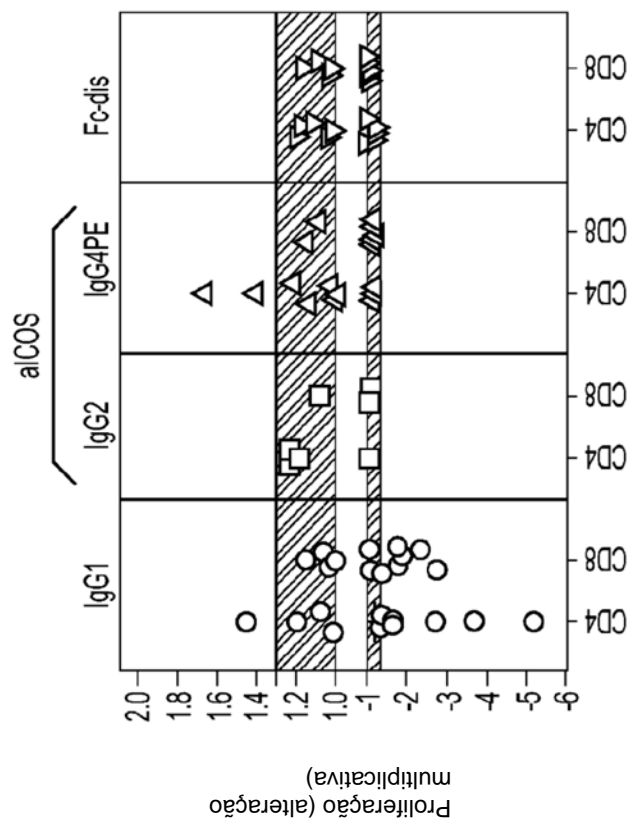
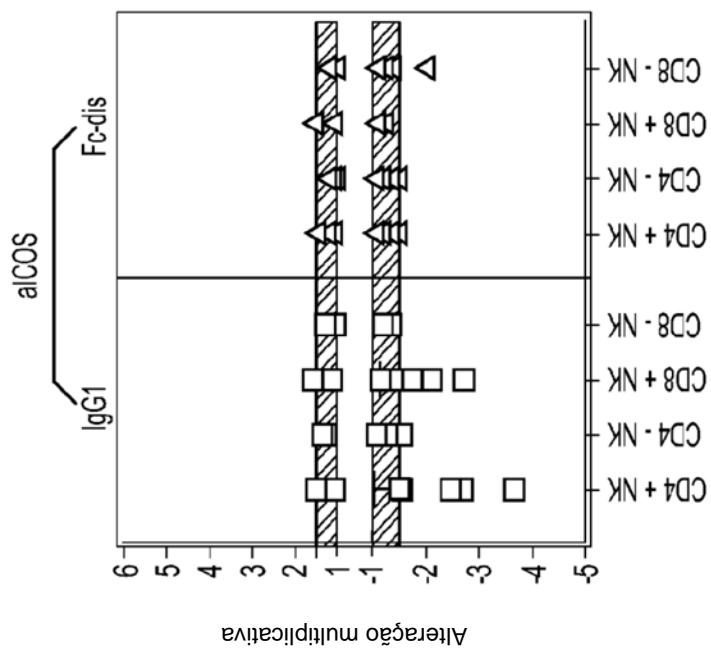


FIG. 16B

FIG. 16A

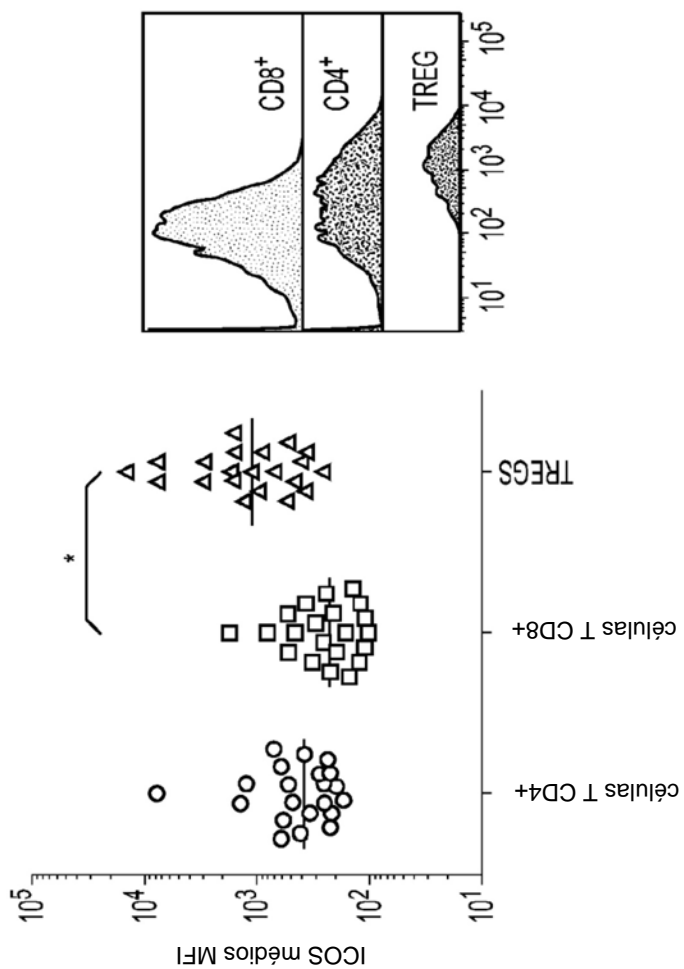


FIG. 16D

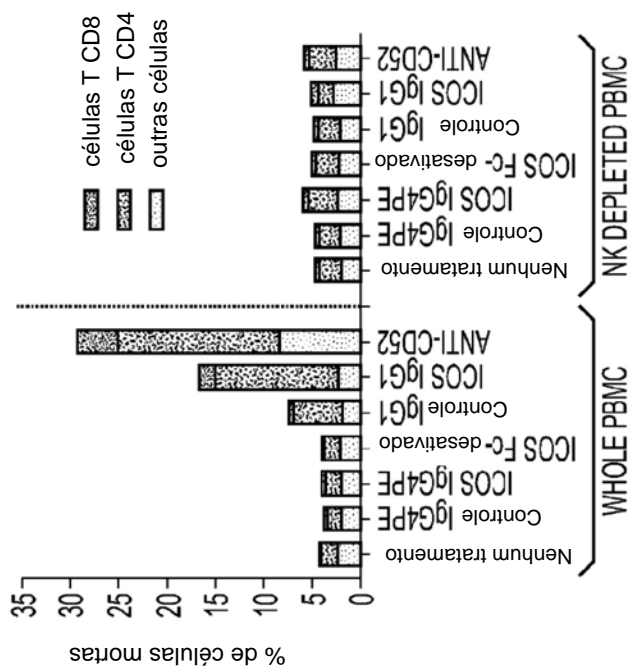


FIG. 16C

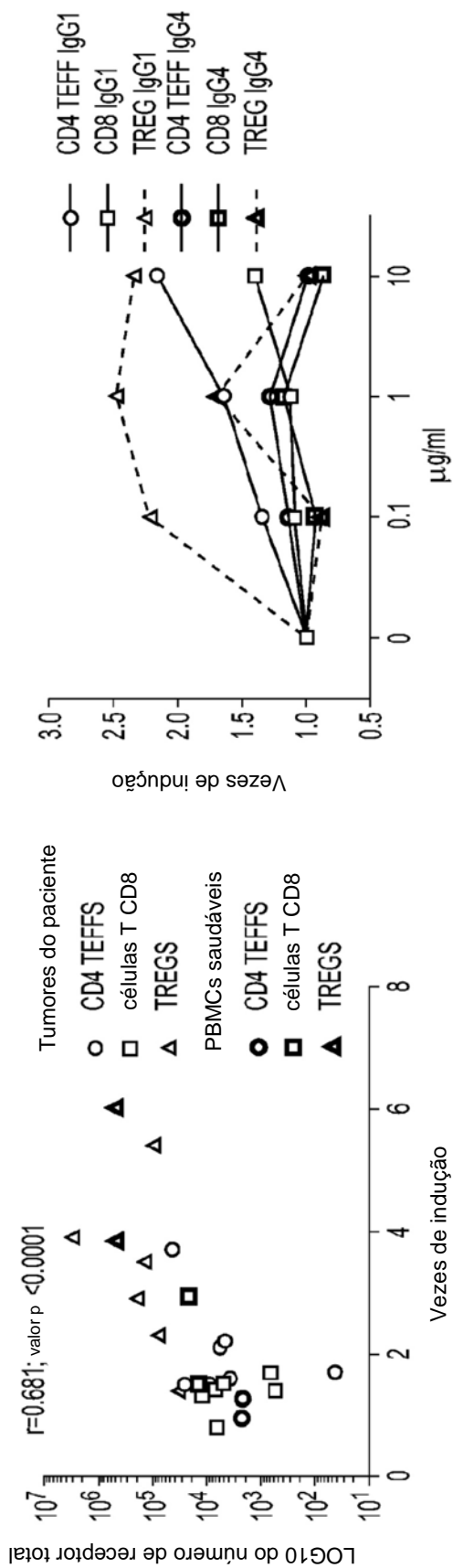


FIG. 16E

FIG. 16F

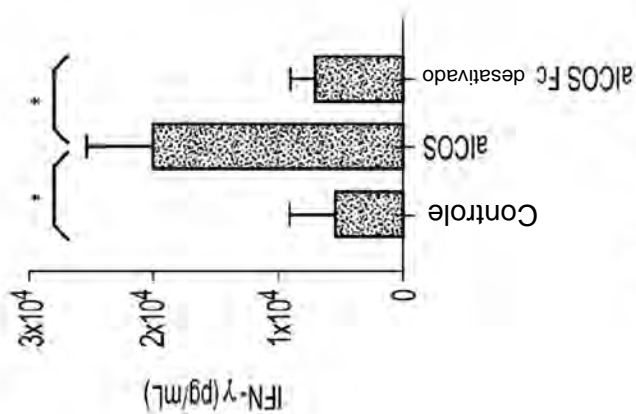


FIG. 17C

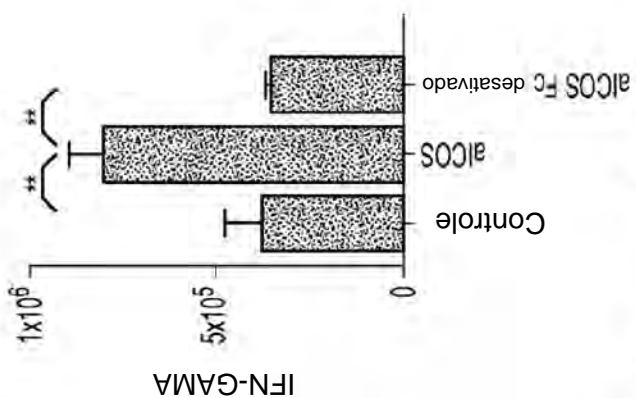


FIG. 17B

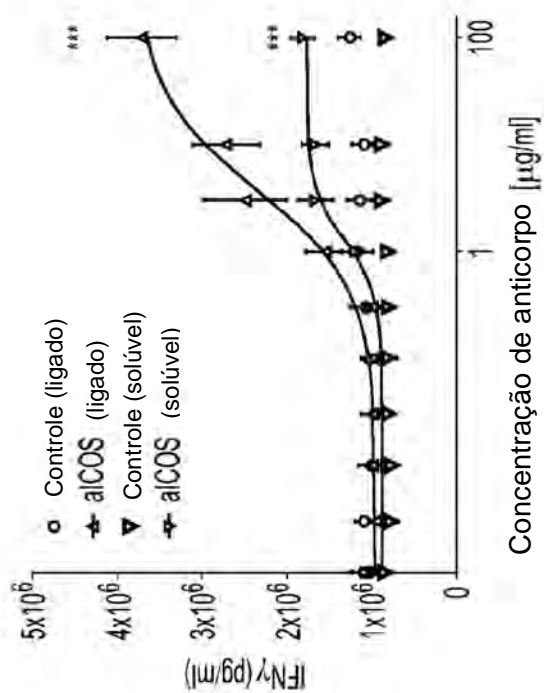


FIG. 17A

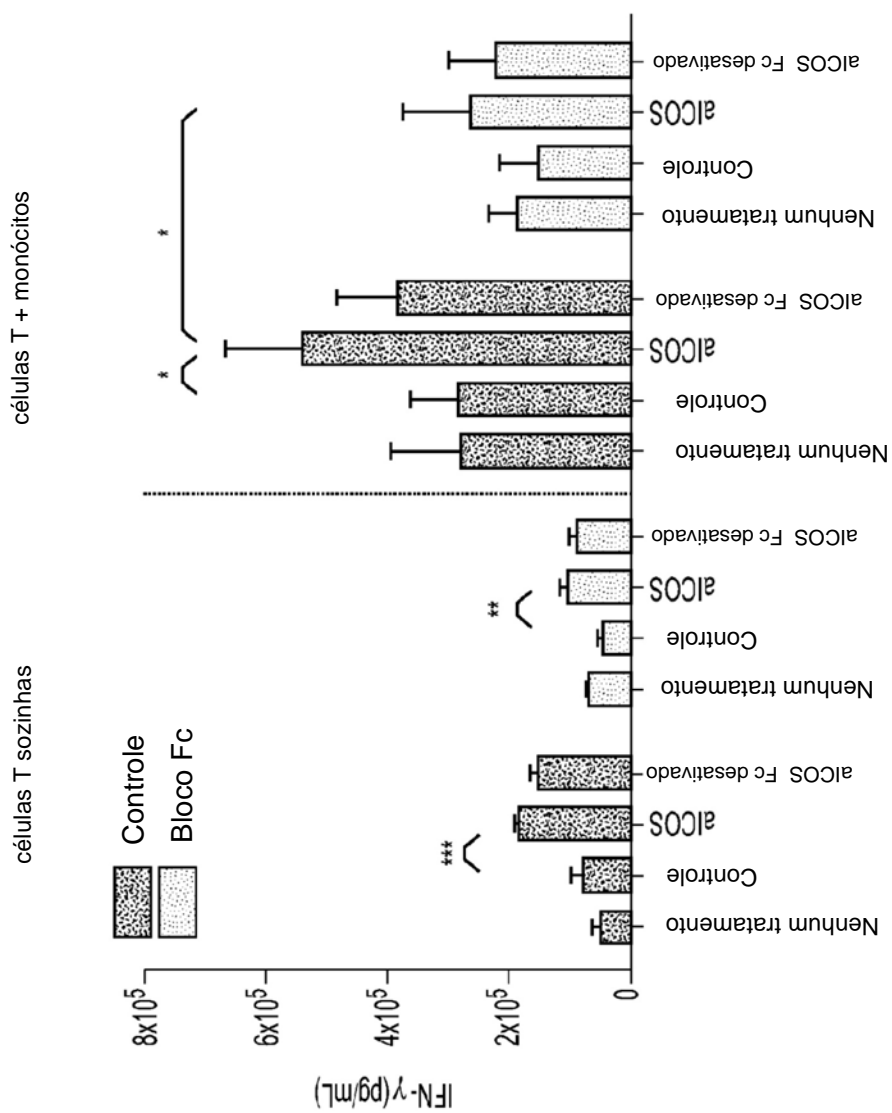


FIG. 17D

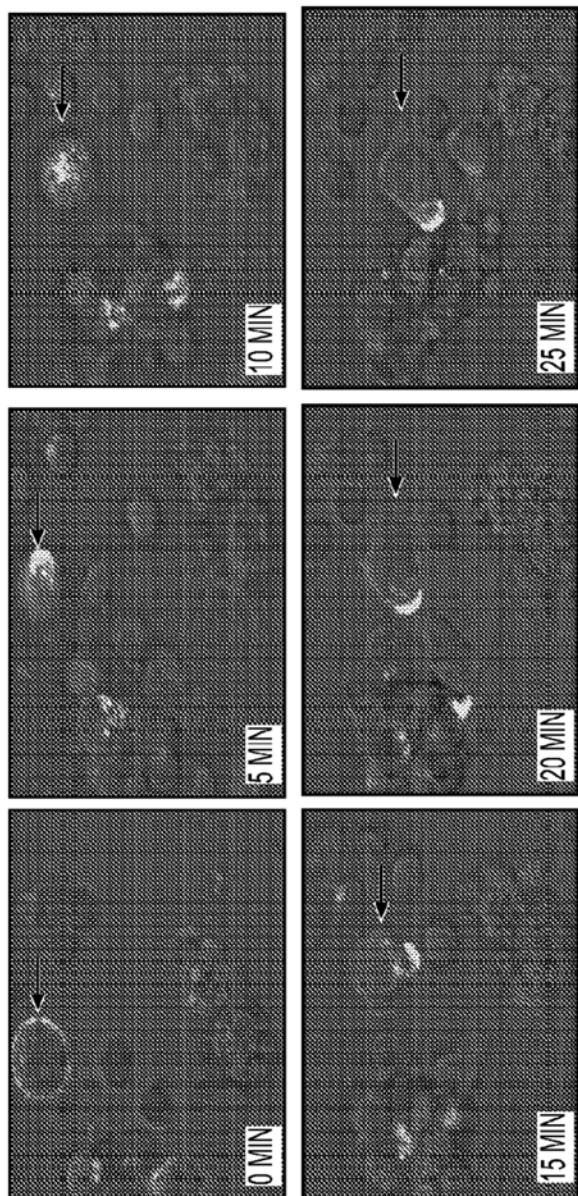


FIG. 17E

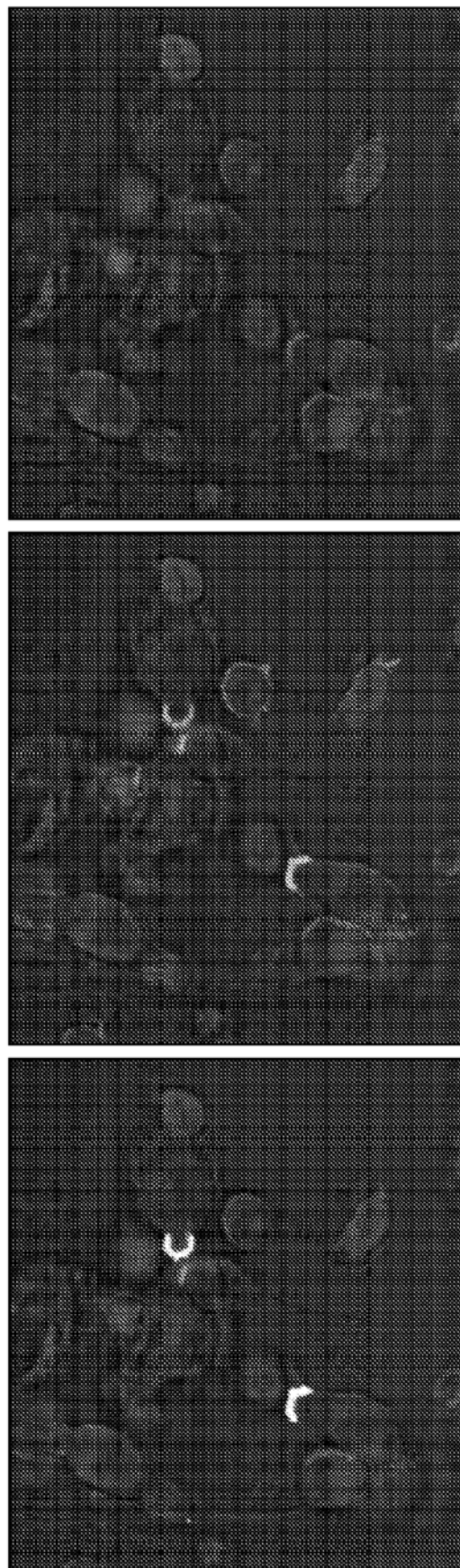


FIG. 17F

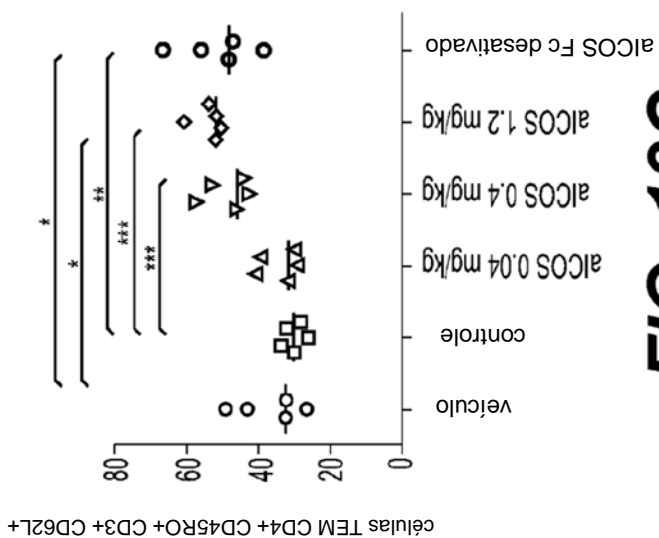


FIG. 18C

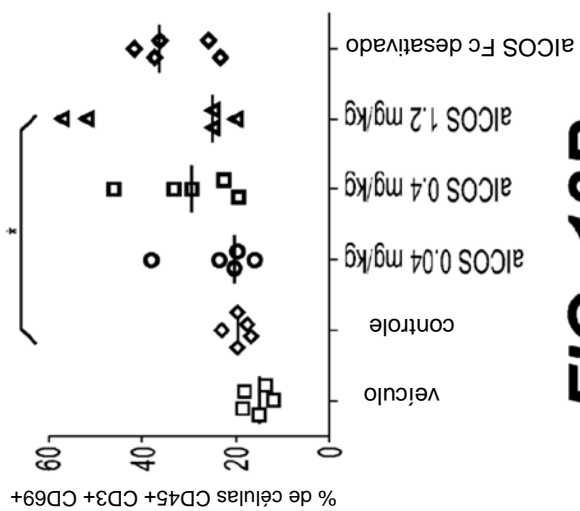


FIG. 18B

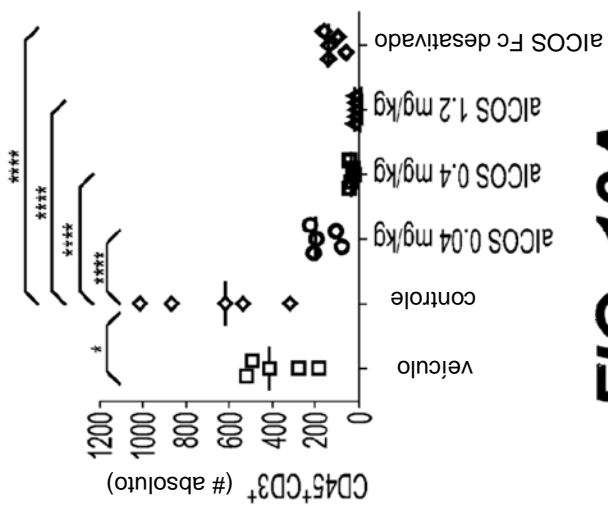


FIG. 18A

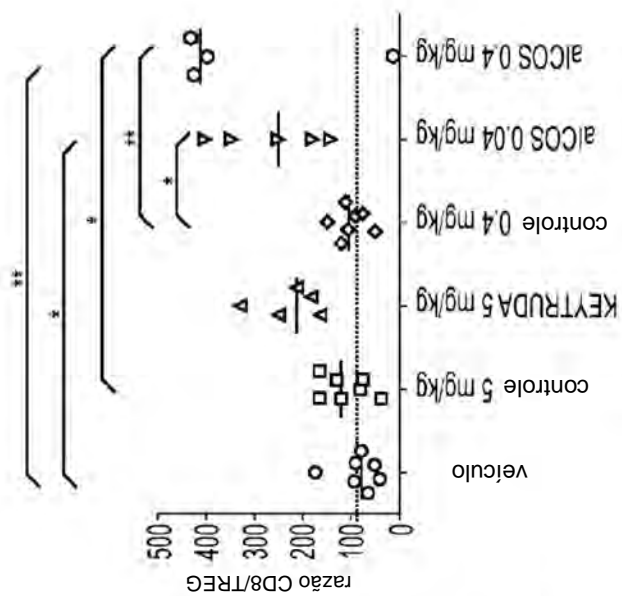


FIG. 18E

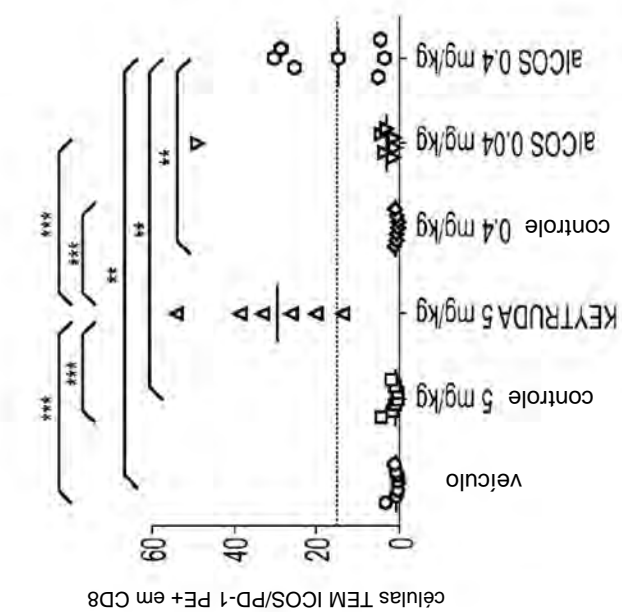


FIG. 18F

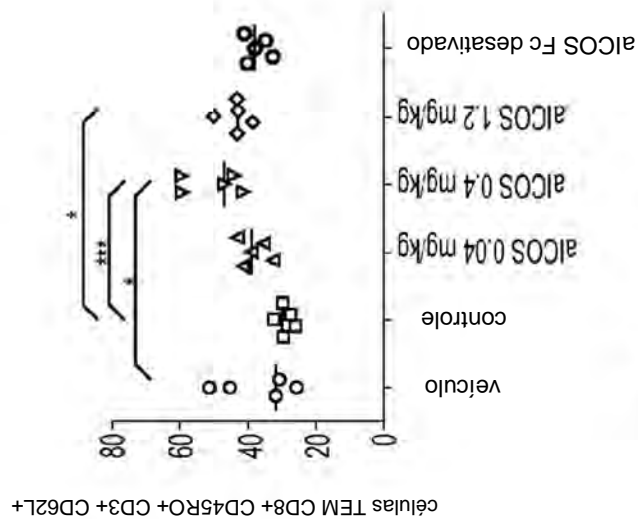


FIG. 18D

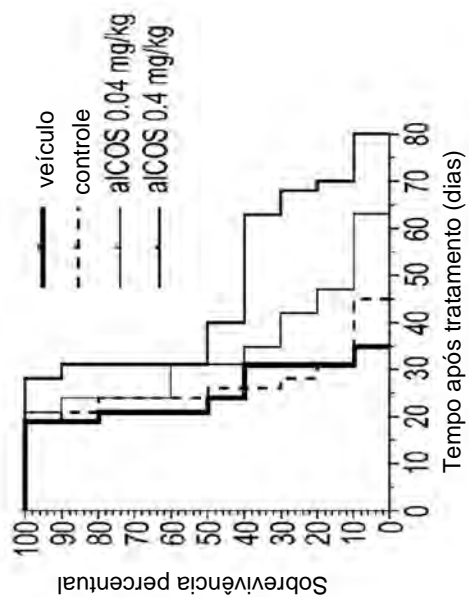


FIG. 18I

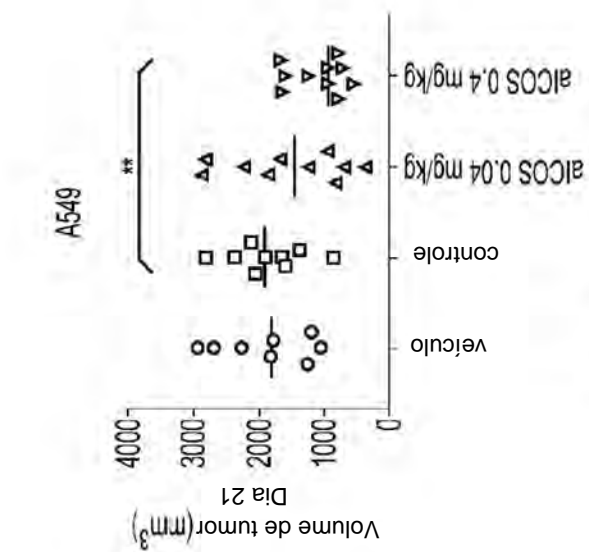


FIG. 18H

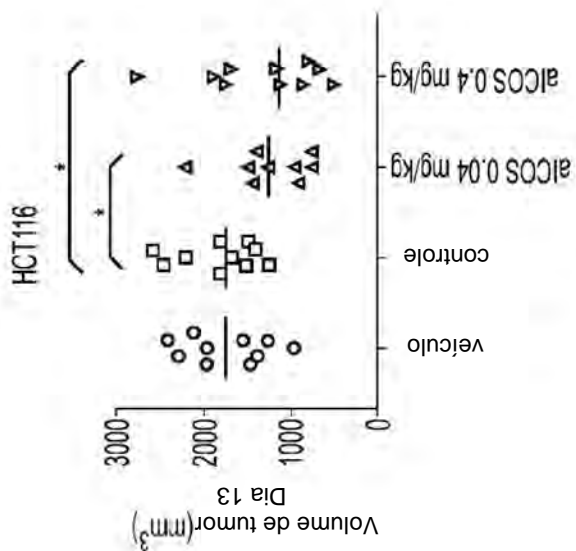


FIG. 18G

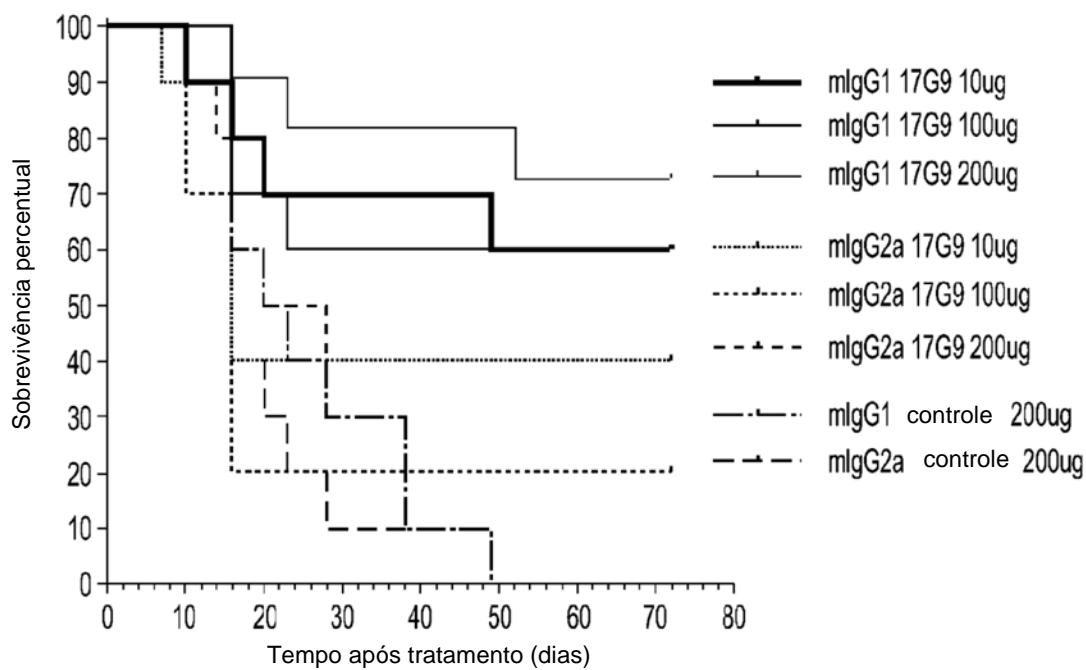


FIG. 19A

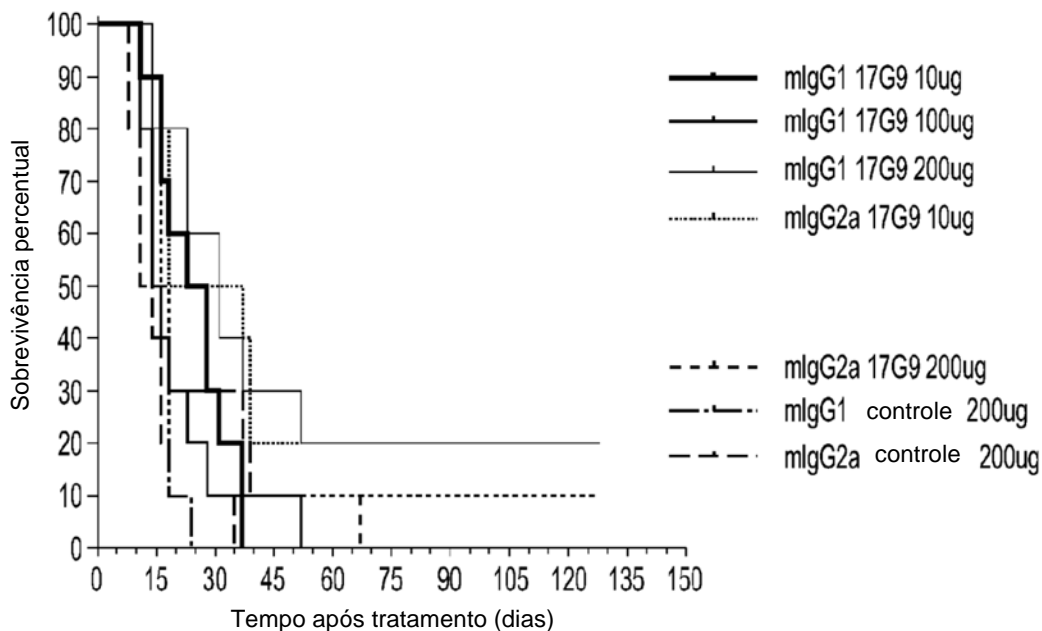


FIG. 19B

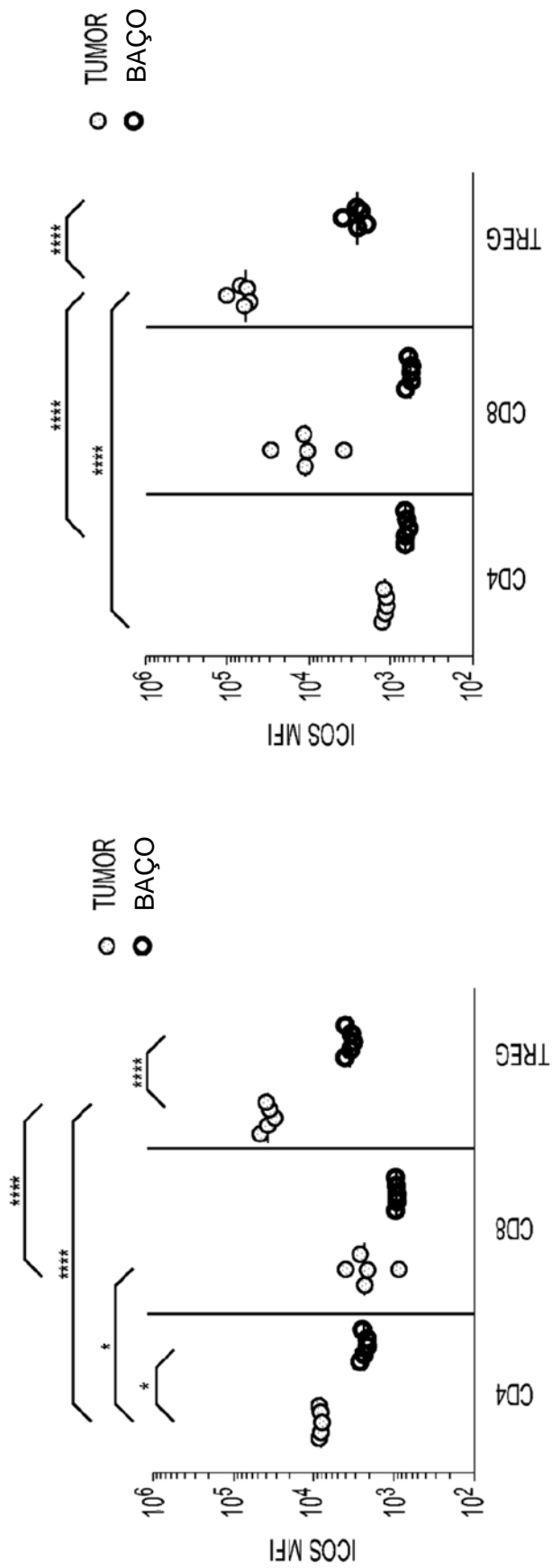


FIG. 19F

FIG. 19E

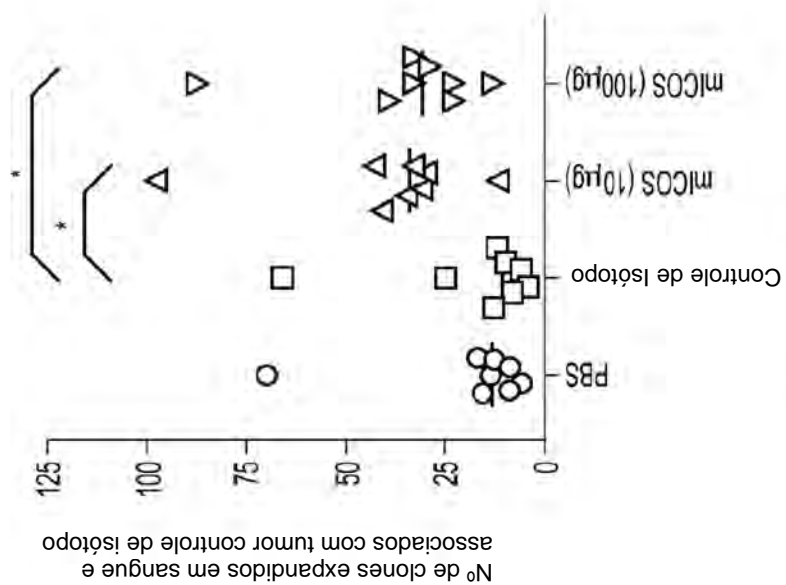


FIG. 19H

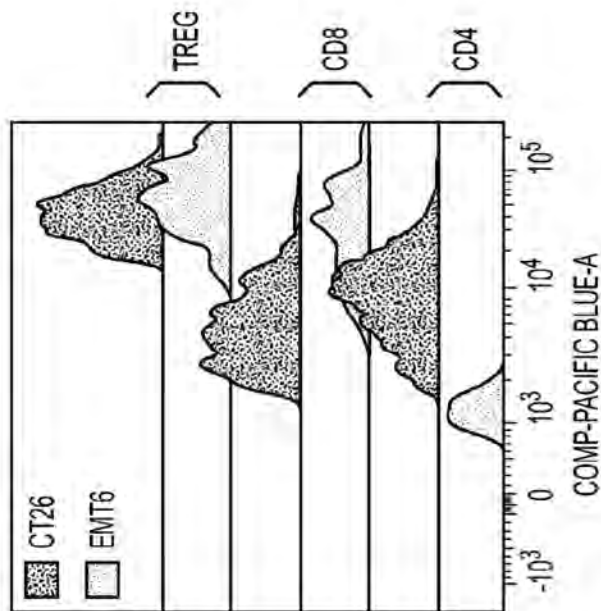


FIG. 19G

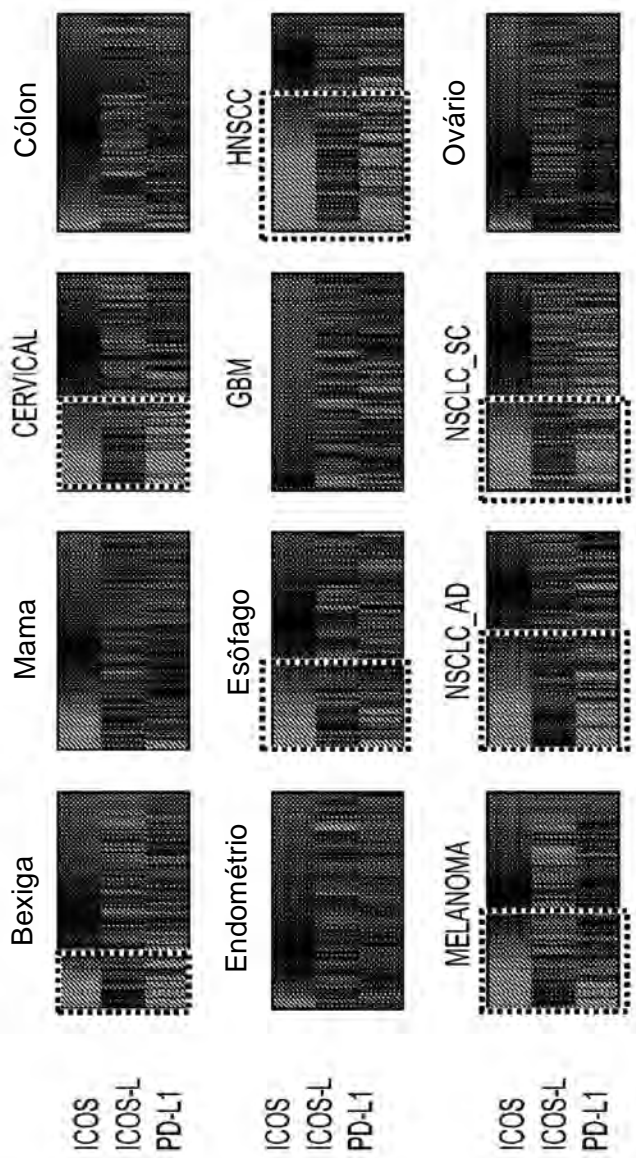


FIG. 20A

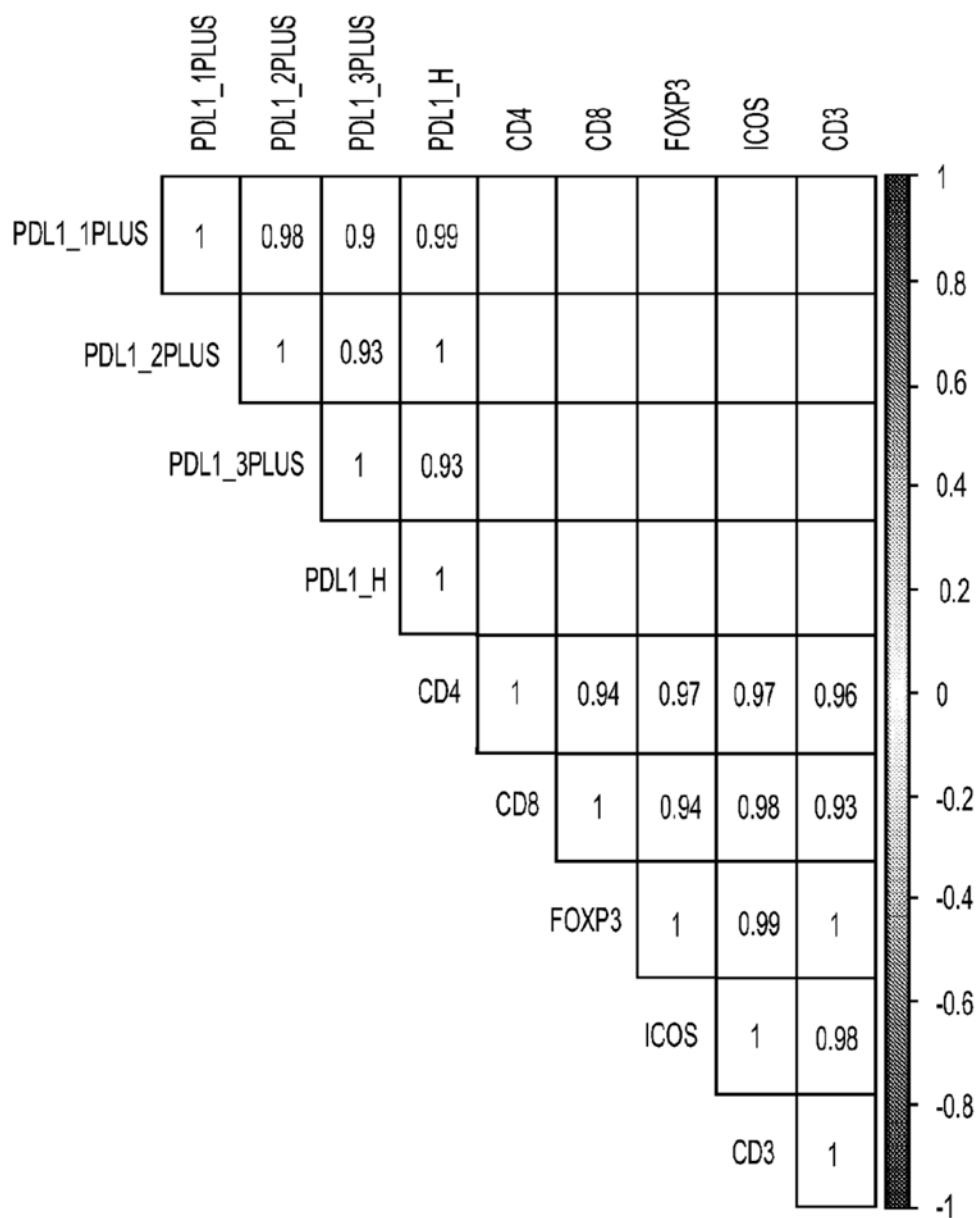


FIG. 20B

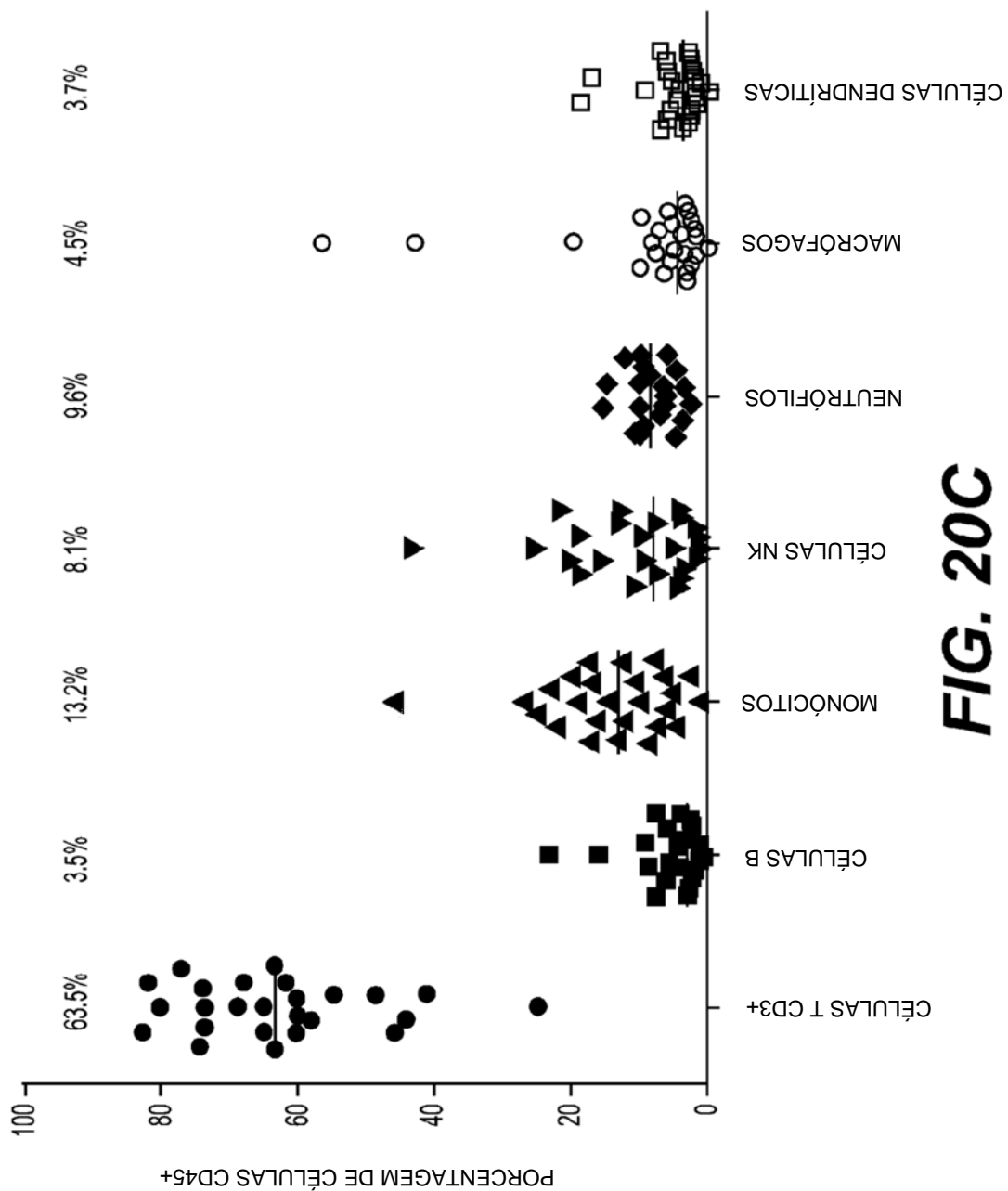


FIG. 20C

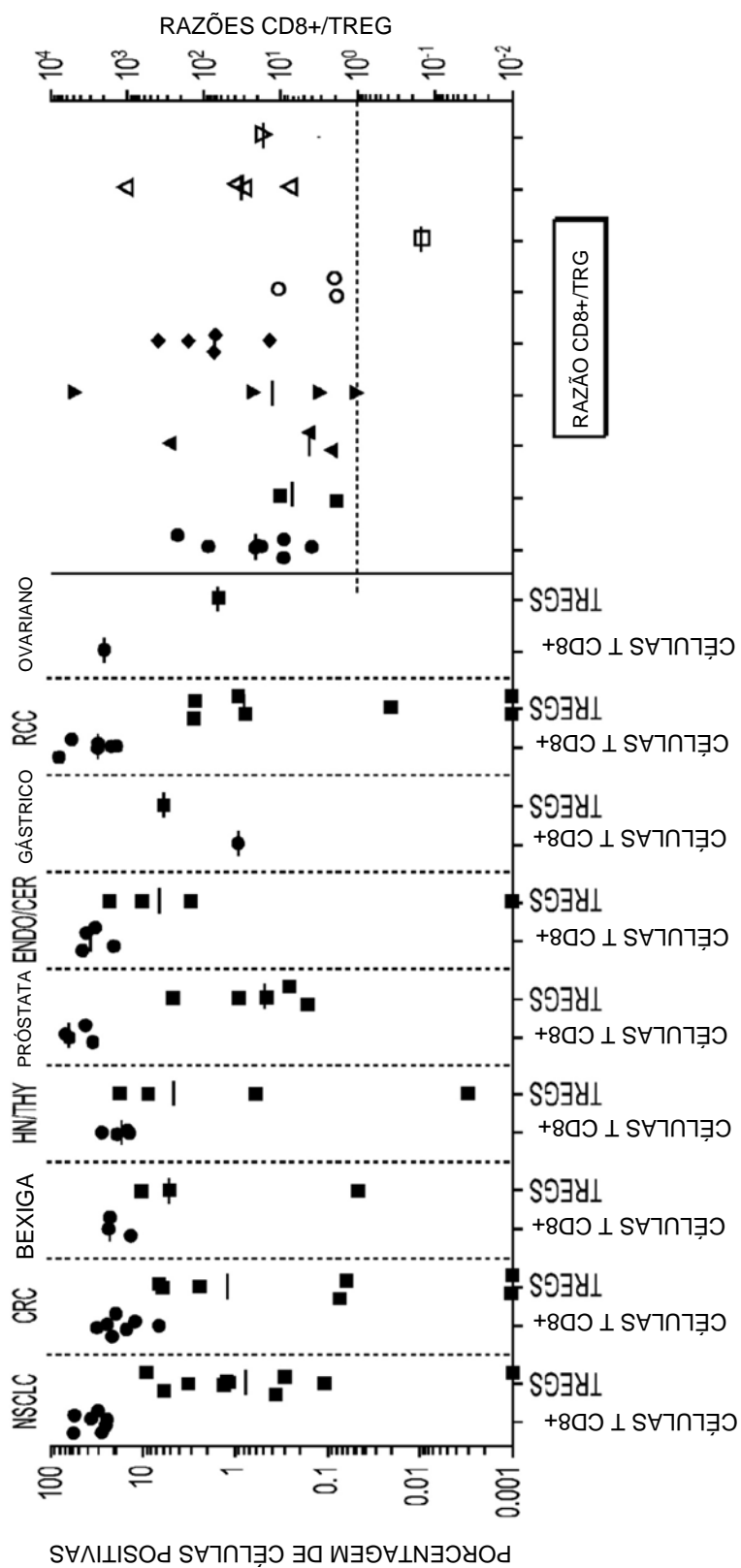


FIG. 20D

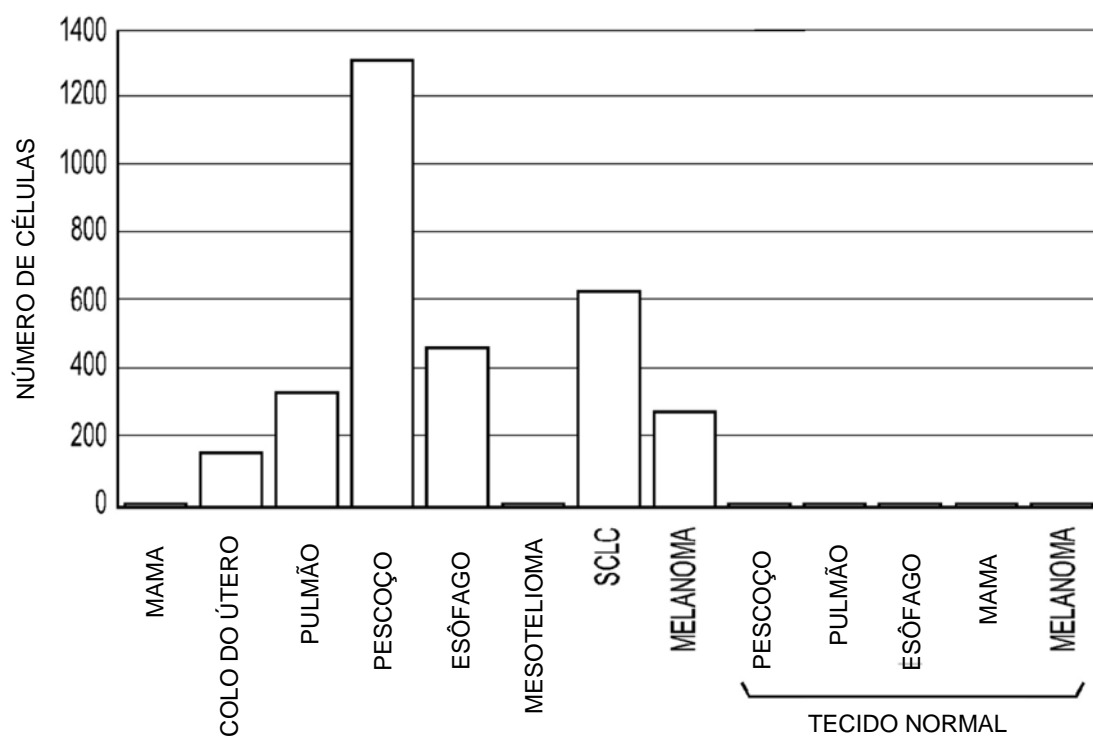
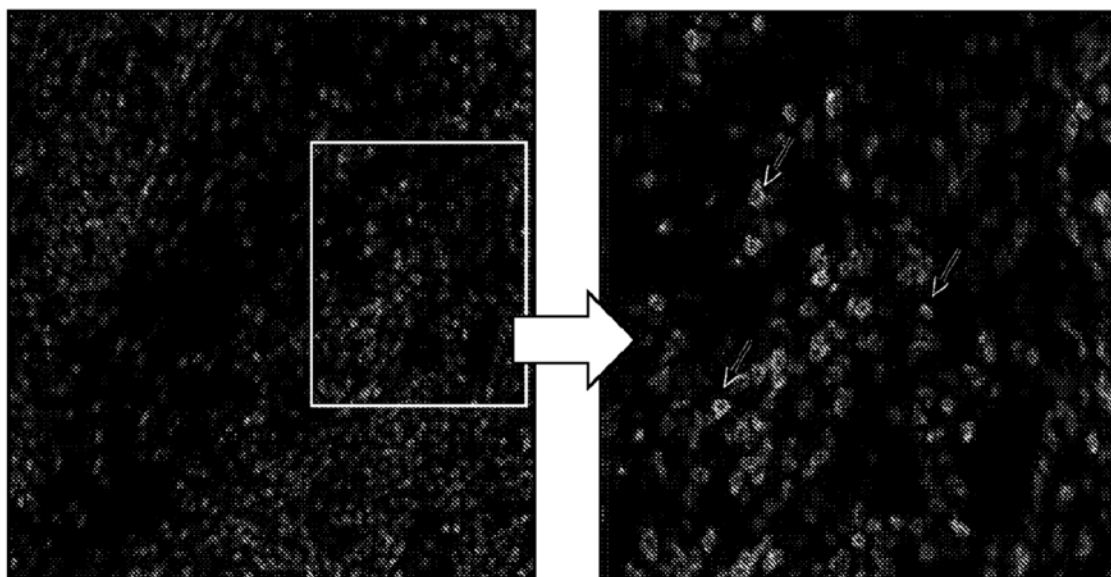


FIG. 20E



S15090259 R015 HN CD3(G) ICOS(B) PD1(R)

FIG. 20F

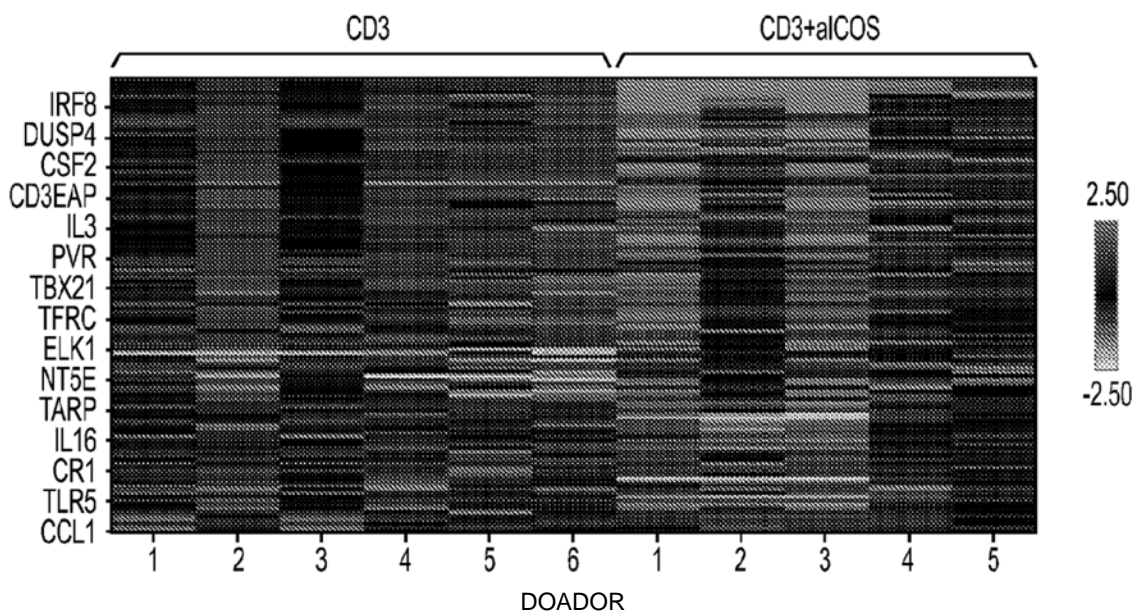


FIG. 20G

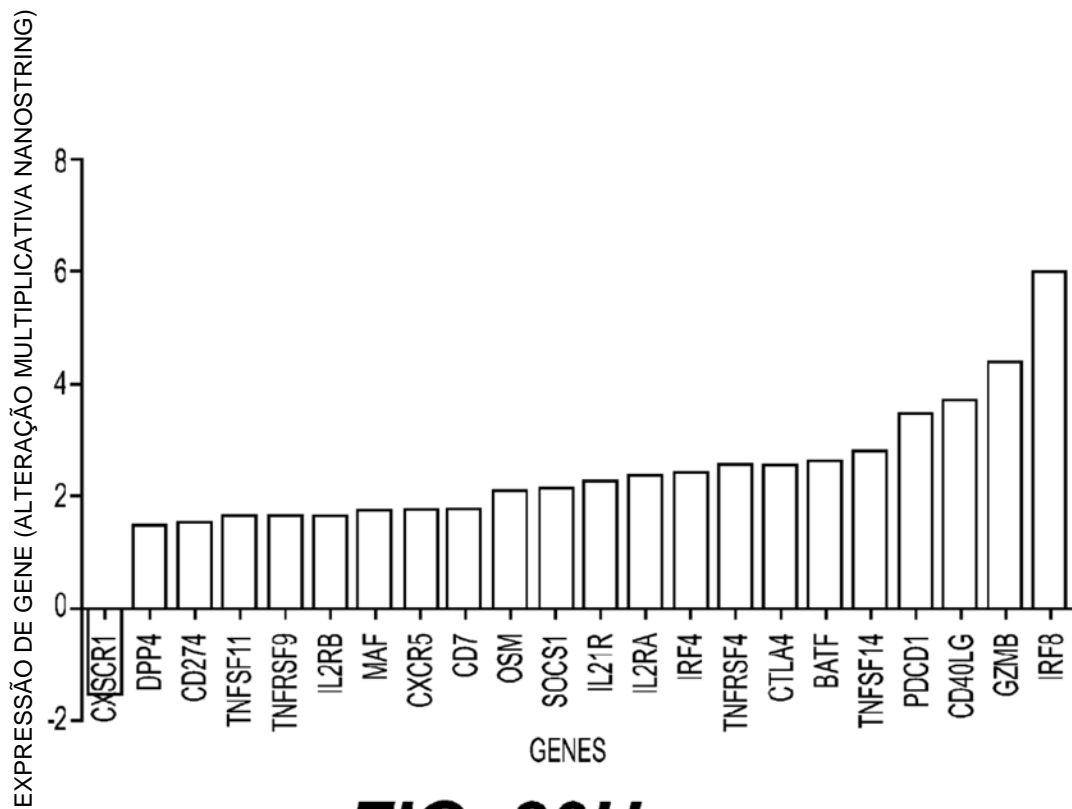


FIG. 20H

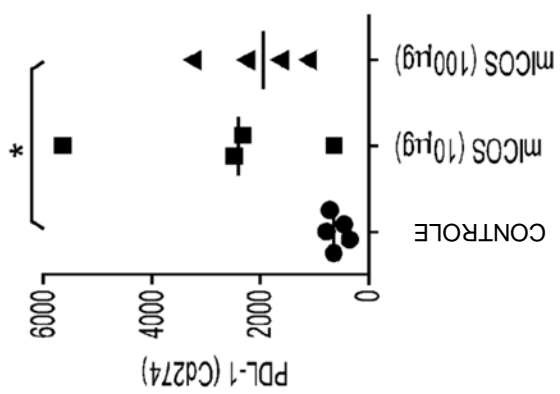


FIG. 21B

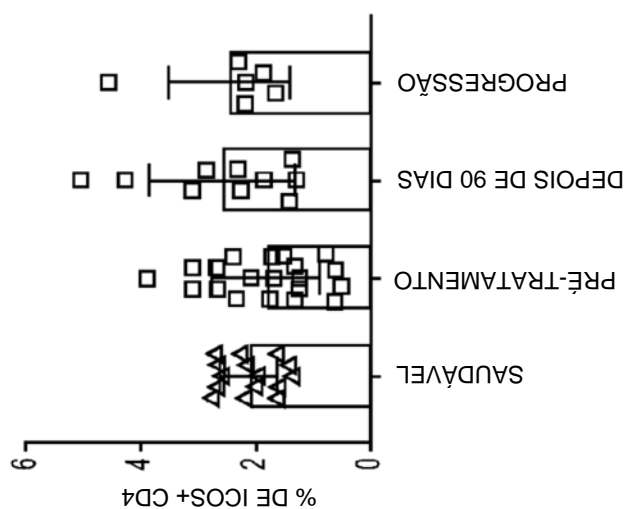


FIG. 21D

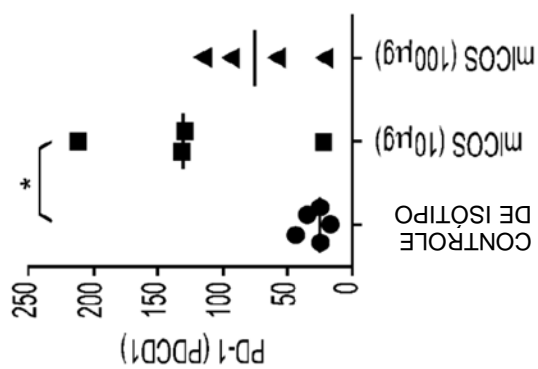


FIG. 21A

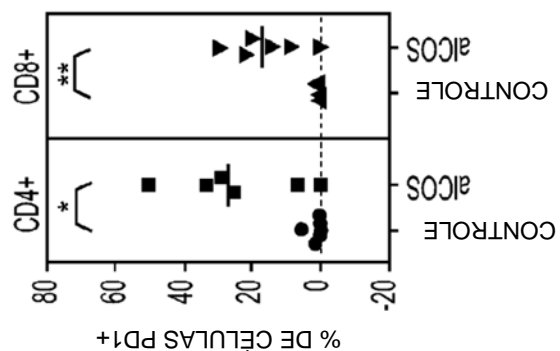
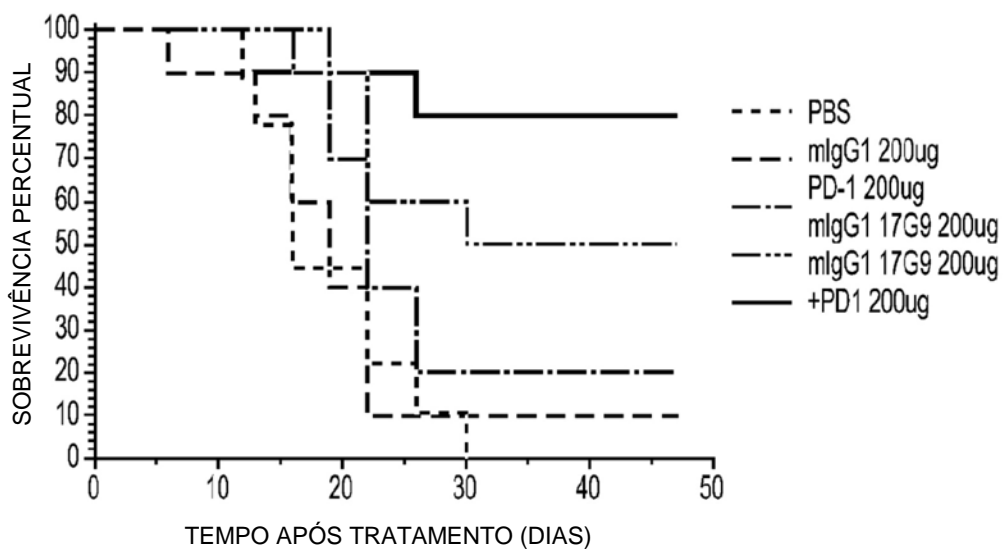
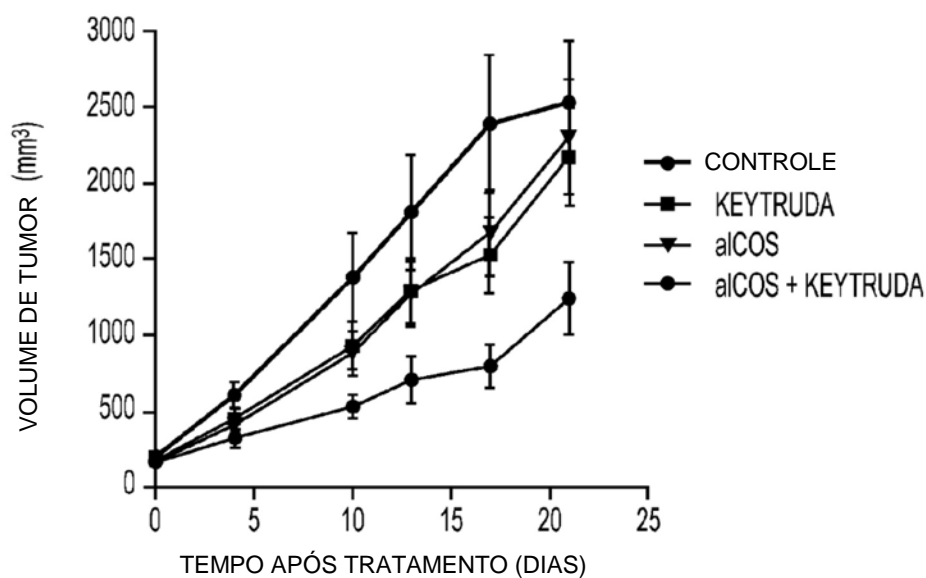


FIG. 21C

**FIG. 21E****FIG. 21F**

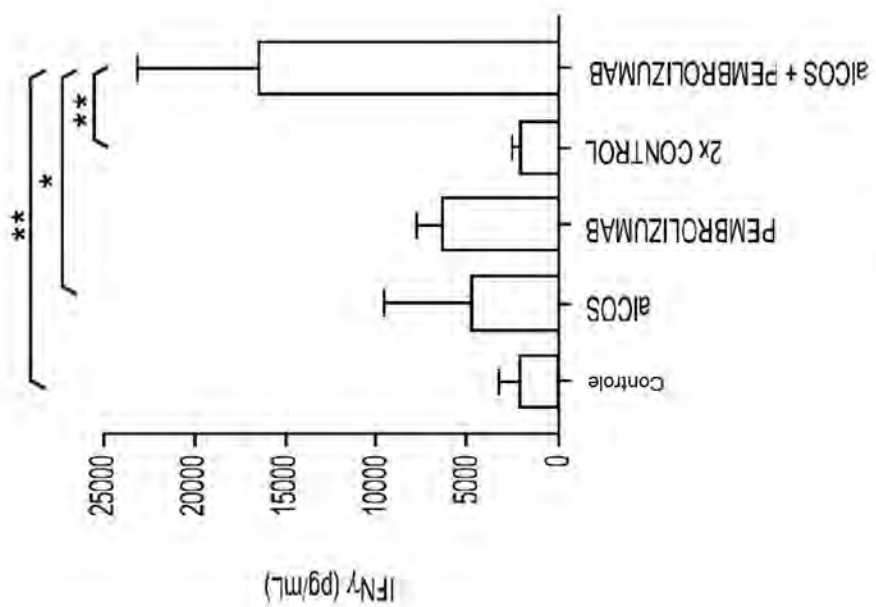


FIG. 21H

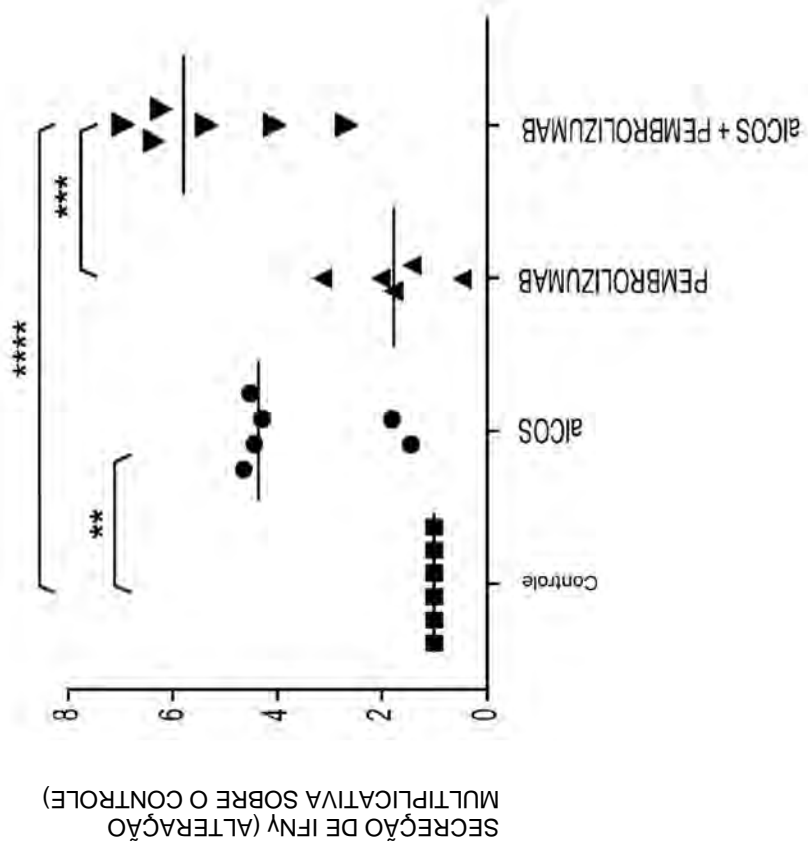


FIG. 21G

SECREÇÃO DE IFN γ (ALTERAÇÃO
MULTIPLICATIVA SOBRE O CONTROLE)

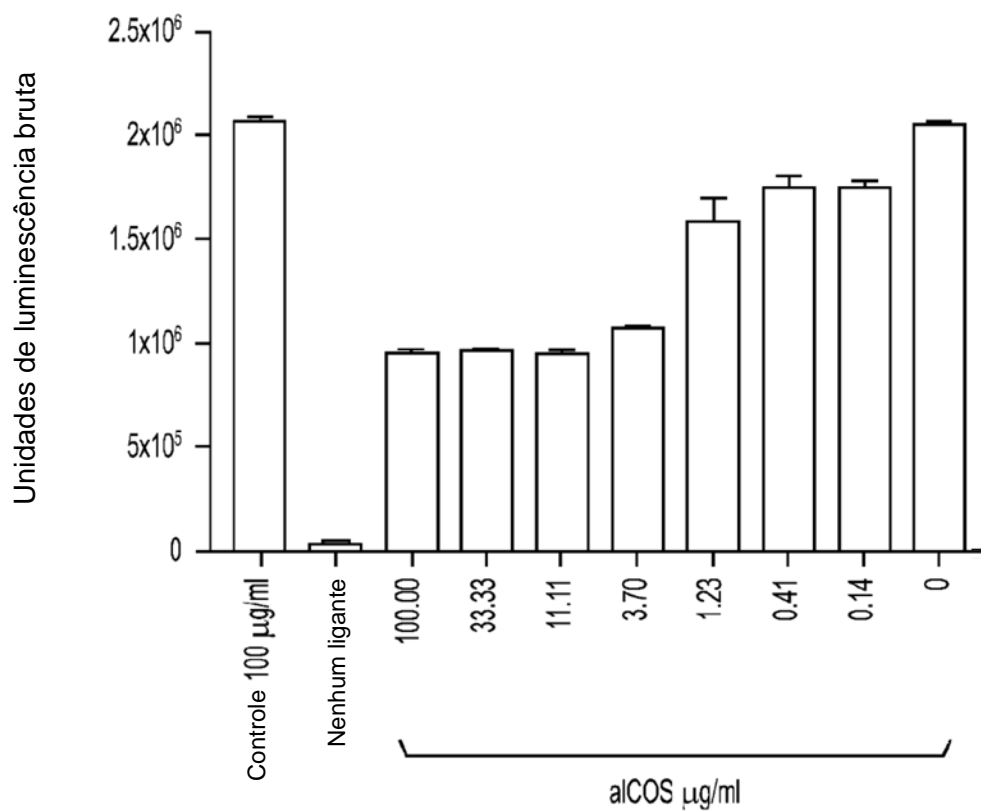


FIG. 22A

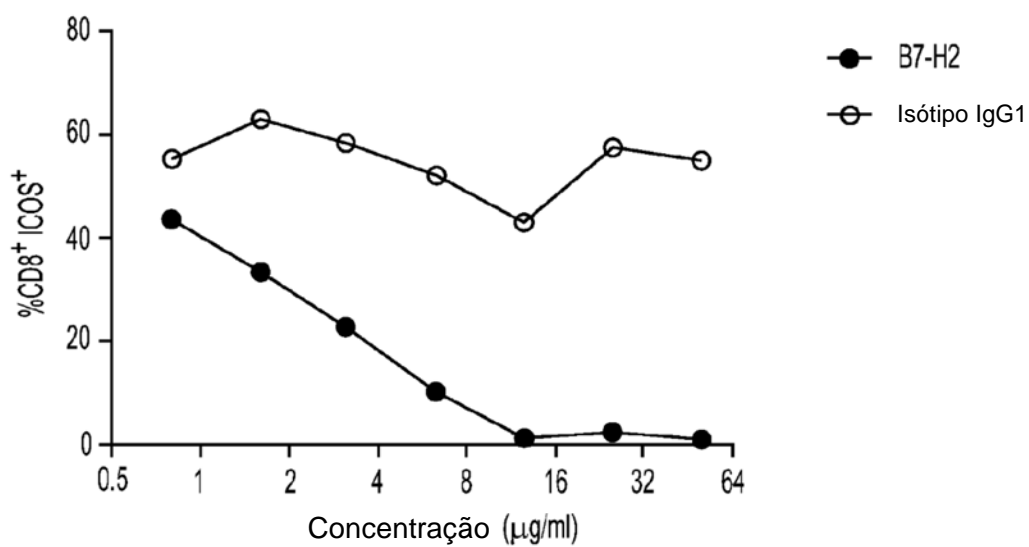
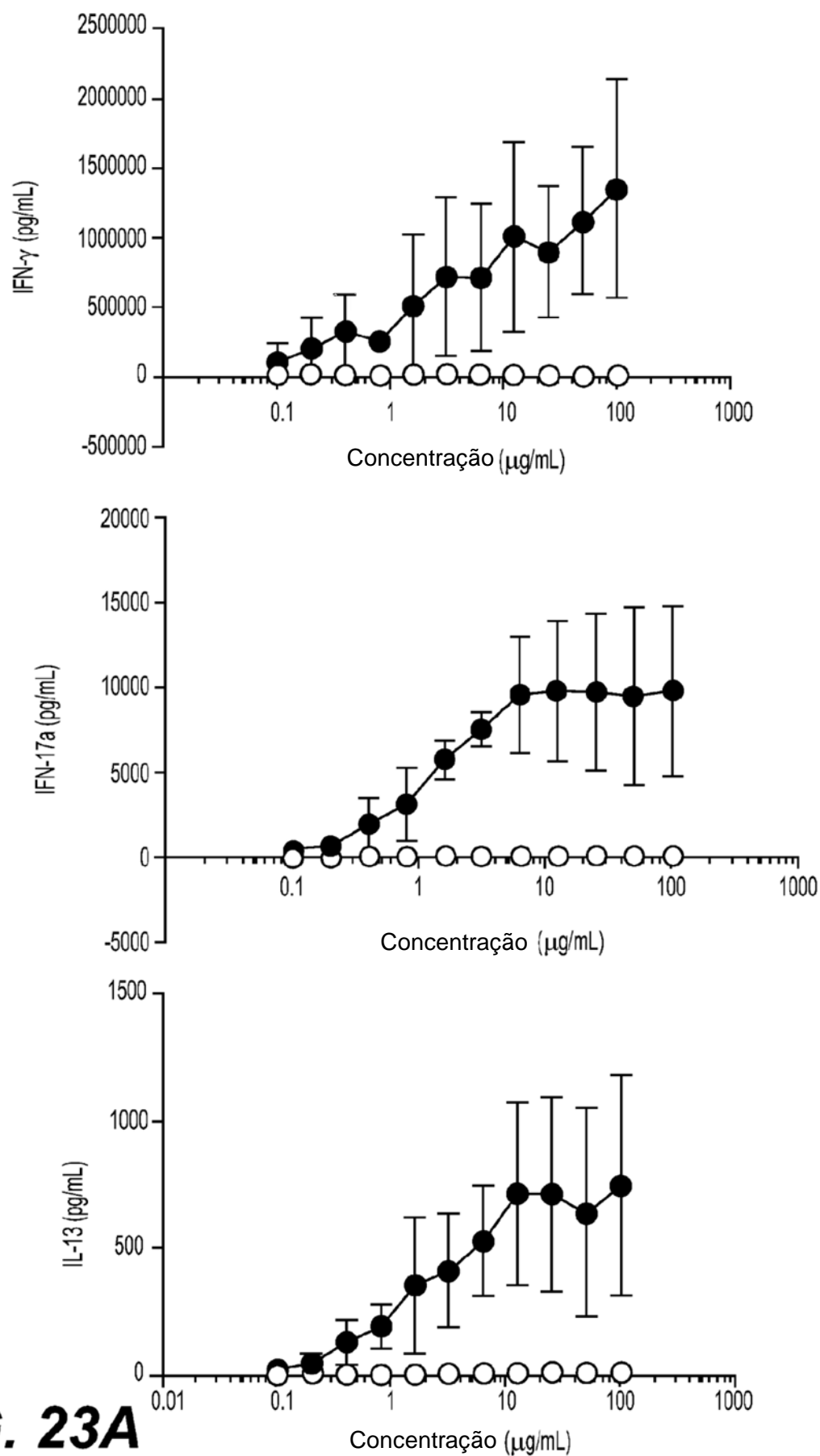


FIG. 22B

**FIG. 23A**

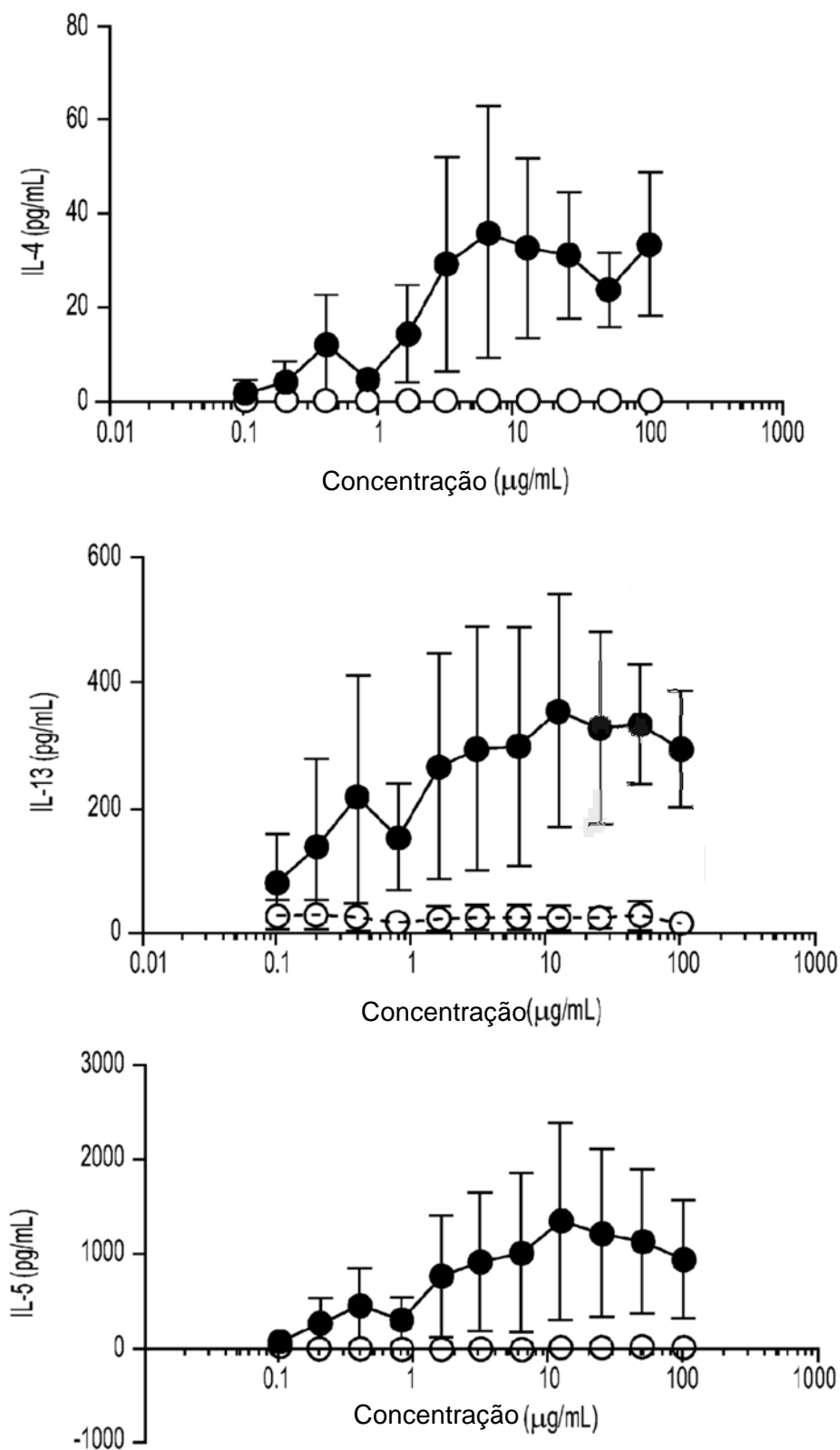


FIG. 23A
CONT.-1

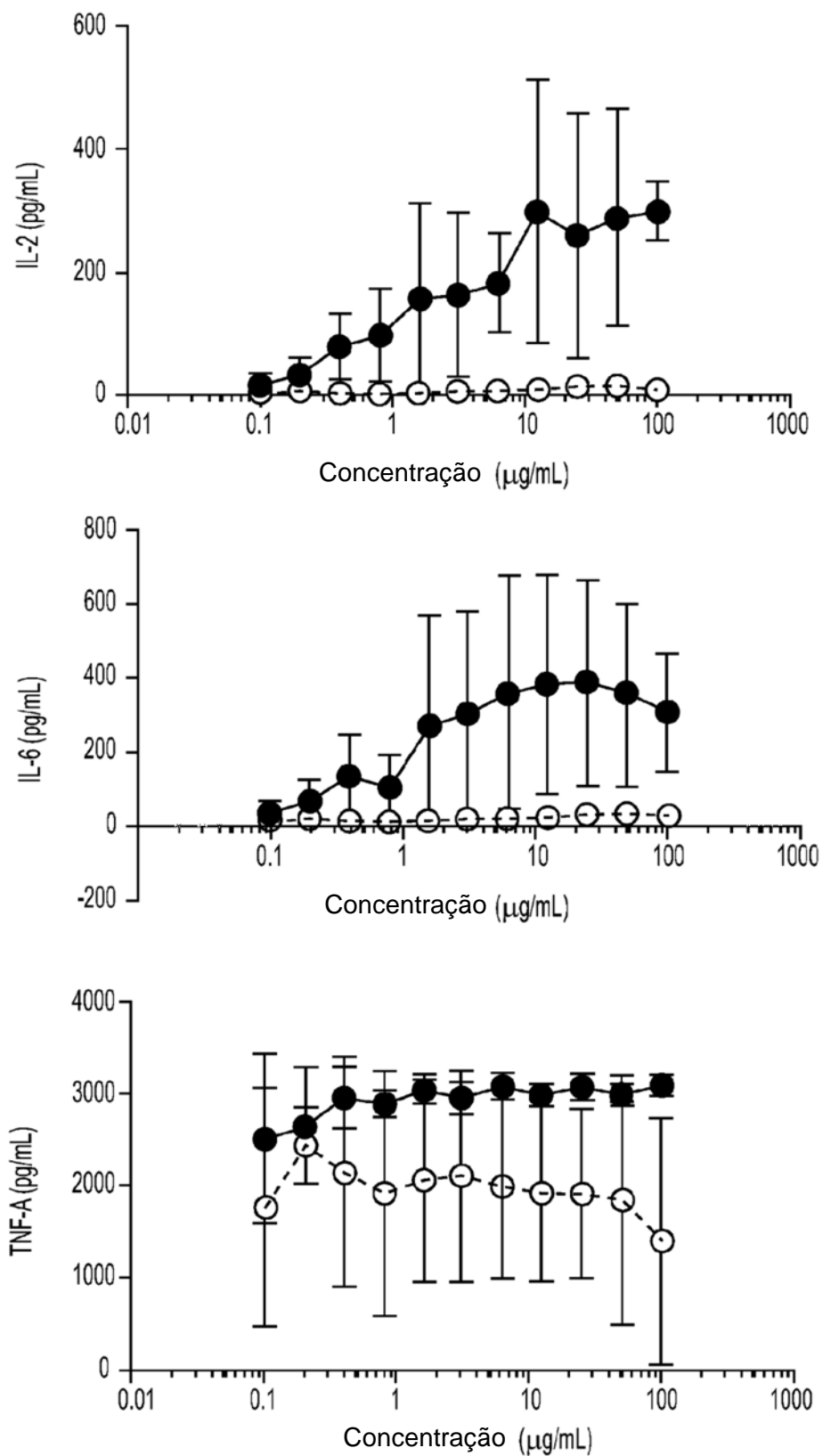


FIG. 23A
CONT.-2

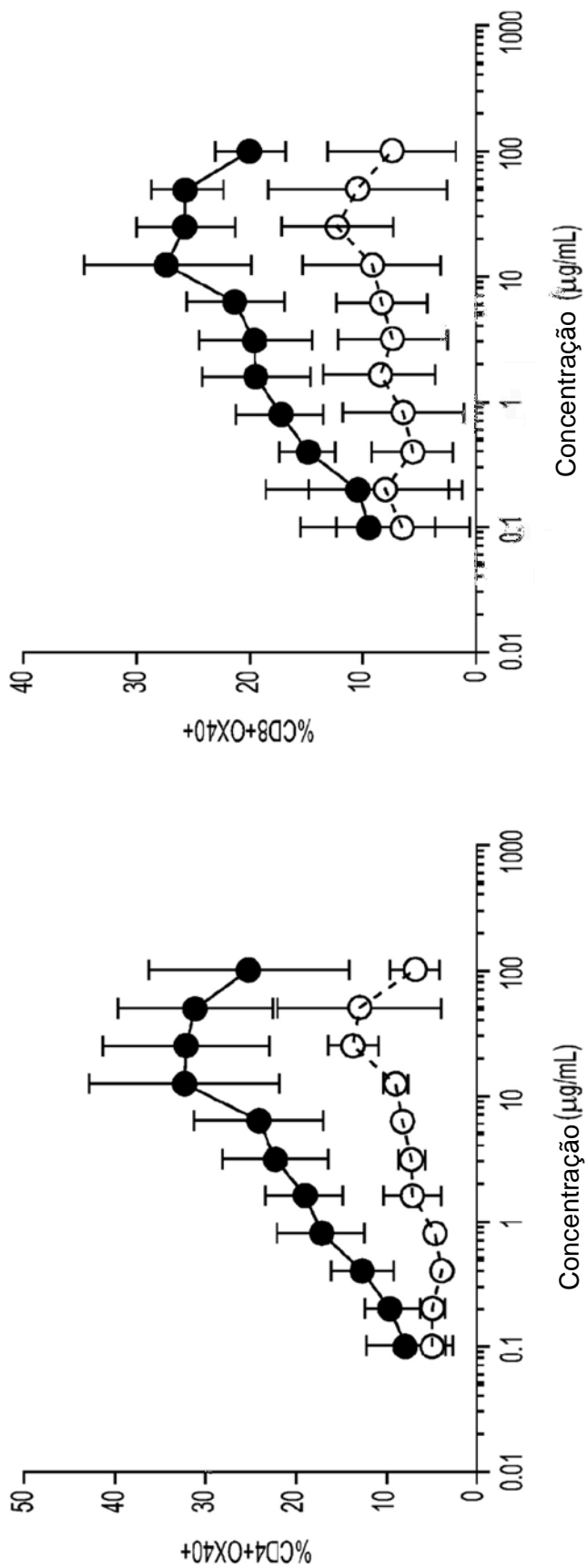


FIG. 23B

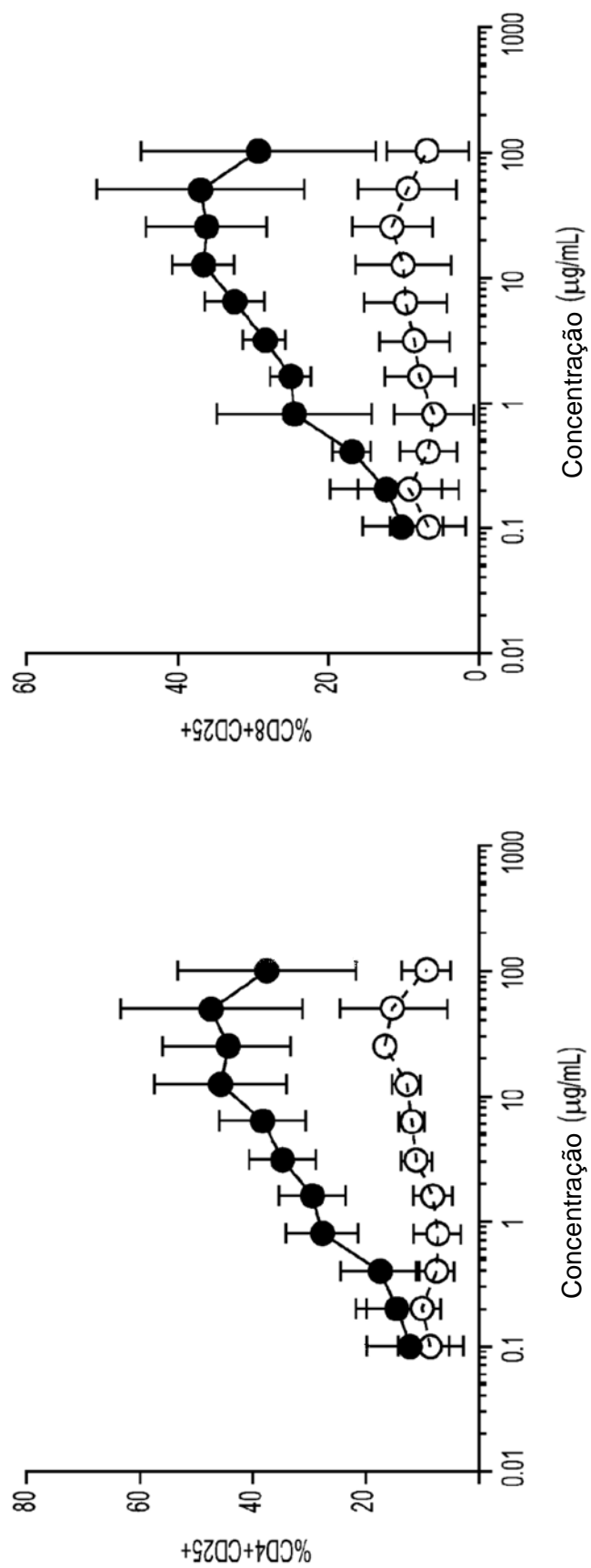


FIG. 23B CONT.-1

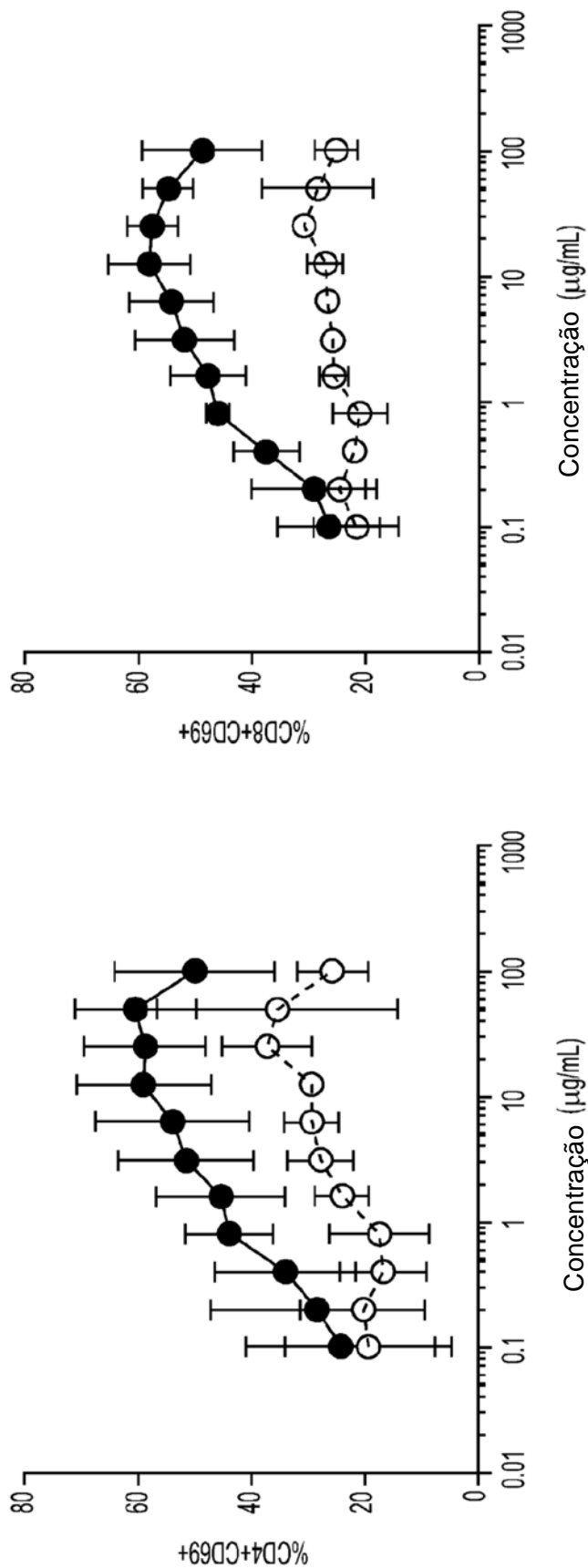


FIG. 23B CONT.-2

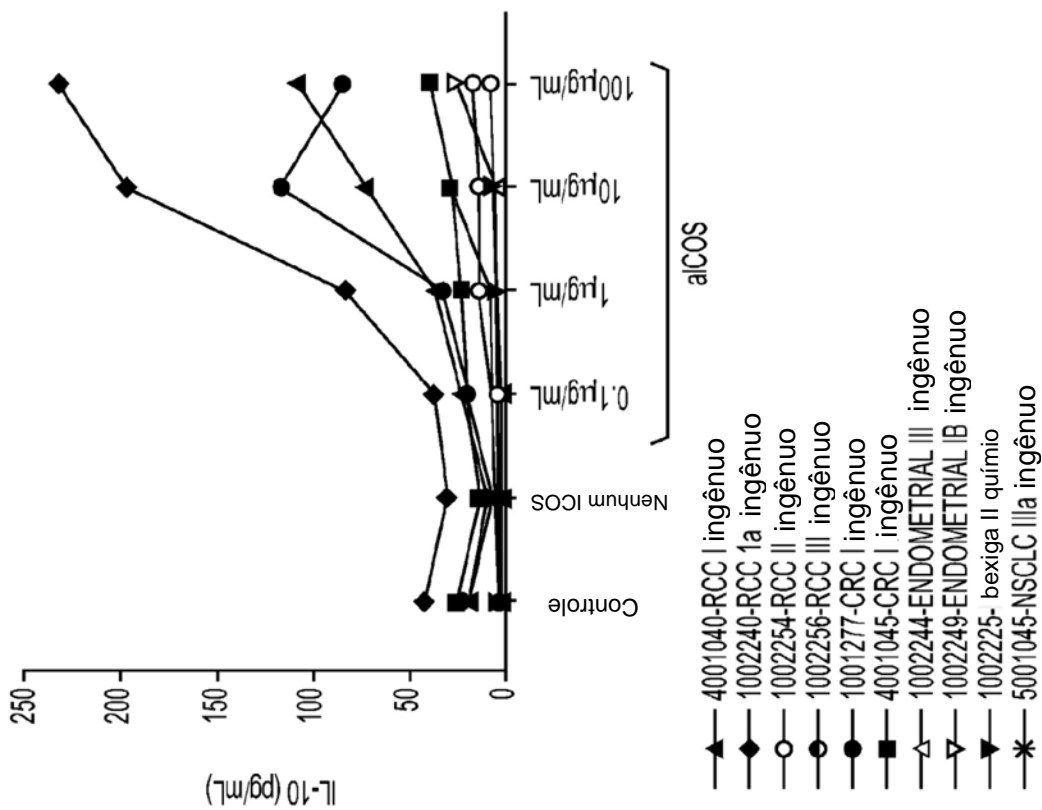


FIG. 24B

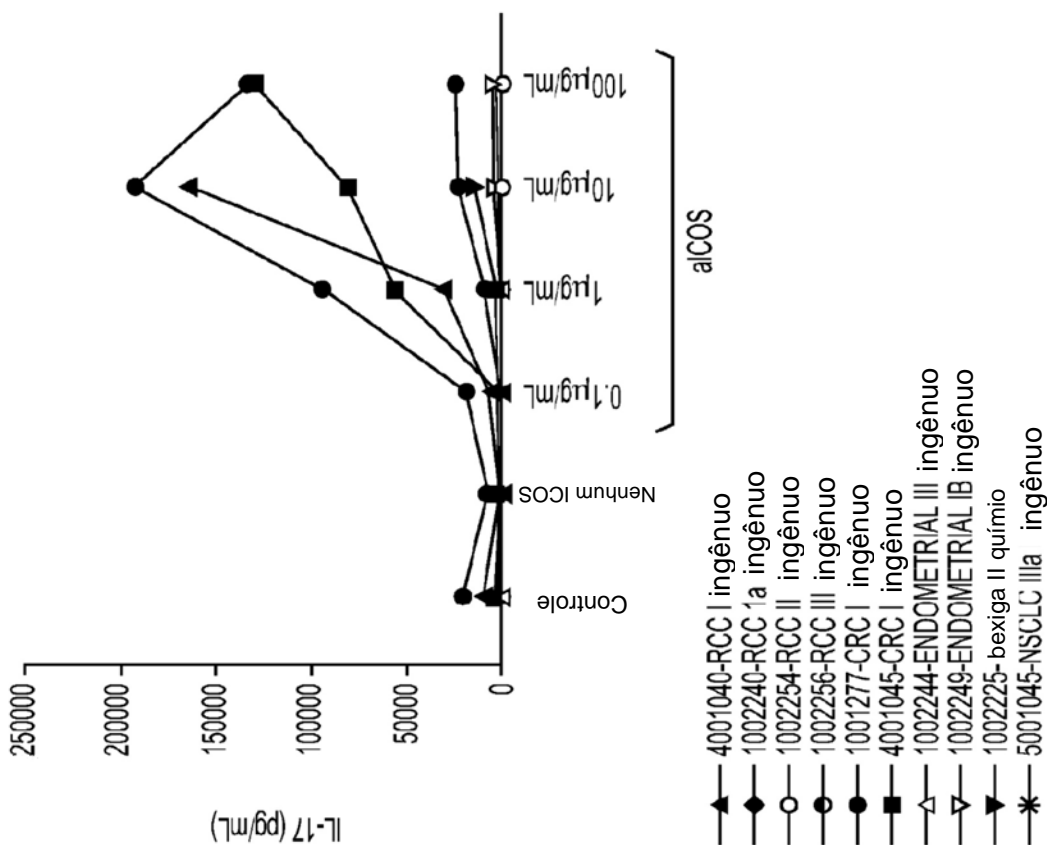


FIG. 24A

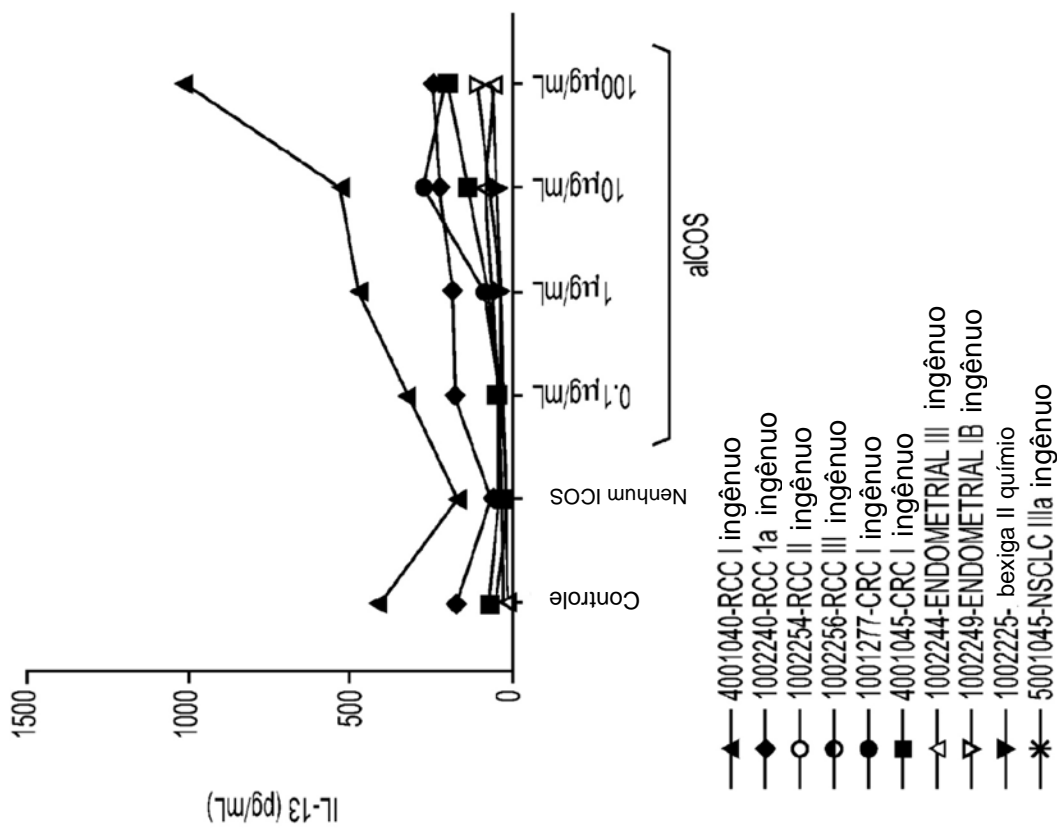


FIG. 24D

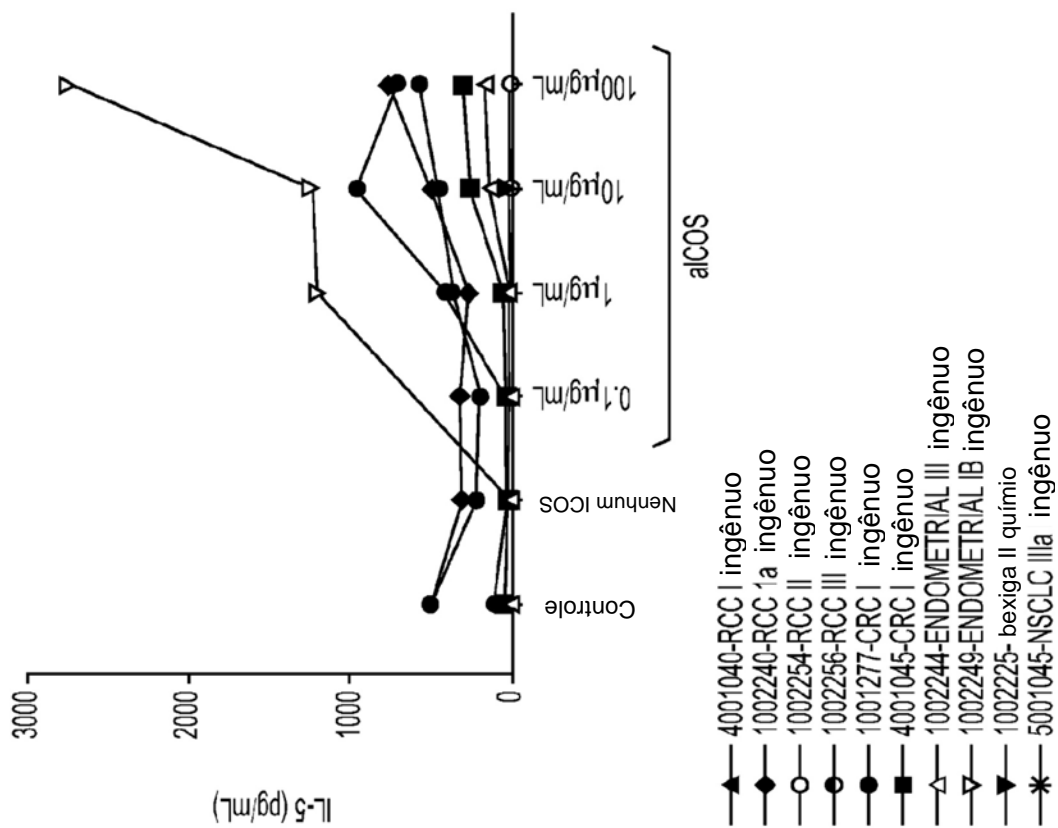


FIG. 24C

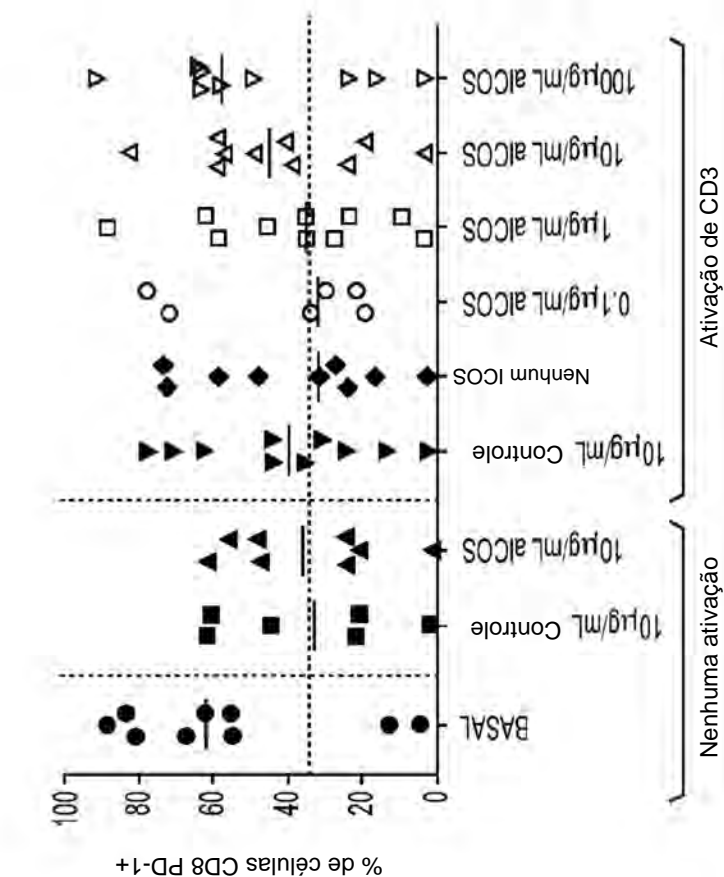


FIG. 25B

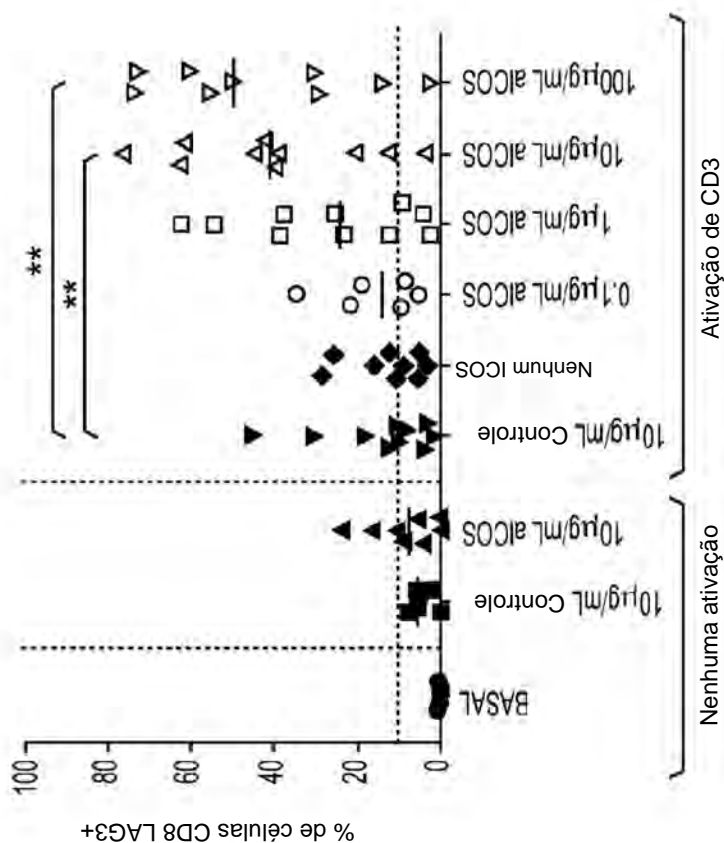


FIG. 25A

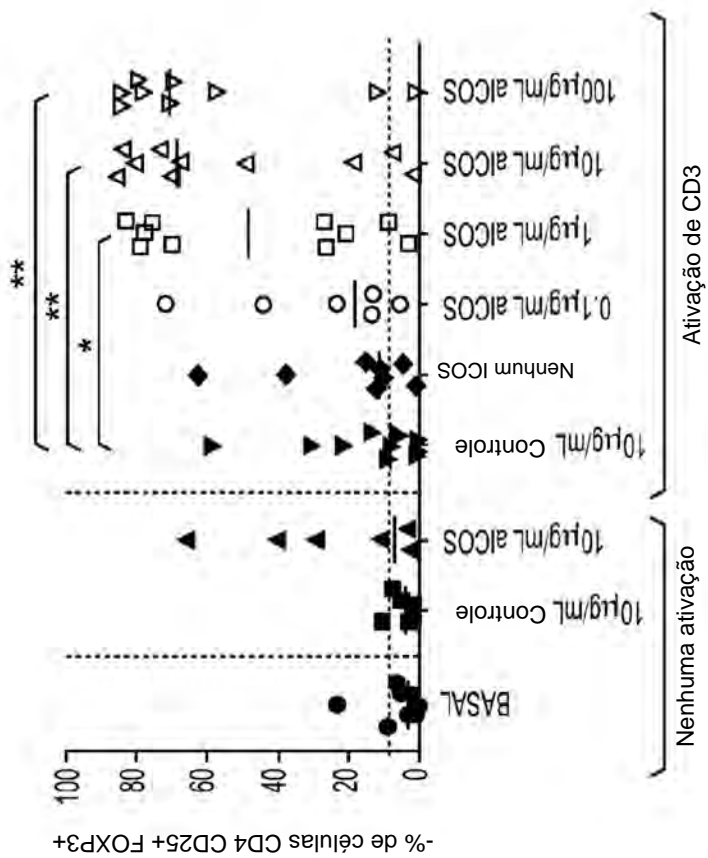


FIG. 25D

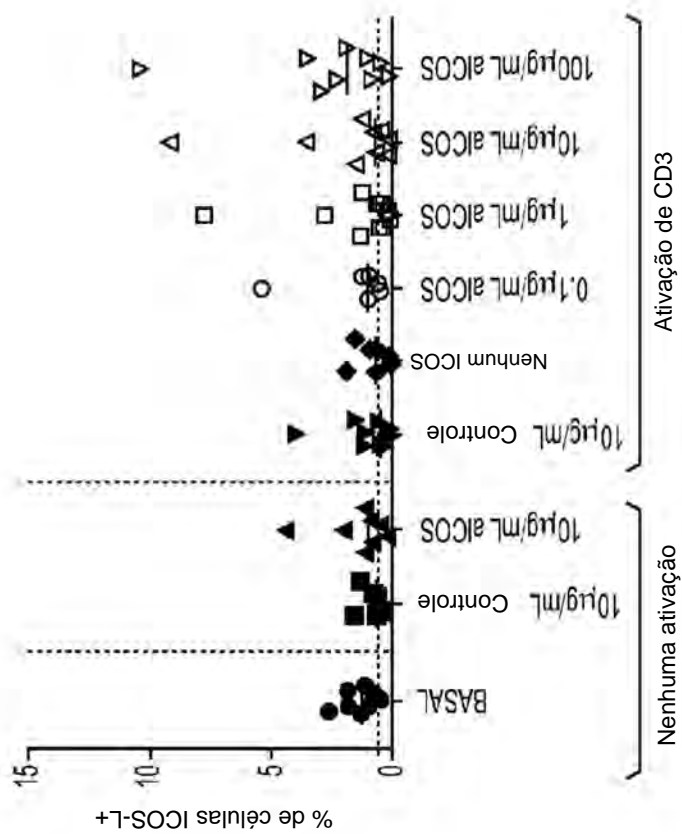
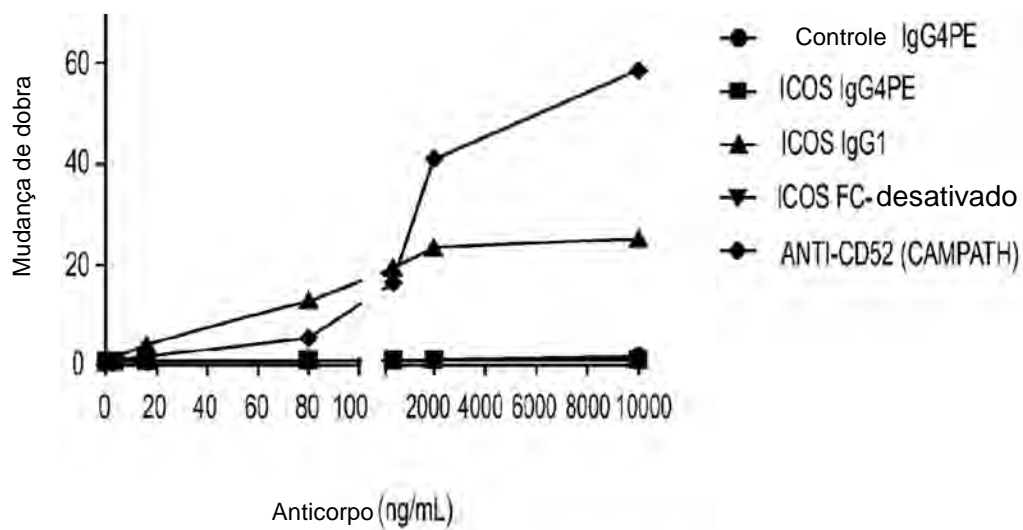


FIG. 25C

**FIG. 26A**

Alteração multiplicativa AT 10 ug/mL OF ANTI-LCOS IgGL			
	CD4 TEFF	CDB	TREGS
BREAST 1001202	3.7	1.3	5.4
THYROID 1001216	1.6	1.1	3.9
CRC 3001074	1.5		2.9
CRC 3001076	1.7	1.5	1.4
CRC 1002188		1.3	1.5
NSCLC 1001205	1.1	1.1	1.7
NSCLC 4001003	2.1	1.7	11.0
NSCLC 5001003	2.2	1.4	2.3
NSCLC 1001235	1.5	1.4	
NSCLC 4001006	1.5	0.8	3.5

FIG. 26B

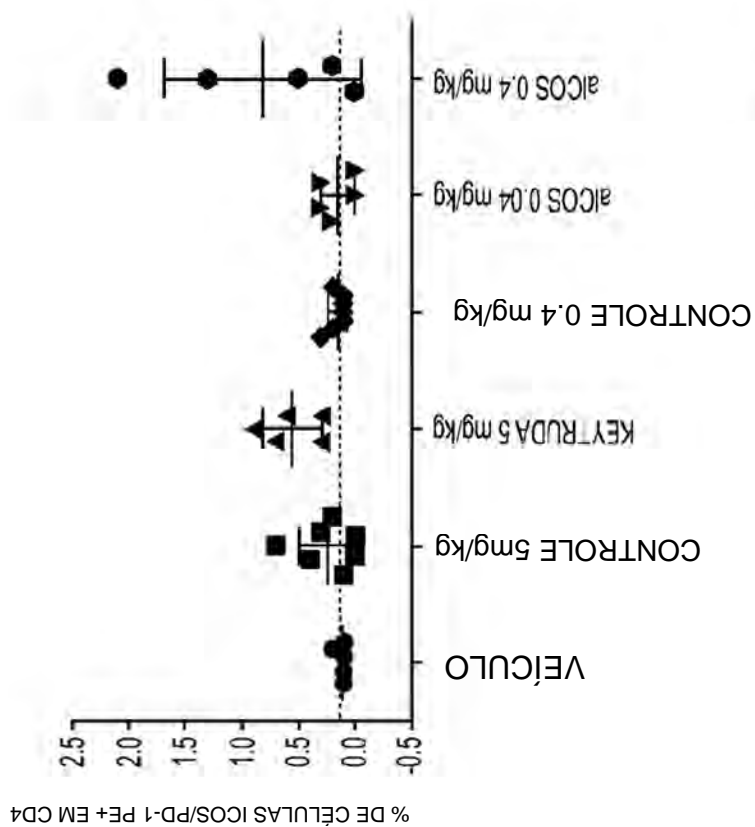
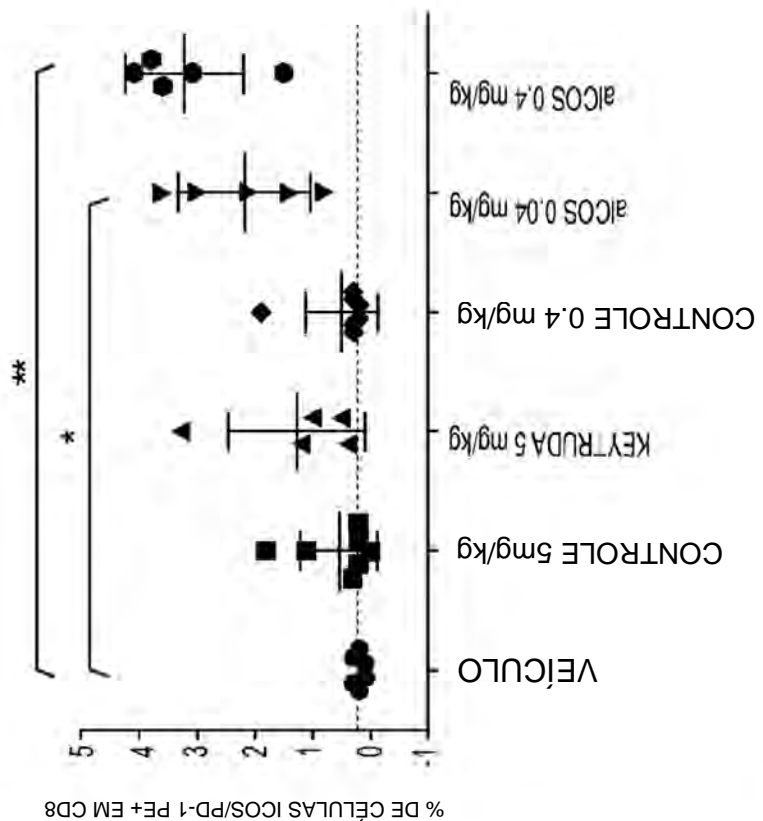


FIG. 27A

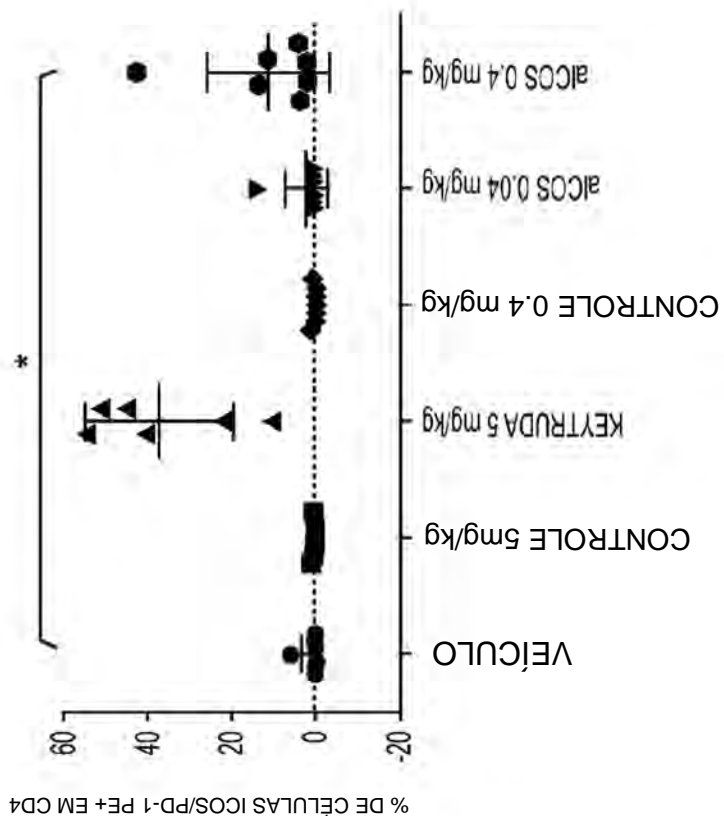
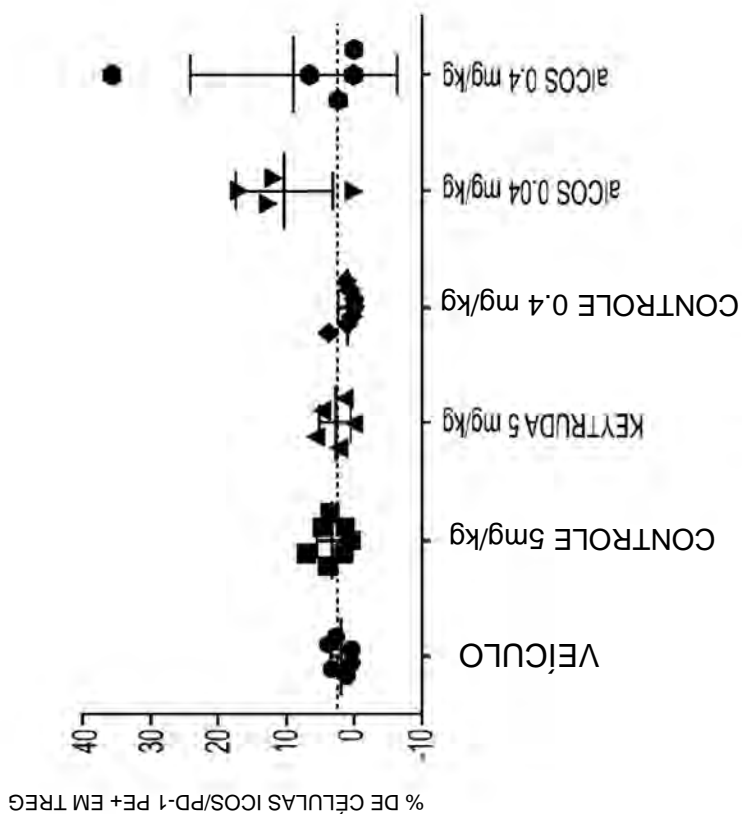


FIG. 27B



**FIG. 27A
CONT.**

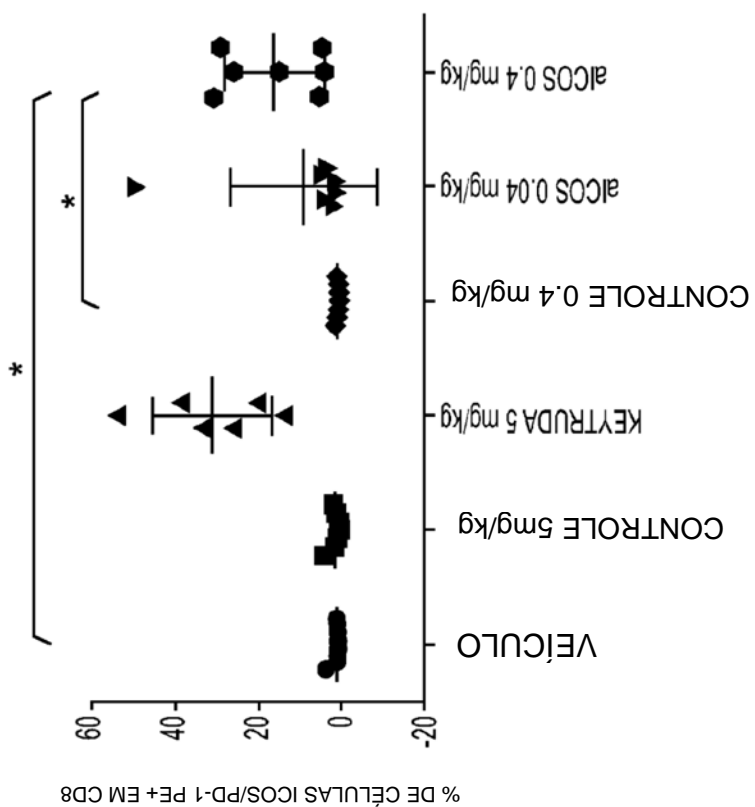
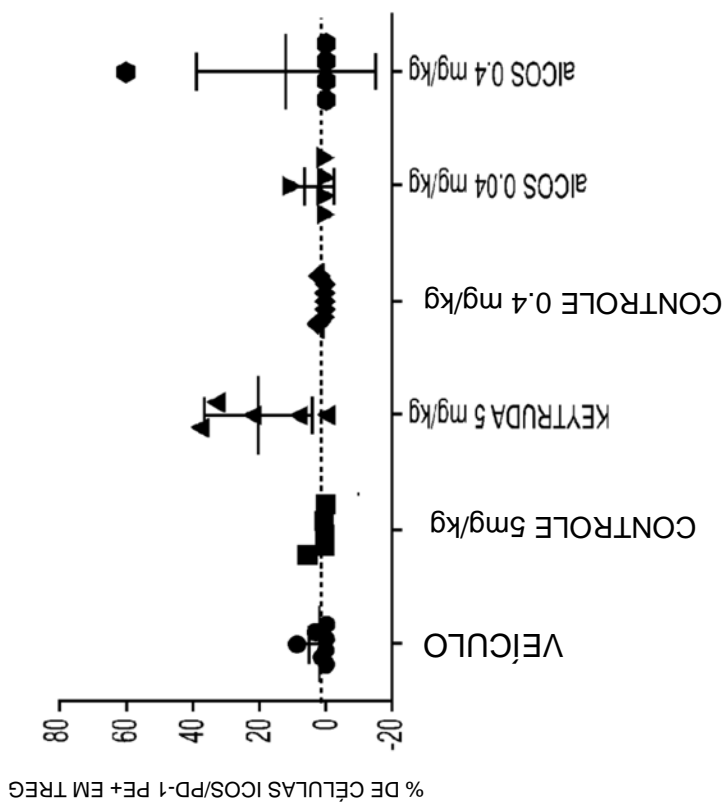
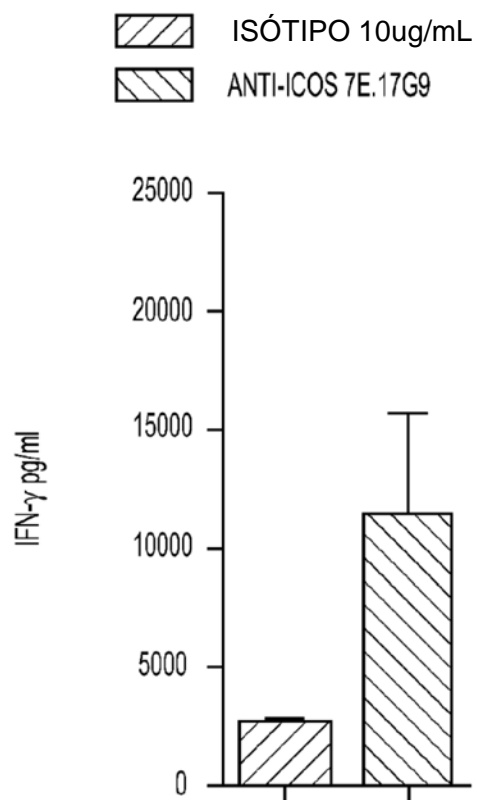


FIG. 27B
CONT.

**FIG. 28**

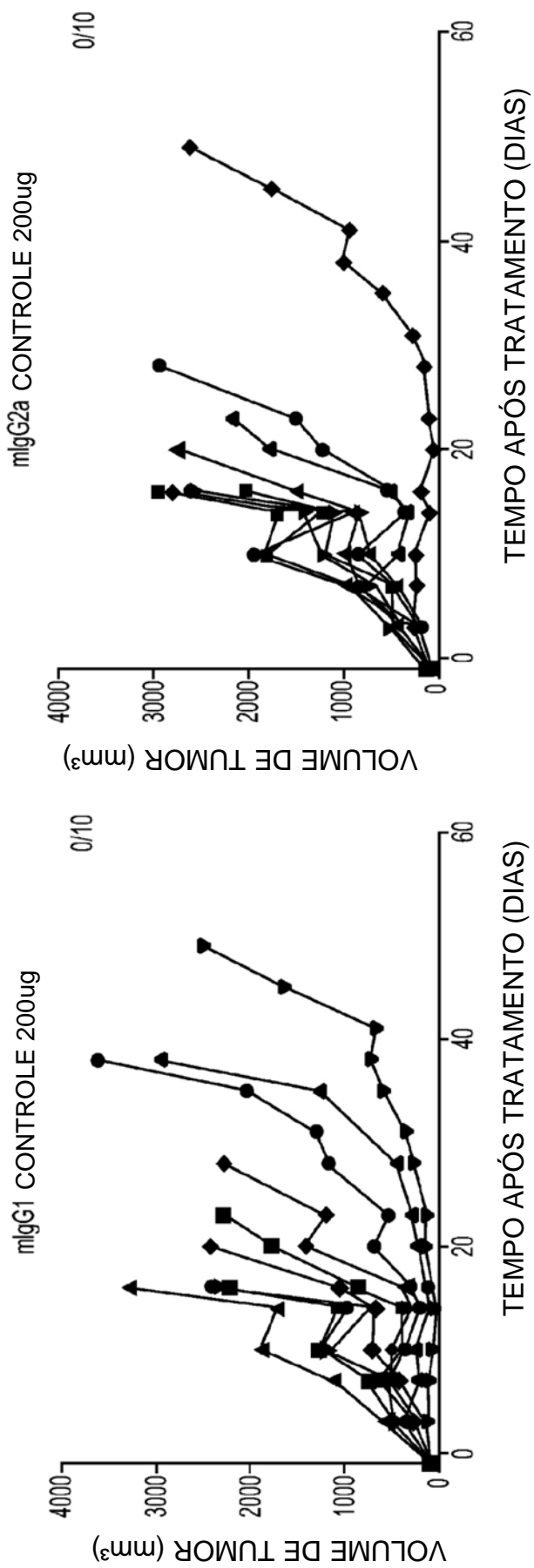


FIG. 29A

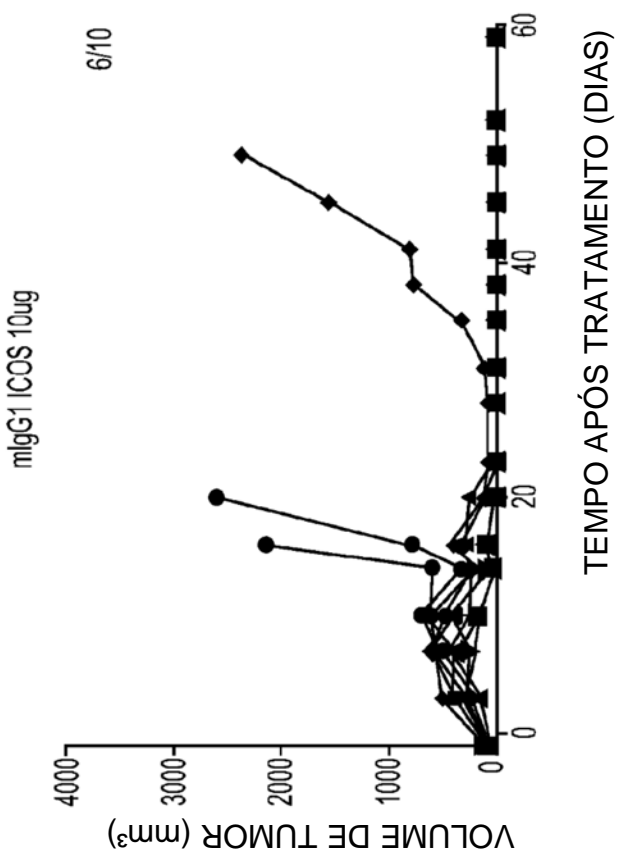
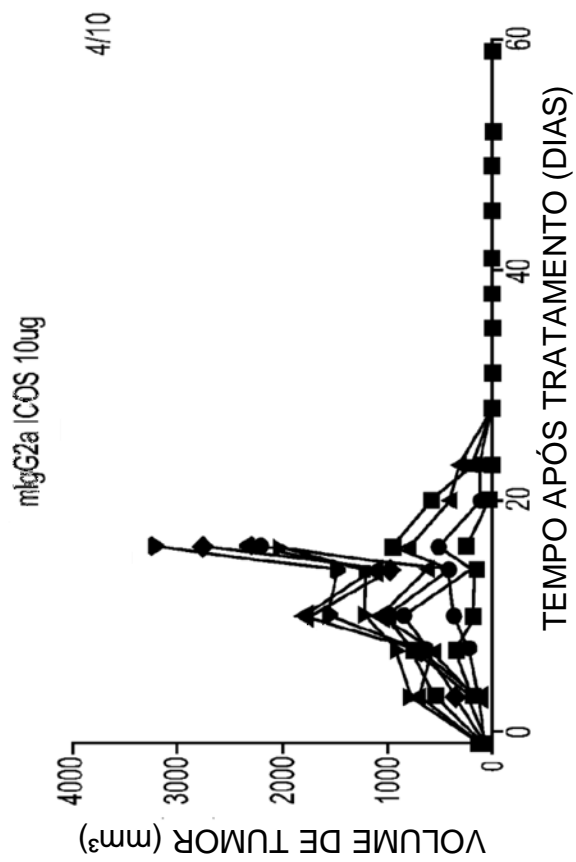


FIG. 29A
CONT. -1

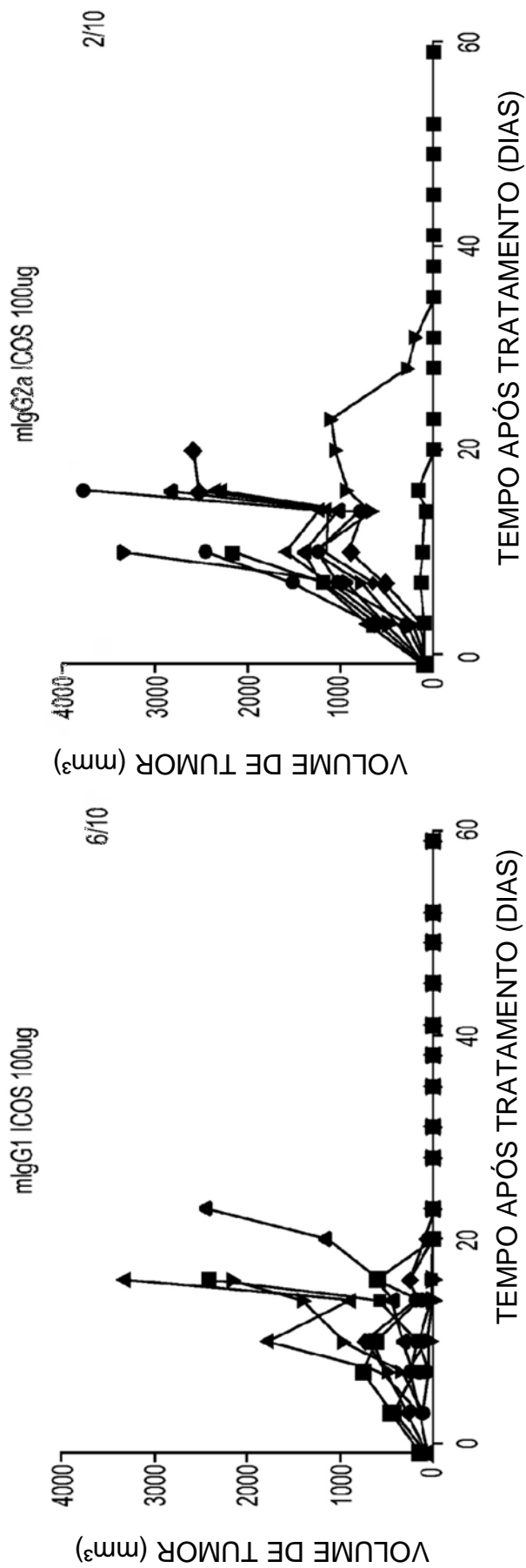


FIG. 29A
CONT. -2

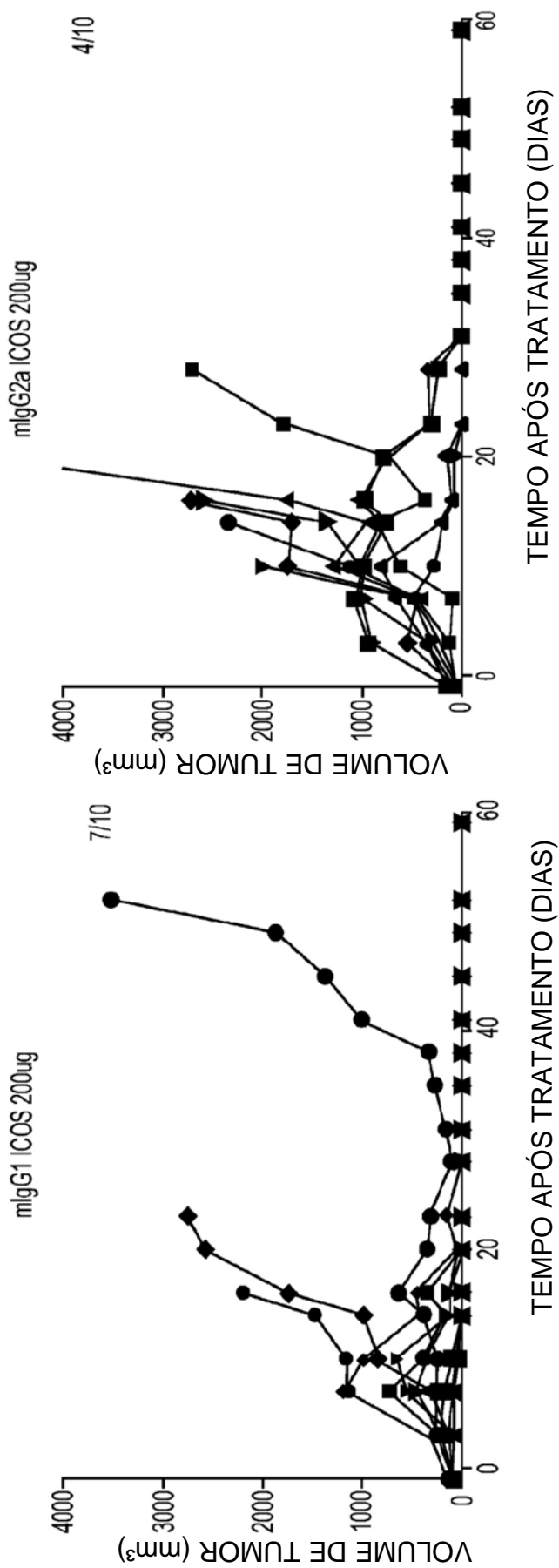


FIG. 29A
CONT. -3

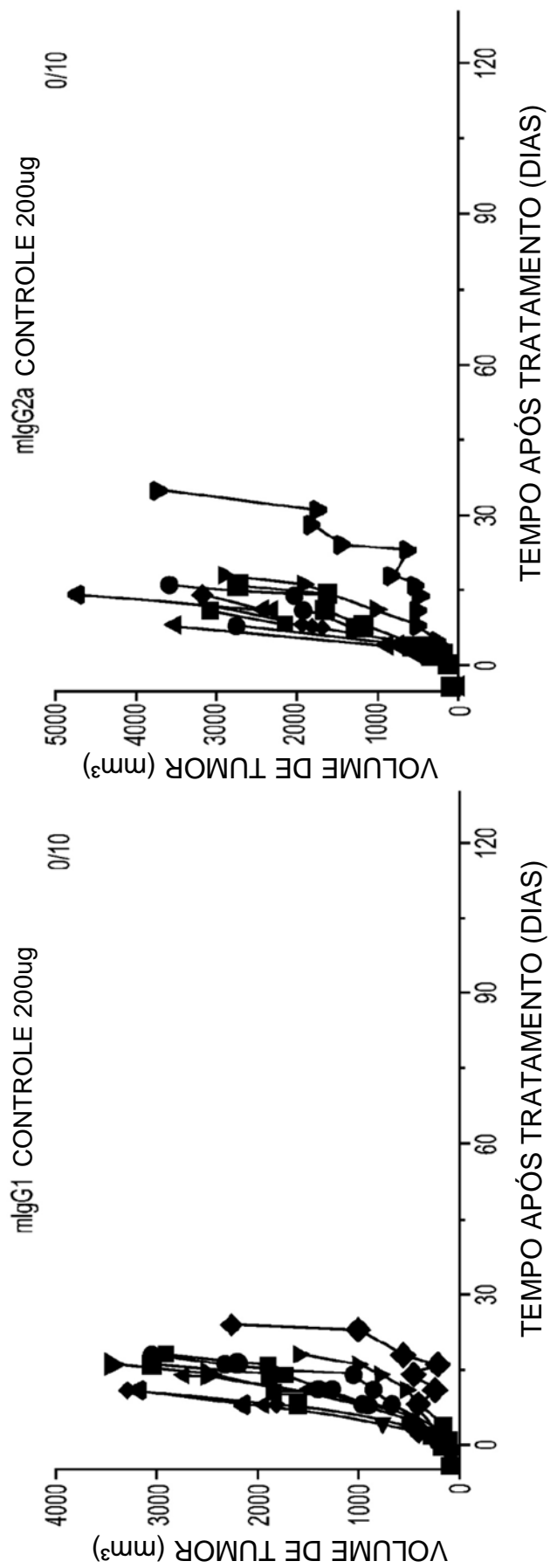


FIG. 29B

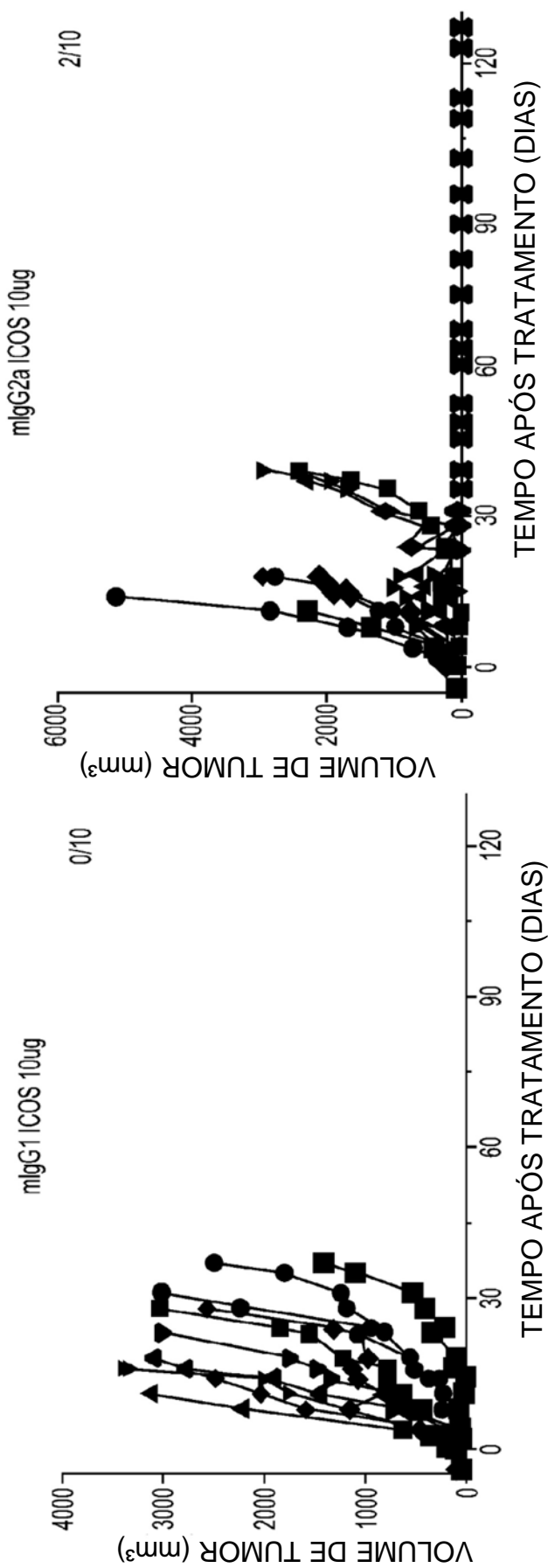


FIG. 29B
CONT. -1

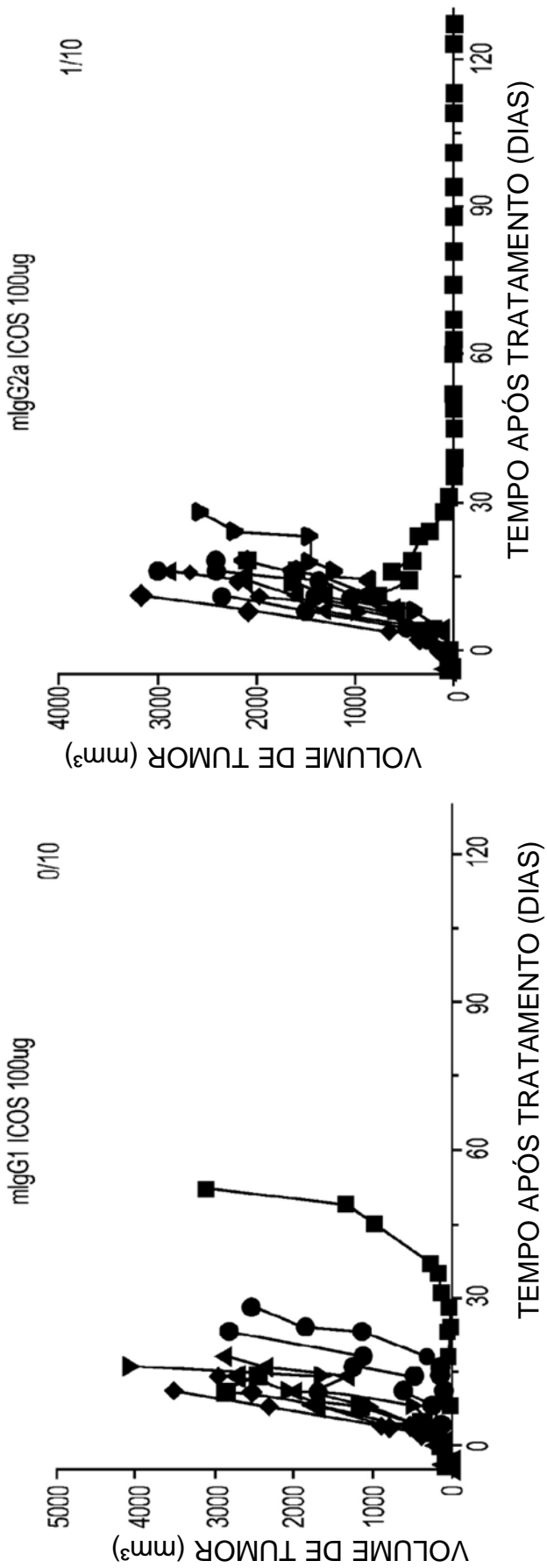


FIG. 29B
CONT. -2

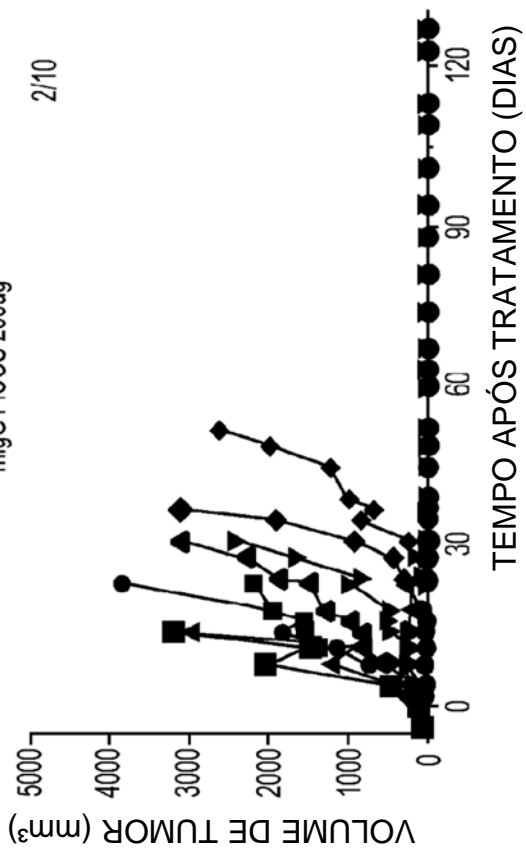
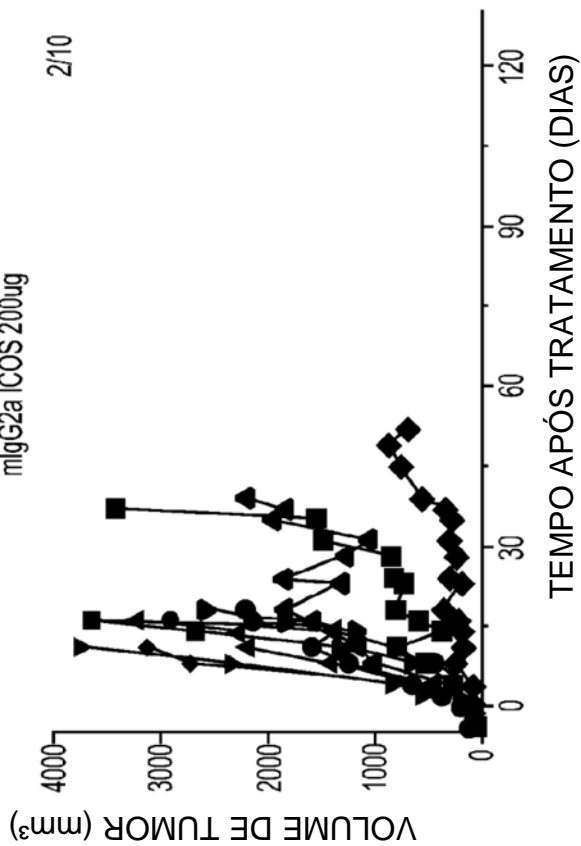


FIG. 29B
CONT. -3

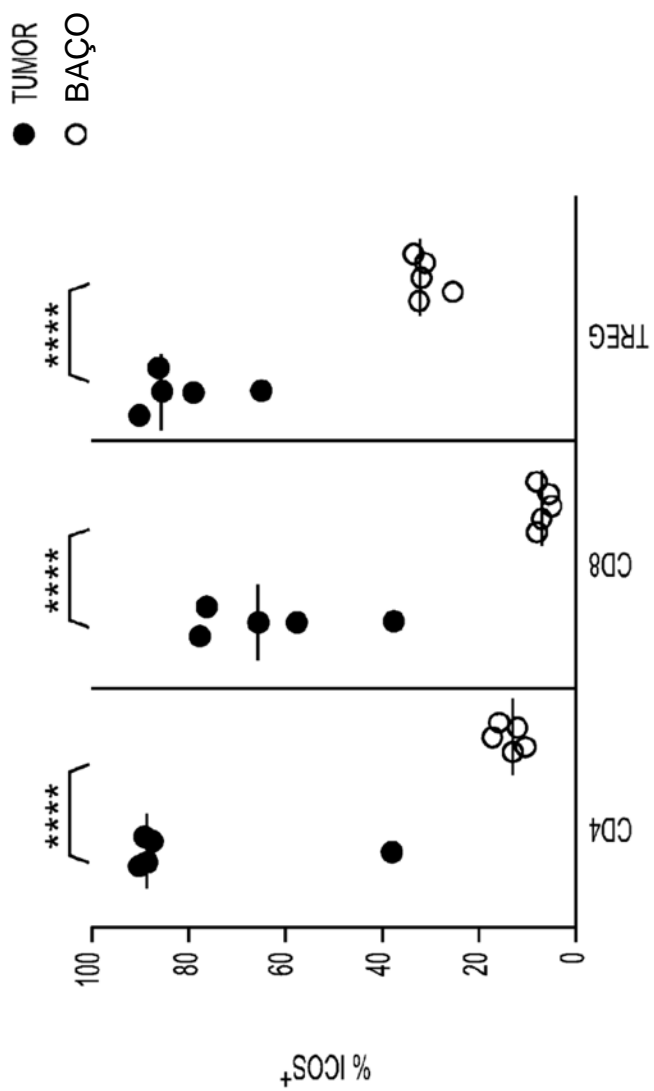


FIG. 30

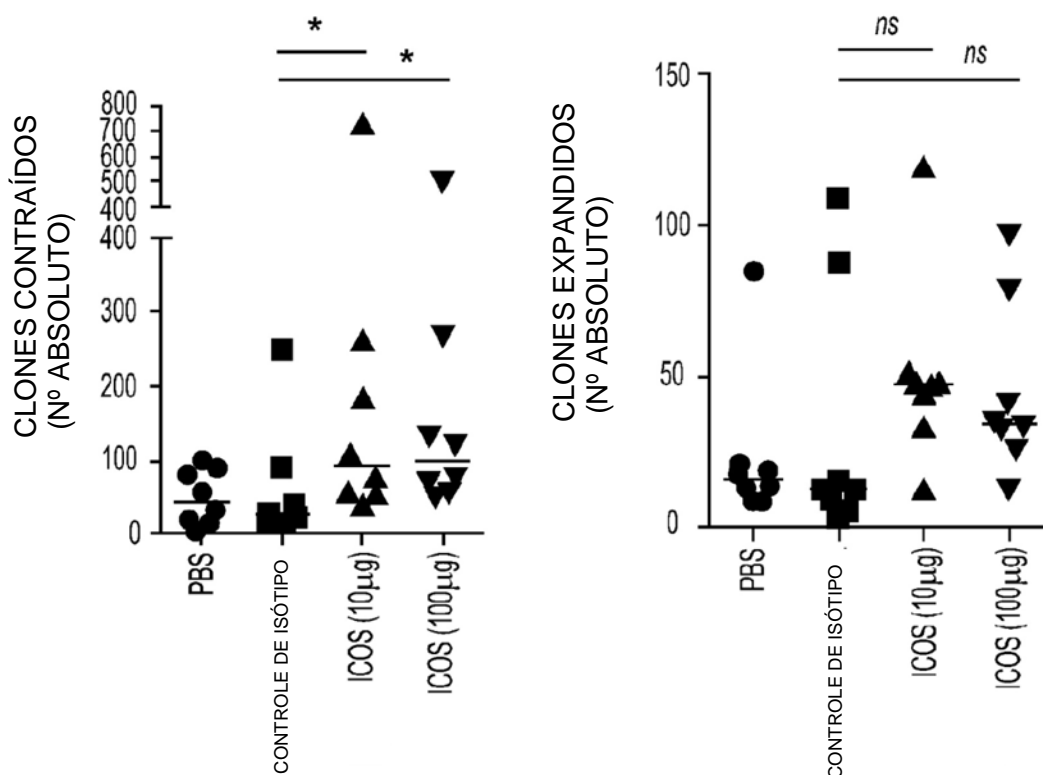


FIG. 31A

FIG. 31B

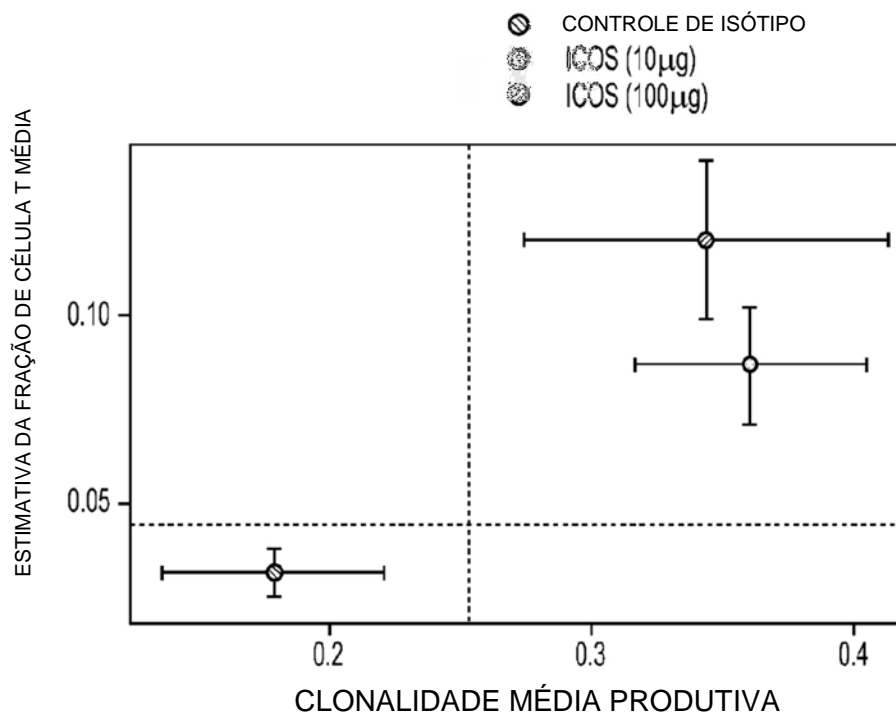


FIG. 31C

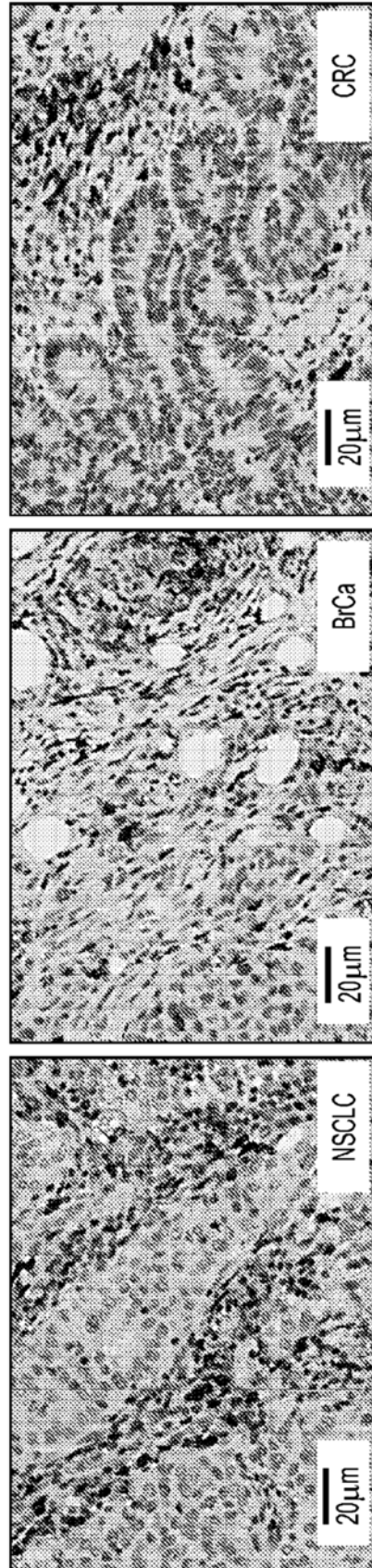


FIG. 32

CITOCINAS [pg/mL] PONTO DE TEMPO 48 H	CONTROLE DE ISÓTIPO					H2L5 IgG4PE				
	DOADOR 1	DOADOR 2	DOADOR 3	DOADOR 4	MEDIA DE CONTROLE DE ISÓTIPO DE DOADORES	DOADOR 1	DOADOR 2	DOADOR 3	DOADOR 4	MÉDIA DE DOADORES (H2L5)
IL-17a	17	88	25	224	89	7218	12559	19138	37022	18984
IL-6	48	41	7	50	36	1474	705	436	1430	1011
TNF α	5246	1765	1110	797	2229	30755	8507	10952	7590	14451
IL-10	163	45	5	19	58	4458	1687	519	3449	2528
IL-4	2	0.7	0.2	0.3	0.7	28	19	4	74	31
IL-5	41	26	1	22	22	594	340	295	637	466
IL-13	94	44	19	35	48	388	159	225	357	282
IFN γ	70	787	1022	1053	733	7927	26599	50384	199175	71021

FIG. 33

	DOADOR	CONTROLE DE ISÓTIPO	H2L5 IgG4PE
IL-2	NSCLC 1	4.32	124.86
	NSCLC 2	3.35	465.17
	NSCLC 3	ND	33.97
IL-4	NSCLC 1	ND	11.78
	NSCLC 2	ND	49.16
	NSCLC 3	ND	0.03
IL-5	NSCLC 1	2.23	481.71
	NSCLC 2	0.57	1988.48
	NSCLC 3	ND	1.13
IL-6	NSCLC 1	6.09	23.64
	NSCLC 2	2.08	215.82
	NSCLC 3	2.96	3.47
IL-10	NSCLC 1	0.71	126.19
	NSCLC 2	0.13	1289.07
	NSCLC 3	ND	0.84
IL-12p70	NSCLC 1	0.12	0.80
	NSCLC 2	0.12	3.16
	NSCLC 3	ND	ND
IL-13	NSCLC 1	1.52	38.77
	NSCLC 2	ND	179.91
	NSCLC 3	ND	1.67
IL-17	NSCLC 1	11.50	1512.24
	NSCLC 2	2.62	8464.85
	NSCLC 3	ND	1.57
TNF α	NSCLC 1	37.90	624.87
	NSCLC 2	40.52	3976.40
	NSCLC 3	1.98	306.37
IFN γ	NSCLC 1	49.02	6632.12
	NSCLC 2	92.69	105879.10
	NSCLC 3	8.66	11804.37

FIG. 34

ANTICORPOS	FC γ R I	FC γ R IIA H131	FC γ R IIA R131	FC γ R IIB	FC γ R IIIA V158	FC γ R IIIa F158
	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)
422 H2L5 IgG1 WT	60.8	405	662	1340	281	862
422 H2L5 IgG4PE	645	NB	2500	1470	NB	NB
422 Fc DESATIVADO	NB	NB	NB	NB	NB	NB
FIX Fc+ (CONTROLE DO TIPO SELVAGEM)	31.9	473	593	1450	203	718
FIX Fc- (CONTROLE DE Fc DESATIVADO)	NB	NB	NB	NB	NB	NB

FIG. 35

ISÓTIPO 7E.17G9	KD (M)			
	mFcgRI	mFcgRIIB	mFcgRIII	mFcgRIV
mLgG1	NB	6.70E-06	2.39E-06	NB
mLgG2a	3.03E-08	MUITO FRACO	1.40E-06	1.38E-07
mLgG2A Fc DESATIVADO	NB	MUITO FRACO	MUITO FRACO	MUITO FRACO
rlgG2b	1.49E-07	1.30E-06	1.38E-06	2.53E-07





	AFINIDADE FORTE (KD <1uM)
	AFINIDADE MÉDIA (KD >1uM)
	AFINIDADE MUITO FRACA (OS NIVEIS DE LIGAÇÃO EXCEDERAM A LIGAÇÃO NÃO ESPECÍFICA)
	NENHUMA LIGAÇÃO

FIG. 36

TIPO DE TUMOR	Nº TOTAL	ICOS+ (N)	ICOS+ (PER.)
H&N	426	157	36.9%
GÁSTRICO	285	75	26.3%
ESOFÁGICO	70	17	24.3%
MELANOMA (M)	295	69	23.4%
NSCLC(AD)	501	112	22.4%
NSCLC(SCC)	489	85	17.4%
CERVICAL	185	32	17.3%
MAMÁRIO	1048	162	15.5%
BEXIGA	244	35	14.3%
RCC	522	64	12.3%
MELANOMA (P)	82	7	8.5%
PÂNCREAS	85	7	8.2%
CÓLON	446	34	7.6%
TIREÓIDE	498	34	6.8%
HCC	191	11	5.8%
SARCOMA	103	4	3.9%
OVARIANO	412	13	3.2%
PRÓSTATA	336	10	3.0%
ENDOMETRIAL	532	15	2.8%
RETAL	163	4	2.5%
GBM	156	0	0.0%

FIG. 37

CATEGORIAS	NOME DO GENE	SUPRA OU INFRA REGULADO
FUNÇÃO DE CÉLULA T	CTLA4, PD-1, OX40, ICOSLG, CD7, DPP4, MAF, SOCS1, TBX21	SUPRA
CITOCINAS	IL2, 4, 9, 10, 13, 17A, 21, 24 ETC.	SUPRA
	IL16	INFRA
QUIMIOquinas	CCL20, CXCR5, IRF4, 8 ETC.	SUPRA
	IL11RA	INFRA
FAMÍLIA TNF	TNF α , TNFRSF8, 18, TNFSF8, 11, 14	SUPRA
CITOTOXICIDADE	GZMB	SUPRA

FIG. 38

RESUMO

MÉTODOS PARA TRATAR CÂNCER, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-ICOS OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, PARA FABRICAR UM ANTICORPO ANTI-PDL1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, ANTICORPO ANTI-ICOS OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD-L1 OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, USO DE UM ANTICORPO ANTI-ICOS OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO E UM ANTICORPO ANTI-PD1 OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, E, CÉLULA HOSPEDEIRA

A presente invenção provê métodos para tratar câncer em um paciente em necessidade do mesmo, o método compreendendo administrar ao paciente uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao ICOS humano e uma quantidade eficaz de um agente direcionado ao PD 1 humano ou PD-L1 humano sequencialmente. A presente invenção também provê um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo para o uso sequencial no tratamento de câncer em um ser humano em necessidade do mesmo. A presente invenção provê um anticorpo anti-ICOS ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo e um anticorpo anti-PD-L1 ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo para uso sequencial no tratamento de câncer em um ser humano em necessidade do mesmo.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 9920431375.txt
- Data de Geração do Código: 29/11/2019
- Hora de Geração do Código: 15:28:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: 9CAC13057902EA57
 - Campo 2: 7D12E48C5D1E9A6B