

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 4331604

DAL TITOLO:

“Anticorpi anti-PD-L1 e loro uso per potenziare la funzione dei linfociti T”

Depositata il:

*** **

DESCRIZIONE

Campo dell'Invenzione

Questa invenzione si riferisce in generale alla funzione immunitaria e al potenziamento della funzione dei linfociti T, inclusa la sovraregolazione delle risposte immunitarie cellulo-mediate e al trattamento di disturbi disfunzionali dei linfociti T.

Contesto dell'Invenzione

La co-stimolazione o la fornitura di due segnali distinti ai linfociti T è un modello ampiamente accettato di attivazione linfocitaria dei linfociti T a riposo mediante cellule presentanti l'antigene (APC). Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975). Questo modello prevede inoltre la discriminazione del self dal non-self e la tolleranza immunitaria. Bretscher et al., Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987). Il segnale primario, o segnale specifico dell'antigene, viene trasmesso tramite il recettore dei linfociti T (TCR) successivamente a riconoscimento del peptide antigenico estraneo presentato nel contesto del complesso principale di istocompatibilità (MHC). Il segnale secondario o co-stimolatorio viene distribuito ai linfociti T mediante molecole co-stimolatorie espresse su cellule presentanti l'antigene (APC), e inducono i linfociti T a promuovere l'espansione clonale, la secrezione di citochine e la funzione effettrice. Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996). In assenza di co-stimolazione, i linfociti T possono divenire refrattari alla stimolazione antigenica, non producono una risposta immunitaria efficace, e possono inoltre determinare l'esaurimento o la tolleranza verso antigeni estranei.

Il semplice modello a due segnali può essere una sovrasemplificazione perché la forza del segnale TCR effettivamente ha un'influenza quantitativa sull'attivazione e la differenziazione dei linfociti T. Viola et al., Science 273: 104-106 (1996); Sloan-Lancaster, Nature 363: 156-159 (1993). Inoltre, l'attivazione dei linfociti T può verificarsi persino in assenza del segnale co-stimolatorio se la forza del segnale TCR è elevata. In maniera più importante, i linfociti T ricevono segnali co-stimolatori secondari sia positivi sia negativi. La regolazione di tali segnali positivi e negativi è critica per massimizzare le risposte immunitarie protettive dell'ospite, pur mantenendo la tolleranza immunitaria e prevenendo

l'autoimmunità. Segnali secondari negativi sembrano necessari per l'induzione della tolleranza dei linfociti T, mentre i segnali positivi promuovono l'attivazione dei linfociti T. Mentre il modello semplice a due segnali fornisce ancora una spiegazione valida per i linfociti non ancora stimolati, la risposta immunitaria di un ospite è un processo dinamico, e segnali co-stimolatori possono anche essere forniti a linfociti T esposti all'antigene.

Il meccanismo di co-stimolazione è di interesse terapeutico perché la manipolazione dei segnali co-stimolatori ha mostrato di fornire un mezzo per o potenziare o terminare la risposta immunitaria basata su cellule. Recentemente, è stato scoperto che la disfunzione dei linfociti o anergia si verifica contemporaneamente all'espressione indotta e prolungata del recettore inibitorio, il polipeptide della morte programmata 1 (PD-1). Come risultato, prendere come bersaglio terapeutico PD-1 e altre molecole che segnalano tramite interazioni con PD-1, come il ligando 1 della morte programmata (PD-L1) e il ligando 2 della morte programmata (PD-L2) è un'area di intenso interesse. Latchman et al., Nature Immunol. 2: 261-268 (2001) hanno descritto PD-L2 come un secondo ligando per PD-1. L'espressione di PD-L1 è stata dimostrata in situ su un'ampia varietà di tumori solidi, si veda per esempio Dong et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002). Studi in modelli animali dimostrano che l'espressione di PD-L1 sui tumori inibisce l'attivazione dei linfociti T e la lisi delle cellule tumorali; si veda, per esempio, Hirano et al., Cancer Res. 65: 1089-96 (2005). Barber et. al, Nature 439:682-7 (2006) hanno descritto che gli anticorpi che bloccavano il legame PD-1: PD-L1 determinavano risposte dei linfociti T migliorate e una riduzione del carico virale in un modello murino.

L'inibizione, tra l'altro, della segnalazione di PD-L1 è stata proposta come mezzo per potenziare l'immunità dei linfociti T per il trattamento del cancro (per esempio, immunità tumorale) e di infezione, inclusa sia l'infezione acuta sia cronica (per esempio, persistente). WO 2007/005874 descrive alcuni anticorpi anti-PD-L1 umano ottenuti usando un topo KM. È stato segnalato che questi anticorpi bloccano l'interazione PD-L1/PD-1 umano in vitro. WO 2008/071447, tra l'altro, descrive nanobody specifici per B7-H1 che sono ottenuti tramite screening di librerie. US 2003/039653 esamina metodi per potenziare la reattività di un linfocita T nei mammiferi e propone recettori per B7-H1 o anticorpi che legano B7-H1 a questo scopo. EP-A1 1537 878 propone l'inibizione dei segnali immunosoppressivi indotti da PD-1, PD-1 o PD-L2 per trattare un cancro e infezioni per cui, tra l'altro, a questo scopo vengono proposti anticorpi contro PD-1, PD-1 o PD-L2. Comunque, dato che un agente terapeutico ottimale diretto verso un bersaglio in questo percorso non è stato ancora commercializzato, esiste un significativo bisogno medico insoddisfatto.

Sommario dell'Invenzione

Nella presente sono descritti anticorpi anti-PD-L1, incluso l'acido nucleico che codifica e composizioni contenenti tali anticorpi, e il loro uso per potenziare la funzione dei linfociti T per sovraregolare le risposte immunitarie cellulo-mediate e il trattamento dei disturbi disfunzionali dei linfociti T, inclusa l'infezione (per esempio, acuta e cronica) e l'immunità tumorale.

L'invenzione si riferisce alle rivendicazioni allegate.

Di conseguenza, la presente invenzione fornisce un anticorpo anti-PD-L1 a lunghezza intera bloccante e isolato comprendente una sequenza della regione variabile della catena pesante e della catena leggera, in cui:

(a) la catena pesante comprende una HVR-H1, HVR-H2 e HVR-H3, in cui inoltre:

- (i) la sequenza di HVR-H1 è GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:1);
- (ii) la sequenza di HVR-H2 è AWIX₂PYGGGX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:2);
- (iii) la sequenza di HVR-H3 è RHWPGGFDY e (SEQ ID NO:3);

(b) la catena leggera comprende una HVR-L1, HVR-L2 e HVR-L3, in cui inoltre:

- (iv) la sequenza di HVR-L1 è RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 8);
- (v) la sequenza di HVR-L2 è SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO: 9);
- (vi) la sequenza di HVR-L3 è QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 10) in cui X₁ = D, X₂ = S e X₃ = T, X₄ = D, X₅ = V, X₆ = S, X₇ = A e X₈ = V, X₉ = F e X₁₀ = Y, X₁₁ = Y, X₁₂ = L, X₁₃ = Y, X₁₄ = H e X₁₅ = A, e comprendente inoltre:

- (c) sequenze comice di catena pesante della regione variabile giustapposte tra le HVR secondo la formula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e
- (d) sequenze comice di catena leggera della regione variabile giustapposte tra le HVR secondo la formula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4),

in cui le sequenze comice di (c) e (d) sono derivate da sequenze comice di consenso umane, in cui la sequenza comice di consenso VH è una sequenza comice di consenso del sottogruppo III di Kabat e la sequenza comice di consenso VL è una sequenza comice di consenso kappa I di Kabat.

La presente invenzione si riferisce anche a una composizione comprendente l'anticorpo anti-PD-L1 isolato e bloccante e almeno un carrier farmaceuticamente accettabile.

Di conseguenza, nell'HVR-H1 dell'anticorpo anti-PD-L1 rivendicato X₁ è D; e nell'HVR-H2 dell'anticorpo anti-PD-L1 X₂ è S e X₃ è T. Inoltre, nell'HVR-L1 dell'anticorpo anti-PD-L1 rivendicato X₄ è D; X₅ è V; X₆ è S; X₇ è A e X₈ è V, nell'HVR-L2 dell'anticorpo anti-PD-L1 X₉ è F; X₁₀ è Y e nell'HVR-L3 dell'anticorpo anti-PD-L1 rivendicato X₁₁ è Y; X₁₂ è L; X₁₃ è Y; X₁₄ è H; X₁₅ è A. L'anticorpo anti-PD-L1 dell'invenzione comprende inoltre sequenze comice di catena pesante della regione variabile giustapposte tra le HVR secondo la formula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-

(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Le sequenze comice sono derivate da sequenze comice di consenso umane, per la precisione da sequenze comice di consenso del sottogruppo III di VH. Le sequenze comice di consenso del sottogruppo III di VH possono essere le seguenti:

HC-FR1 è EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2 è WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3 è RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4 è WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:7)

L'anticorpo anti-PD-L1 comprende inoltre sequenze comice di catena leggera della regione variabile giustapposte tra le HVR secondo la formula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Le sequenze comice di catena leggera sono derivate da sequenze comice di consenso umane e sono sequenze comice di consenso di kappa I di VL. La sequenza comice di catena leggera può essere la seguente:

LC-FR1 è DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2 è WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3 è GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4 è FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)

Di conseguenza, la regione variabile della catena pesante comprende una o più sequenze comice giustapposte tra le HVR come: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e la regione variabile della catena leggera comprende una o più sequenze comice giustapposte tra le HVR come: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4).

L'anticorpo anti-PD-L1 comprende inoltre una regione costante di IgG1 umana. L'anticorpo può avere una funzione effettrice ridotta o minima. La funzione effettrice minima può risultare da una "mutazione Fc inefficace" o aglicosilazione. La mutazione Fc inefficace può essere una sostituzione N297A o D265A/N297A nella regione costante.

Un anticorpo anti-PD-L1 isolato dell'invenzione può comprendere una sequenza di regione variabile di catena pesante e una di catena

leggera, in cui:

(a) la sequenza di catena pesante ha la sequenza di catena pesante:

QGTLVTVSA (SEQ ID NO:20),

(b) la sequenza di catena leggera ha la sequenza di catena leggera:

NO:21).

L'invenzione fornisce anche composizioni comprendenti l'anticorpo anti-PD-L1 isolato e bloccante dell'invenzione in combinazione con almeno un carrier farmaceuticamente accettabile.

Nella presente viene descritto anche un acido nucleico isolato che codifica una sequenza di regione variabile di catena leggera o una di catena pesante dell'anticorpo anti-PD-L1 dell'invenzione.

L'acido nucleico può comprendere inoltre un vettore adatto per l'espressione dell'acido nucleico codificante uno qualsiasi degli anticorpi anti-PD-L1 isolati e bloccanti dell'invenzione. Il vettore può comprendere una cellula ospite adatta per l'espressione dell'acido nucleico. La cellula ospite può essere una cellula eucariotica o una cellula procariotica. La cellula eucariotica può essere una cellula di mammifero, come di Ovaio di Criceto Cinese (CHO).

Nella presente viene anche descritto un processo per realizzare l'anticorpo anti-PD-L1 dell'invenzione comprendente coltivare una cellula ospite contenente un acido nucleico codificante l'anti-PD-L1 della presente invenzione in una forma opportuna per l'espressione, in condizioni opportune per produrre tale anticorpo o frammento, e recuperare l'anticorpo.

Nella presente viene anche descritta una composizione comprendente l'anticorpo anti-PD-L1 dell'invenzione e almeno un carrier farmaceuticamente accettabile.

Viene anche descritto un articolo di manifattura comprendente un contenitore che racchiude una quantità terapeuticamente efficace di una composizione descritta qui e un foglietto illustrativo indicante l'uso per il trattamento di un disturbo disfunzionale dei linfociti T.

Viene anche descritto un articolo di manifattura comprendente una qualsiasi delle composizioni anti-PD-L1 della presente invenzione in combinazione con almeno una molecola di BNCA. Le molecole BNCA possono essere un anticorpo, un frammento anticorpale legante l'antigene, un oligopeptide BNCA, RNAi BNCA o una piccola molecola BNCA. La molecola costimolatrice B7 negativa può essere scelta dal gruppo che consiste di: CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7.1, B7-H3 e B7-H4.

L'articolo di manifattura comprende le composizioni anti-PD-L1 in combinazione con un agente chemioterapico. L'agente chemioterapico può essere gemcitabina.

Viene anche descritto un articolo di manifattura comprendente uno qualsiasi degli anticorpi anti-PD-L1 isolati e bloccanti della presente invenzione in combinazione con uno o più agonisti di una molecola costimolatrice positiva. Una molecola costimolatrice positiva può essere una molecola costimolatrice della famiglia B7. La molecola costimolatrice positiva può essere scelta dal gruppo che consiste di CD28, CD80, CD86, ICOS/ICOSL. La molecola costimolatrice positiva può essere una molecola costimolatrice della famiglia TNFR. La molecola costimolatrice TNFR può essere scelta dal gruppo che consiste di: OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L e HVEM/LIGHT, e frammenti solubili, costrutti e loro anticorpi agonisti.

Viene anche descritto un articolo di manifattura comprendente gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione in combinazione con uno o più antibiotici. L'antibiotico può essere scelto dal gruppo che consiste di un agente antivirale, un agente anti-batterico, un agente anti-fungino, un agente anti-protozoi.

L'agente antivirale può essere scelto dal gruppo che consiste di inibitori della trascrittasi inversa, inibitori della proteasi, inibitori dell'integrasi, inibitori dell'ingresso o della fusione, inibitori della maturazione, inibitori del rilascio virale, potenziatori della risposta immunitaria, potenziatori sinergici antivirali, vaccini, agonisti epatici e terapie con erbe. La combinazione può comprendere una o più categorie di agenti antivirali.

Viene anche descritto un articolo di manifattura comprendente gli anticorpi anti-PD-L1 della presente invenzione in combinazione con uno o più vaccini.

Viene anche descritto un procedimento per potenziare la funzione dei linfociti T comprendente somministrare una quantità efficace degli anticorpi anti-PD-L1 o delle composizioni della presente invenzione. L'anticorpo anti-PD-L1 o la composizione può rendere non disfunzionali i linfociti T disfunzionali.

Viene anche descritto un procedimento per trattare un disturbo disfunzionale dei linfociti T comprendente somministrare una quantità terapeuticamente efficace degli anticorpi anti-PD-L1 o delle composizioni dell'invenzione. Il disturbo disfunzionale dei linfociti T può essere un'infezione o un'immunità tumorale. L'infezione può essere acuta o cronica. L'infezione cronica può essere persistente, latente o lenta. L'infezione cronica può risultare da un patogeno scelto dal gruppo che consiste di batteri, virus, funghi e protozoi. Il livello patogeno nell'ospite può essere ridotto. In ancora un ulteriore aspetto, il procedimento comprende inoltre il trattamento con un vaccino. Il procedimento può

comprendere inoltre il trattamento con un antibiotico. Il patogeno può essere un batterio, e il procedimento può comprendere inoltre la somministrazione di un agente antibatterico. I batteri possono essere scelti dal gruppo che consiste di: *Mycobacterium spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Klebsiella spp.*, *Borrelia spp.*, *Bacterioides fragilis*, *Treponema spp.*, e *Helicobacter pylori*. Il patogeno può essere un virus, e il procedimento può comprendere inoltre la somministrazione di un agente antivirale. Il virus può essere scelto dal gruppo che consiste di: epatite B, C, herpes simplex virus I, II, virus dell'immunodeficienza umana I, II, citomegalovirus, Epstein Barr virus, papillomavirus umano, virus linfotropici T umani, I, II, varicella zoster. Il patogeno può essere un fungo, e il procedimento può comprendere inoltre la somministrazione di un agente anti-fungino. Il disturbo può essere scelto dal gruppo che consiste di aspergillosi, blastomicosi, candidiasi albicans, coccidioiodomicosi immitis, istoplasmosi, paracoccidioiomicosi, microsporidiosi. Il patogeno può essere un protozoo, e il procedimento può comprendere inoltre la somministrazione di un agente anti-protozoi. Il disturbo può essere scelto dal gruppo che consiste di: leishmaniosi, plasmodiosi (*vale a dire*, malaria), criptosporidiosi, toxoplasmosi, tripanosomiasi, e infezioni da elminti, incluse quelle risultanti da trematodi (*per esempio*, schistosomiasi), cestodi (*per esempio*, echinococcosi) e nematodi (*per esempio*, trichinosi, ascariasi, filariosi e strongilodiosi).

Il disturbo disfunzionale dei linfociti T può essere immunità tumorale. L'anticorpo anti-PD-L1 o la composizione della presente invenzione può essere combinato/a con un regime di trattamento comprendente inoltre una terapia tradizionale scelta dal gruppo che consiste di: terapia con radiazioni, chemioterapia, terapia mirata, immunoterapia, terapia ormonale, inibizione dell'angiogenesi e cura palliativa. Il trattamento di chemioterapia può essere scelto dal gruppo che consiste di: gemcitabina, ifosfamide, doxorubicina, paclitaxel, cisplatino. L'immunità tumorale può risultare da un cancro scelto dal gruppo che consiste di: cancro alla mammella, al polmone, al colon, all'ovaia, melanoma, alla vescica, al rene, al fegato, salivare, allo stomaco, glioma, alla tiroide, timico, epiteliale, della testa e del collo, gastrico, e pancreatico.

Breve Descrizione dei Disegni

La Figura 1 è un'illustrazione grafica raffigurante la costimolazione di linfociti T mediante la famiglia B7 di molecole della superficie cellulare.

La Figura 2 è uno schema che mostra il progetto sperimentale del saggio di stimolazione con i linfociti T PMEL/B16.

La Figura 3 è un grafico a barre che mostra l'effetto dell'Ab anti-PD-L1 sulla funzione antigene-specifica dei linfociti T tramite la produzione potenziata di IFN- γ in linfociti T CD8+ PMEL in risposta al peptide melanocitico gp100. Sia la percentuale di linfociti CD8+ che producono IFN- γ sia i loro livelli di produzione di IFN- γ sono aumentati durante la stimolazione in presenza dell'anticorpo anti-PD-L1.

La Figura 4 è un grafico a barre che mostra l'effetto dell'Ab anti-PD-L1 sulla funzione antigene-specifica dei linfociti T tramite il potenziamento nella proliferazione di linfociti T CD4+ Ova-specifici mediante l'Ab anti-PD-L1 YW243.55.S1 in una stimolazione secondaria con linfociti B A20 pulsati con Ova/APC mPD-L1.

La Figura 5 è una serie di tracce FACS che mostrano il potenziamento nella proliferazione di linfociti T CD8 umani mediante l'anticorpo anti-PD-L1 YW243.55S1 in una Reazione Linfocitaria Mista. È anche riportata la percentuale di cellule proliferanti come misurato dalla diluizione in intensità di CFSE.

La Figura 6 è uno schema del progetto sperimentale del trattamento di LCMV cronico con una forma chimerica dell'Ab anti-PD-L1 YW243.55S70. Le frecce designano la tempistica delle 6 dosi di anti-PD-L1 iniziata 14 giorni dopo l'infezione con 2×10^6 pfu del Clone 13 di LCMV.

Le Figure 7A e 7B sono grafici che mostrano nella funzione effettrice potenziata di CD8 in cellule *ex vivo* successivamente al trattamento *in vivo* dell'infezione cronica da LCMV mediante l'Ab anti-PD-L1, YW243.55.S70. Il blocco di PD-L1 mediante YW243.55.S70 ha aumentato la degranolazione dei linfociti CD8⁺ (come misurato dall'aumento in CD107A di superficie) (Figura 7A) e ha aumentato le cellule produttrici IFN-gamma in % in risposta al peptide di LCMV gp33 (Figura 7B). La frequenza di cellule gp33-specifiche viene rivelata mediante colorazione con pentameri H2-Db gp33.

Le Figure 8A e 8B mostrano la riduzione nei titoli ematici e tissutali di LCMV nell'infezione cronica da LCMV successivamente al trattamento *in vivo* con anticorpo anti-PD-L1. In Figura 8A, i titoli virali dai vari tessuti indicati sono analizzati i Giorni 21 e 28, una e due settimane dopo il trattamento con Ab, rispettivamente. In Figura 8B, i titoli virali nel siero sono analizzati i Giorni 0, 7, 14, 21 e 28, con l'inoculazione di LCMV che ha luogo il giorno 0 e il trattamento che comincia il giorno 14.

La Figura 9A mostra una riduzione significativa nella crescita tumorale del carcinoma al colon MC38.Ova quale risultato dell'applicazione di anticorpo anti-PD-L1 successivamente al trattamento terapeutico di tumori consolidati (il trattamento è iniziato il Giorno 14, quando il tumore è 250 mm³). La Figura 9B è un istogramma che mostra i livelli di superficie dell'espressione di PD-L1 su cellule MC38.Ova in coltura tissutale come misurato mediante citometria a flusso. PD-L2 non è espresso dalle cellule MC38.Ova.

La Figura 10 è un grafico che mostra l'effetto del trattamento di bloccaggio di PD-L1 da solo e in combinazione con o anti-VEGF o Gemcitabina sulla crescita dei tumori MC38.Ova in topi C57BL/6.

Le Figure 11A-B sono le sequenze delle regioni variabili delle catene pesante e leggera, rispettivamente, di 11 anticorpi anti-PD-L1

identificati mediante esposizione su fago. Le barre ombreggiate mostrano CDR con varie definizioni, mentre le aree riquadrate mostrano l'estensione delle HVR.

Descrizione Dettagliata

Tecniche generali

La pratica della presente invenzione impiegherà se non altrimenti indicato, tecniche convenzionali di biologia molecolare (incluse tecniche ricombinanti), microbiologia, biologia cellulare, biochimica e immunologia, che sono nelle abilità della tecnica. Tali tecniche sono spiegate completamente in letteratura, come, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, seconda edizione (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, a cura di, 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, a cura di, 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., a cura di, 1987, e gli aggiornamenti periodici); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., a cura di, 1994); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (Perbal Bernard V., 1988); *Phage Display: A Laboratory Manual* (Barbas et al., 2001).

I. Immunità dell'ospite

A. Sviluppo e attivazione dei linfociti

I due principali tipi di linfociti negli esseri umani sono i T (derivati dal timo) e B (derivati dal midollo osseo). Queste cellule sono derivate da cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo e nel fegato fetale che sono impegnati nel percorso di sviluppo linfoide. La progenie di queste cellule staminali segue percorsi divergenti per maturare nei linfociti B o nei T. Lo sviluppo dei linfociti B umani ha luogo interamente all'interno del midollo osseo. I linfociti T, d'altra parte, si sviluppano da precursori immaturi che lasciano il midollo e viaggiano attraverso il flusso sanguigno fino al timo, dove proliferano e si differenziano nei linfociti T maturi.

I linfociti maturi che emergono dal timo o dal midollo osseo sono in uno stato quiescente o "a riposo", vale a dire che sono mitoticamente inattivi. Quando sono dispersi nel flusso sanguigno, questi linfociti "originari" o "vergini", viaggiano in vari organi linfatici secondari o periferici, come la milza, i linfonodi o le tonsille. La maggior parte dei linfociti hanno una durata di vita intrinsecamente breve e muoiono entro pochi giorni dopo aver lasciato il midollo o il timo. Comunque, se tale cellula riceve segnali che indicano la presenza di un antigene, essi possono attivarsi e sottostare a turni successivi di divisione cellulare. Alcune delle cellule della progenie risultante ritornano allora allo stato di riposo per divenire *linfociti di memoria* - linfociti B e T che sono essenzialmente innescati per il successivo incontro che l'allergene stimolano. L'altra progenie di linfociti vergini attivati sono cellule effettrici, che sopravvivono solo pochi giorni, ma effettuano specifiche attività difensive.

L'attivazione dei linfociti si riferisce a una serie ordinata di eventi tramite i quali passa un linfocita a riposo quando è stimolato a dividersi e produrre progenie, alcuni dei quali diventano cellule effettrici. Una risposta completa include sia l'induzione di proliferazione cellulare (*mitogenesi*) sia l'espressione di funzioni immunologiche. I linfociti vengono attivati quando ligandi specifici si legano ai recettori sulle loro superfici. I ligandi sono differenti per i linfociti T e i linfociti B, ma i meccanismi fisiologici intracellulari risultanti sono simili.

Alcuni stessi antigeni estranei possono indurre l'attivazione dei linfociti, soprattutto grandi antigeni polimerici che reticolano le immunoglobuline di superficie sui linfociti B, o altre glicoproteine sui linfociti T. Comunque, la maggior parte degli antigeni non sono polimerici e persino il legame diretto a linfociti B in grandi numeri non determina l'attivazione. Questi antigeni più comuni attivano i linfociti B quando sono co-stimolati con i linfociti -T helper attivati nei pressi. Tale stimolazione può verificarsi dalle linfocine secrete dai linfociti T, ma è trasmessa nel modo più efficace mediante il contatto diretto del linfocita B con le proteine di superficie del linfocita T che interagiscono con certi recettori di superficie dei linfociti B per generare un segnale secondario.

B. Linfociti T

I linfociti T non esprimono immunoglobuline, ma, invece rivelano la presenza di sostanze estranee per mezzo di proteine di superficie chiamate recettori dei linfociti T (TCR). Questi recettori riconoscono gli antigeni o per contatto diretto o influenzando l'attività delle altre cellule immunitarie. Insieme ai macrofagi, i linfociti T sono il principale tipo cellulare coinvolto nell'immunità cellulo-mediata.

A differenza dei linfociti B, i linfociti T possono rivelare sostanze estranee solo in contesti specifici. In particolare, i linfociti T riconosceranno una proteina estranea solo se essa è prima clivata in peptidi piccoli, che sono quindi esposti sulla superficie di una seconda cellula ospite, chiamata cellula presentante l'antigene (APC). Molti tipi di cellule ospite possono presentare antigeni sotto certe condizioni ma certi tipi sono più specificamente adattati a questo scopo e sono particolarmente importanti per controllare l'attività dei linfociti T, inclusi macrofagi e altri linfociti B. La presentazione dell'antigene dipende in parte da proteine specifiche, chiamate proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), sulla superficie delle cellule presentanti. Pertanto, per stimolare l'immunità cellulo-mediata, i peptidi estranei devono essere presentati ai linfociti T in combinazione con peptidi MHC, e questa combinazione può essere riconosciuta da un recettore di linfociti T.

Ci sono due sottoinsiemi significativi di linfociti T: i linfociti T citotossici (linfociti T_c o CTL) e linfociti T helper (T_H), che possono a malapena essere identificati sulla base dell'espressione alla superficie cellulare del marcatore CD8 e CD4. I linfociti T_c sono importanti nella difesa dai virus, e possono uccidere i virus direttamente riconoscendo certi peptidi virali espressi sulla superficie cellulare. I linfociti T_H promuovono la proliferazione, la maturazione e la funzione immunologica di altri tipi cellulari, per esempio, la secrezione di linfocine per controllare le attività di

linfociti B, macrofagi e linfociti T citotossici. Comunemente sia i linfociti T vergini sia di memoria rimangono nello stato di riposo, e in questo stato non presentano una significativa attività helper o citotossica. Quando attivate, queste cellule sottostanno a parecchi tumi di divisione mitotica per produrre cellule figlie. Alcune di queste cellule figlie ritornano allo stato di riposo come cellule di memoria, ma altre diventano cellule effettrici che esprimono attivamente attività helper o citotossica. Queste cellule figlie assomigliano alle loro genitrici: le cellule CD4+ possono produrre solo una progenie CD4+, mentre le cellule CD8+ producono solo una progenie CD8+. I linfociti T effettrici esprimono marcatori sulla superficie cellulare che non sono espressi sui linfociti T a riposo, come CD25, CD28, CD29, CD40L, recettori della transferrina e proteine di MHC di classe II. Quando lo stimolo attivante si ritira, l'attività citotossica o helper cala gradualmente lungo un periodo di parecchi giorni poiché le cellule effettrici o muoiono o ritornano allo stato di riposo.

Simile all'attivazione dei linfociti B, le risposte dei linfociti T alla maggior parte degli antigeni richiedono anche due tipi di stimoli simultanei. Il primo è l'antigene, che se opportunamente esposto dalle proteine MHC su una cellula presentante l'antigene, può essere riconosciuto e legato dai recettori dei linfociti T. Sebbene questo complesso antigene-MHC trasmetta un segnale all'interno della cella, di solito è insufficiente a provocare l'attivazione dei linfociti T. L'attivazione completa, come avviene con i linfociti T helper, richiede la costimolazione con altri ligandi specifici chiamati costimolatori che sono espressi sulla superficie della cellula presentante l'antigene. L'attivazione di una cellula T citotossica, d'altra parte, richiede generalmente IL-2, una citochina secreta dai linfociti T helper attivati.

C. La risposta immunitaria

Le tre proprietà funzionali primarie del sistema immunitario dei mammiferi che lo distinguono dalle altre difese del corpo includono: (1) *specificità* - la capacità di riconoscere e di rispondere o di non rispondere individualmente tra un vasto numero di molecole bersaglio, (2) *discriminazione* - la capacità di determinare il sé dal non-sé in modo da coesistere pacificamente con tutte le innumerevoli proteine e l'altro materiale organico, ma ancora rispondere vigorosamente contro il materiale estraneo che viene introdotto nel corpo e (3) *memoria* - la capacità di essere modellato dall'esperienza così che gli incontri successivi con un particolare patogeno estraneo provocheranno una risposta più rapida e vigorosa di quanto accaduto all'incontro iniziale. Quando una o più di queste funzioni viene frustrata, si verifica una condizione patologica.

I linfociti vergini vengono liberati continuamente dagli organi linfatici primari nella periferia, portando ognuno dei recettori di superficie che permettono il legame dell'antigene. Il legame dell'antigene nei linfociti B è mediato attraverso immunoglobuline legate alla superficie, mentre nei linfociti T è mediata dai recettori dei linfociti T. Quando si attivano i linfociti vergini, essi proliferano, producendo cellule figlie che possono quindi subire ulteriori cicli di attivazione e proliferazione. La velocità e l'intensità della risposta a un determinato antigene è

determinata in gran parte dalla selezione clonale: maggiore è la popolazione di cellule figlie o cloni specifici verso un determinato antigene, maggiore è il numero di cellule che possono riconoscere e partecipare alla risposta immunitaria. Ogni risposta immunitaria è una sequenza complessa e intricatamente regolata di eventi che coinvolgono parecchi tipi di cellule. Viene innescata quando un *immunogeno* entra nel corpo e incontra una classe specializzata di cellule chiamate cellule presentanti l'antigene (APC). Queste APC catturano una quantità minima dell'immunogeno e lo espongono in una forma che può essere riconosciuta da linfociti T-helper antigene-specifici. I linfociti T helper si attivano e, a loro volta, promuovono l'attivazione di altre classi di linfociti, come i linfociti B o i linfociti T citotossici. I linfociti attivati quindi proliferano e svolgono le specifiche funzioni effettrici. In ogni fase di questo processo, i linfociti e le APC comunicano uno con l'altra attraverso il contatto diretto o mediante la secrezione di citochine regolatorie.

Gli antigeni esogeni catturati da una APC subiscono una serie di alterazioni chiamate *elaborazione dell'antigene*. Tale elaborazione, specialmente di immunogeni proteici, implica la denaturazione e la digestione proteolitica parziale, in modo che l'immunogeno venga clivato in brevi peptidi. Un numero limitato di peptidi risultanti quindi si associa non covalentemente con proteine MHC di classe II e vengono trasportati sulla superficie di APC, un processo noto come *presentazione dell'antigene*. Un linfocita T helper CD4+ che entra in contatto diretto con una APC può venire attivato, ma lo farà solo se esprime una proteina del recettore dei linfociti T che può riconoscere e legare il particolare complesso peptide-MHC presentato dall'APC.

I linfociti T helper (T_H) sono gli orchestratori principali della risposta immunitaria perché sono necessari per l'attivazione delle altre due cellule effettrici linfatiche: i linfociti T citotossici (T_C) e cellule plasmatiche che secernono anticorpo. L'attivazione di T_H avviene presto in una risposta immunitaria e richiede almeno due segnali. Un segnale viene fornito dal legame del recettore dell'antigene del linfocita T al complesso peptide antigenico-MHC sulla superficie APC che viene trasmesso attraverso il complesso proteico CD3, mentre il secondo segnale, costimolatorio attraverso l'APC si pensa che sia derivato dal legame di una proteina di trasmissione del segnale separata sulla superficie dei linfociti T con un ligando specifico sull'APC. Tale interazione conosciuta è la proteina CD28 della cellula T e la famiglia di proteine di superficie di APC conosciuta come B7. Altre coppie di proteine di superficie possono anche mediare la costimolazione. Il processo di costimolazione è descritto in maggior dettaglio in seguito. Gli anticorpi anti-PD-L1 della presente invenzione si ritiene che potenzino la costimolazione attraverso l'antagonismo di un segnale costimolatorio negativo fornito dalla segnalazione tramite PD-L1.

Insieme, i due segnali inducono il linfocita T helper a iniziare a secernere la citochina interleuchina-2 (IL-2) e anche a iniziare a esprimere specifici recettori ad alta affinità per IL-2 sulla sua superficie. IL-2 è un fattore mitogeno altamente potente per i linfociti T ed è

essenziale per la risposta proliferativa dei linfociti T attivati. L'effetto di IL-2 sulla cellula da cui viene secreta - un fenomeno noto come *effetto autocrino*. È stato inoltre dimostrato che anche se un linfocita T ha ricevuto entrambi i segnali, non prolifererà se i suoi propri recettori IL-2 di superficie sono bloccati. IL-2 può anche agire sulle cellule nelle immediate vicinanze, in un cosiddetto *effetto paracrino*. Questo effetto è particolarmente importante per attivare i linfociti T_c, che in genere non producono abbastanza IL-2 per stimolare la loro propria proliferazione. In aggiunta a IL-2, i linfociti T_H attivati secernono altre citochine e promuovono la crescita, la differenziazione, e le funzioni di linfociti B, macrofagi e altri tipi di cellule.

Il contatto tra una APC e un linfocita T_H antigene-specifico ha anche effetto sull'APC - uno dei più importanti dei quali è il rilascio di IL-1. Si ritiene che questa citochina agisca in modo autocrino per aumentare l'espressione di superficie delle proteine MHC di classe II e di varie molecole di adesione, rafforzando così il legame del linfocita T_H e potenziando la presentazione dell'antigene. Allo stesso tempo, IL-1 funziona in modo paracrino sulla cellula T_H per promuovere la secrezione di IL-2 e l'espressione del recettore per IL-2.

Durante l'attivazione dei linfociti T_H nel modo descritto in precedenza, alcuni linfociti B potrebbero anche coinvolgere l'immunogeno tramite i loro recettori dell'antigene, che sono forme legate alla membrana degli anticorpi che secerneranno in seguito. A differenza dei linfociti T, i linfociti B riconoscono un immunogeno nella sua forma libera, non elaborata. Il legame specifico dell'antigene fornisce un tipo di segnale che può portare all'attivazione dei linfociti B. Un secondo tipo è fornito dai linfociti T_H attivati, che esprimono proteine che aiutano ad attivare il linfocita B mediante il legame ai recettori non immunoglobulinici sulla sua superficie. Questi segnali derivati da T_H, che agiscono su qualsiasi linfocita B indipendentemente dalla sua specificità antigenica, sono conosciuti come fattori helper. Questi fattori helper includono IL-2, IL-4 e IL-6. Tuttavia, l'aiuto viene ottenuto in modo più efficace attraverso il contatto cellulare, che consente alle proteine sulla superficie dei linfociti T di contattare direttamente quelle sui linfociti B. La forma più efficace di aiuto mediato dal contatto si verifica quando una proteina chiamata ligando di CD40 (CD40L), che viene espressa sui linfociti T_H solo dopo che essi si attivano, si lega a una proteina chiamata CD40 sui linfociti B. In un processo noto come *attivazione by-stander*, il contatto con un linfocita B attivato può anche essere sufficiente per attivare i linfociti B a riposo anche se le sue immunoglobuline di superficie non sono state impegnate nell'antigene.

I linfociti T_c funzionano per eradicare le cellule che esprimono antigeni estranei sulle loro superfici, come le cellule ospite infettate da virus. La maggior parte dei linfociti T_c esprimono CD8 anziché CD4 e quindi riconoscono antigeni in associazione con le proteine MHC di classe I piuttosto che di classe II. Quando una cellula somatica viene infettata da un virus, alcune proteine virali immunogeniche possono subire processi all'interno della cellula, e i peptidi risultanti possono apparire come complessi di superficie con molecole MHC di classe I. Questi complessi

peptide-MHC possono quindi essere riconosciuti dal recettore dei linfociti T di un clone antigene-specifico, fornendo uno dei due segnali necessari per l'attivazione dei linfociti T_c. Questo primo segnale da solo induce i recettori per IL-2 ad alta affinità sulla cellula T_c. Il secondo segnale è fornito da IL-2 secreta da un vicino linfocita T_H attivato. Al ricevimento di entrambi i segnali, il linfocita T_c attivato acquisisce attività citotossica, che gli consente di uccidere la cella a cui è legato, come pure qualsiasi altra cellula che porta i medesimi complessi peptide-MHC di classe I. In alcuni casi, l'uccisione si verifica perché il T_c rilascia tossine specifiche sulla cellula bersaglio; in altri, il T_c induce la cellula bersaglio a suicidarsi per apoptosi. Il linfocita T_c attivato prolifera anche, dando origine a linfociti T_c aggiuntivi con la medesima specificità antigenica.

D. Co-stimolazione mediante la superfamiglia di immunoglobuline:

1. B7.1/B7.2 - CD28/CTLA-4

Forse il percorso costimolatorio meglio caratterizzato dei linfociti B è quello che segnala tramite B7.1(CD80)/B7.2(CD86) - CD28/CTLA-4(CD152). Questo percorso di segnalazione è critico per l'attivazione e la tolleranza dei linfociti T. Karandikar et al., J. Neuroimmunol. 89: 10-18 (1998); Oosterwegal et al., Curr. Opin. Immunol. 11: 294-300 (1999); Salomon et al., Annu. Rev. Immunol. 19: 225-252 (2001); Sansom, D.M., Immunol. 101: 169-177 (2000); Chambers et al., Annu. Rev. Immunol. 19: 565-592 (2001).

B7.1 [Freeman et al., J. Exp. Med. 174: 625-631 (1991); Freedman et al., J. Immunol. 137: 3260-3267 (1987); Yokochi et al., J. Immunol. 128: 823-827 (1982)] e B7.2 [Freeman et al., Science 262: 909-911 (1993); Freeman et al., J. Exp. Med. 178: 2185-2192 (1993); Azuma et al., Nature 366: 76-79 (1993)] hanno doppia specificità per i due recettori stimolatori CD-28 e CTLA-4. Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8573-8577 (1987); Gross et al., J. Immunol. 144: 3201-3210 (1990). CD28 è costitutivamente espresso sulla superficie dei linfociti T [Gross et al., J. Immunol. 149: 380-388 (1992)], mentre CTLA-4, il recettore a più alta affinità, ha un'espressione che è rapidamente sovraregolata successivamente all'attivazione dei linfociti T. Peach et al., J. Exp. Med. 180: 2049-2058 (1994); Linsley et al., J. Exp. Med. 176: 1595-1604 (1992); Kinsley et al., Immunity 1: 793-801 (1994); Linsley et al., Immunity 4: 535-543 (1996). La maggior parte delle popolazioni di APC esprime B7.2 costitutivamente a livelli bassi, che è rapidamente sovraregolato, mentre B7.1 è espresso inducibilmente più tardi dopo l'attivazione. Freeman et al., Science 262: 909-911 (1993); Hathcock et al., J. Exp. Med. 180: 631-640 (1994). L'espressione precedente di B7.2 e i dati di topi knock-out suggeriscono che B7.2 sia la più importante molecola costimolatrice per l'avvio delle risposte immunitarie, ma altrimenti le due molecole hanno funzioni che si sovrappongono ampiamente. McAdam et al., Immuno. Rev. 165: 631-640 (1994).

CD28 interagisce con B7.1 e B7.2 per trasmettere un segnale che è in sinergia con il segnale TCR per promuovere l'attivazione dei linfociti T. Lenschow et al., Annu. Rev. Immunol. 165: 233-258 (1996); Lanzavecchia et al., Cell 96: 1-4 (1999). In assenza di un segnale TCR, la

segnalazione di CD28 non ha significatività fisiologica. La segnalazione di CD28 regola la soglia per l'attivazione dei linfociti T e riduce significativamente il numero di impegni di TCR necessari per l'attivazione dei linfociti T. Viola et al., *Science* 273: 104-106 (1996). L'attivazione di CD28 sostiene le risposte dei linfociti T promuovendo la sopravvivenza dei linfociti T consentendo in tal modo alle citochine di avviare l'espansione clonale e la differenziazione dei linfociti T. Thompson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1333-1337 (1989); Lucas et al., *J. Immunol.* 154: 5757-5768 (1995); Shahinian et al., *Science* 261: 609-612 (1993); Sperling et al., *J. Immunol.* 157: 3909-3917 (1996); Boise et al., *Immunity* 3: 87-98 (1995). CD28 ottimizza anche le risposte dei linfociti T precedentemente attivati, promuovendo la produzione di interleuchina 2 (IL-2) e la sopravvivenza dei linfociti T. Sebbene alcune risposte siano indipendenti da CD28, non è ancora chiaro se ciò sia un'indipendenza dalla costimolazione risultante da forti stimoli antigenici, o il risultato di dipendenza da altri percorsi costimolatori, sconosciuti.

L'attivazione di CTLA-4 provoca un segnale negativo, che inibisce la trasduzione del segnale mediata da TCR e CD-28. L'impegno di CTLA-4 determina l'inibizione della sintesi di IL-2 e la progressione lungo il ciclo cellulare e il termine delle risposte dei linfociti T. Walunas et al., *Immunity* 1: 405-413 (1994); Walunas et al., *J. Exp. Med.* 183: 2541-2550 (1996); Krummel et al., *J. Exp. Med.* 182: 459-466 (1995); Brunner et al., *J. Immunol.* 162: 5813-5820 (1999); Greenwald et al., *Immunity* 14: 145-155 (2001). CTLA-4 ha un ruolo importante nel regolare le risposte dei linfociti T, inclusa la *tolleranza dei linfociti T periferici*. Sebbene non sia chiaro come la segnalazione sia coordinata tramite CTLA-4 e CD28, alcune possibilità includono superare CD28 per il legame a B7, mediante l'induzione di citochine immunosoppressive, antagonismo diretto della segnalazione di CD28 e/o la segnalazione mediata da TCR.

Come risultato, l'antagonismo di CTLA-4 (per esempio, anticorpi anti-CTLA antagonisti) e/o B7.1/B7.2/CD28 agonisti possono essere utili per potenziare la risposta immunitaria nel trattamento di un'infezione (per esempio, acuta e cronica) e l'immunità tumorale.

2. Segnalazione ICOS/ICOSL:

Un altro percorso di interazione tra APC e linfociti T si verifica attraverso ICOS (CD278) e ICOSL (B7-H2, CD275). La segnalazione ICOS/ICOSL favorisce la differenziazione e la funzione effettrice dei linfociti T-helper, ed è particolarmente importante per la produzione di interleuchina-10 (IL-10), ma ha un ruolo più modesto nel regolare l'espansione dei linfociti T e la produzione di IL-2, inclusi linfociti T regolatori, tolleranza dei linfociti T e autoimmunità.

In contrasto con CD28, ICOS non è espresso costitutivamente sui linfociti T naive, ma è rapidamente indotto sui linfociti T dopo l'impegno dei TCR. Hutloff et al., *Nature* 397: 263-266 (1999); Yoshinaga et al., *Nature* 402: 827-832 (1999); Beier et al., *Eur. J. Immunol.* 30: 3707-3717 (2000); Coyle et al., *Immunity* 13: 95-105 (2000); Mages et al., *Eur. J. Immunol.* 30: 1040-1047 (2000); McAdam et al., *J. Immunol.*

165: 5035-5040 (2000). Questo suggerisce che ICOS fomisca un segnale costimolatorio per attivare i linfociti T. Mentre la costimolazione da parte di CD28 potenzia l'espressione di ICOS, e l'espressione di ICOS sia ridotta in assenza di B7.1 e B7.2, ICOS non dipende interamente dai segnali di CD28. McAdam et al., J. Immunol. 165: 5035-5040 (2000); Aicher et al., J. Immunol. 164: 4689-4696 (2000); Kopf et al., J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000). ICOS è sovraregolato su entrambi i tipi di linfociti T helper 1 e 2 (T_{H1} e T_{H2}) durante la fase iniziale della differenziazione, ma i livelli rimangono alti sui linfociti T_{H2} e diminuiscono sui linfociti T_{H1}. Il modello di espressione di ICOS sui linfociti T nei centri germinativi, Beier et al., Eur. J. Immunol. 30: 3707-3717 (2000); Mages et al., Eur. J. Immunol. 30: 1040-1047 (2000), indica un ruolo per ICOS nell'aiuto dei linfociti T per i linfociti B. Studi funzionali hanno confermato questo, e persino l'espressione di ICOS è stata confermata su linfociti B di ratto, sebbene non su altre specie. Tezuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 276: 335-345 (2000); McAdam et al., Nature 409: 102-105 (2001); Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001); Dong et al., J. Immunol. 166: 3659-3662 (2001); Tafuri et al., Nature 409: 105-109 (2001).

Un ruolo per la segnalazione ICOS/ICOSL sembra essere la regolazione della produzione di citochine (per esempio, IL-4, IL-13) da parte di linfociti T recentemente attivati come pure effettori. Hutloff et al., Nature 397: 263-266 (1999); Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000); Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001). Negli studi della malattia allergica alle vie aeree, la funzione effettrice di T_{H2}, ma non la differenziazione di T_{H2}, è fornita dal blocco di ICOS. Tesciuba et al., J. Immunol. 167: 1996-2003 (2001). A indicare che ICOS può anche regolare la funzione effettrice di T_{H1}, la produzione di entrambe le citochine T_{H1} e T_{H2} può essere soppressa dalla proteina di fusione ICOS-Ig al momento della riattivazione *in vitro*. Kopf et al., J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000).

Un altro ruolo potenziale per ICOS è relative al sostenere le risposte di T_{H1}. In un modello sperimentale di encefalomielite autoimmune (EAE) per la sclerosi multipla, una malattia di T_{H1} mediata da linfociti T CD4⁺ mielina-specifici, mostra che l'esito del blocco di ICOS potrebbe essere distinto quando la costimolazione è bloccata durante l'innesco dei linfociti T, quindi durante la fase effettrice di EAE. Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001); Rottman et al., Nature Immunol. 2: 605-611 (2001); Sporici et al., Clin. Immunol. 100: 277-288 (2001). La EAE indotta dalla glicoproteina mielina oligodendrocitica (MOG) è assai esacerbata in topi ICOS^{-/-} knock-out, con un' aumentata produzione di IFN- γ in confronto al wild-type. In maniera simile, il blocco di ICOS durante l'induzione di EAE, esacerbava la malattia determinando anche un' aumentata produzione di IFN- γ . Perciò, il blocco di ICOS durante l'innesco porta alla polarizzazione di T_{H1} della risposta. In maniera interessante, l'innesco di linfociti T transgenici TCR mielina-specifici *n vitro* in presenza di ICOS-Ig inibiva la loro capacità di indurre EAE, in forte contrasto con i risultati del blocco ICOS-Ig osservato *in vivo*. Sporici *et al.*, *supra*. La differenza per gli esiti opposti *in vitro* e *in vivo* non è ancora chiara, ma potrebbe riflettere un ruolo per ICOS sui linfociti T regolatori che producono IL-10, come pure sui linfociti T effettori durante il blocco di ICOS *in vivo*. La

costimolazione tramite IL-10 è molto efficace nel potenziare la produzione di IL-10 ed è più efficace della costimolazione tramite CD28. Hutloff *et al.*, *supra*. L'anello regolatorio IL-10, IL-12 è critico per regolare EAE perché i topi IL-10^{-/-}, ma non IL4^{-/-} sviluppano EAE esacerbata. Segal *et al.*, *J. Exp. Med.* 187: 537-546 (1998).

Ancora un altro ruolo potenziale per ICOS è nel potenziare le risposte umorali dei linfociti B dipendenti dai linfociti T. Topi ICOS^{-/-} e ICOSL^{-/-} hanno dimostrato che ICOS è richiesto per le risposte dei linfociti B dipendenti dai linfociti T. Hutloff *et al.*, *Nature* 397:263-66 (1999); Chapoval *et al.*, *Nat. Immunol.* 2:269-74 (2001); Coyle *et al.*, *Immunity* 13: 95-105 (2000); McAdam *et al.*, *Nature* 409: 102-5 (2001); Tafuri *et al.*, *Nature* 409: 105-9 (2001); Suh *et al.*, *Nat. Immunol.* 4:899-906 (2003). I topi ICOS^{-/-} mostrano anche ridotti centri germinativi in risposta all'immunizzazione primaria, profondi difetti nella formazione dei centri germinativi in risposta a stimolazione secondaria, e difetti nei cambiamenti della classe di IgG. Il ruolo di ICOS nell'interazione dei linfociti T:B è stato ulteriormente convalidato dall'identificazione della perdita di omozigosi di ICOS nei linfociti T in pazienti con esordio adulto di una malattia da immunodeficienza variabile comune. Grimbacher *et al.*, *Nat. Immunol.* 4: 261-68 (2003).

Come risultato, l'agonismo di ICOS/ICOSL (per esempio, anticorpi anti-ICOS agonisti, ligando di ICOS/ICOSL solubile) possono essere utili per potenziare la risposta immunitaria nel trattamento di un'infezione (per esempio, acuta e cronica) e/o l'immunità tumorale.

3. Percorso PD-1:

Un importante segnale costimolatore negativo che regola l'attivazione dei linfociti T è fornito dal recettore della morte programmata 1 (PD-1) (CD279) e dai suoi partner di legame PD-L1 (B7-H1, CD274) e PD-L2 (B7- DC, CD273). Il ruolo regolatorio negativo di PD-1 è stato rivelato dai knock out di PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}), che sono soggetti a autoimmunità. Nishimura *et al.*, *Immunity* 11: 141-51 (1999); Nishimura *et al.*, *Science* 291: 319-22 (2001). PD-1 è correlato a CD28 e CTLA-4, ma è privo della cisteina prossimale della membrana che permette l'omodimerizzazione. Il dominio citoplasmatico di PD-1 contiene un motivo di inibizione basato sull'immunorecettore della tirosina (ITIM, V/IxYxxL/V). PD-1 si lega solo a PD-L1 e PD-L2. Freeman *et al.*, *J. Exp. Med.* 192: 1-9 (2000); Dong *et al.*, *Nature Med.* 5: 1365-1369 (1999); Latchman *et al.*, *Nature Immunol.* 2: 261-268 (2001); Tseng *et al.*, *J. Exp. Med.* 193: 839-846 (2001).

PD-1 può essere espresso su linfociti T, linfociti B, linfociti T natural killer, monociti attivati e cellule dendritiche (DC). PD-1 è espresso da linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ umani attivati, ma non da quelli non stimolati, da linfociti B e cellule mieloidi. Ciò è in contrasto con l'espressione più restrittiva di CD28 e CTLA-4. Nishimura *et al.*, *Int. Immunol.* 8: 773-80 (1996); Boettler *et al.*, *J. Virol.* 80: 3532-40 (2006). Ci sono almeno 4 varianti di PD-1 che sono state clonate da linfociti T umani attivati, incluse trascrizioni prive di (i) esone 2, (ii) esone 3, (iii) esoni 2

e 3 o (iv) esoni da 2 a 4. Nielsen et al., *Cell. Immunol.* 235: 109-16 (2005). Ad eccezione di PD-1 Δ ex3, tutte le varianti sono espresse a livelli simili a quelli di PD-1 a lunghezza intera totale PD-1 nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) a riposo. L'espressione di tutte le varianti è significativamente indotta al momento dell'attivazione di linfociti T umani con anti-CD3 e anti-CD28. Le varianti di PD-1 Δ ex3 mancano di un dominio transmembrana e somigliano a CTLA-4 solubile, che ha un ruolo importante nell'autoimmunità. Ueda et al., *Nature* 423: 506-11 (2003). Questa variante è arricchita nel liquido sinoviale e nei sieri di pazienti con artrite reumatoide. Wan et al., *J. Immunol.* 177: 8844-50 (2006).

I due ligandi di PD-1 differiscono nei loro modelli di espressione. PD-L1 è espresso costitutivamente sui linfociti T e B del topo, CD, macrofagi, cellule staminali mesenchimali e mastociti derivati dal midollo osseo. Yamazaki et al., *J. Immunol.* 169: 5538-45 (2002). PD-L1 è espresso su una vasta gamma di cellule non ematopoietiche (per esempio, cornea, epitelio polmonare, vascolare, cellule non parenchimali del fegato, cellule staminali mesenchimali, isolotti pancreatici, sinciziotrofoblasti placentari, cheratinociti, eccetera) [Keir et al., *Annu. Rev. Immunol.* 26: 677-704 (2008)] ed è sovraregolato su un certo numero di tipi di cellule dopo l'attivazione. Entrambi gli interferoni IFN di tipo I e di tipo II sovraregolano PD-L1. Eppihimer et al., *Microcirculation* 9: 133-45 (2002); Schreiner et al., *J. Neuroimmunol.* 155: 172-82 (2004). L'espressione di PD-L1 nelle linee cellulari diminuisce quando MyD88, TRAF6 e MEK sono inibiti. Liu et al., *Blood* 110: 296-304 (2007). JAK2 è stato anche implicato anche nell'induzione di PD-L1. Lee et al., *FEBS Lett.* 580: 755-62 (2006); Liu et al., *Blood* 110: 296-304 (2007). La perdita o l'inibizione dell'omologo di fosfatasi e tensina (PTEN), una fosfatasi cellulare che ha modificato la fosfatidilinosital 3-chinasi (PI3K) e la segnalazione Akt, ha aumentato l'espressione post-trascrizionale di PD-L1 nei cancri. Parsa et al., *Nat. Med.* 13, 84-88 (2007).

L'espressione di PD-L2 è più limitata di quella di PD-L1. PD-L2 è espresso inducibilmente su DC, macrofagi e mastociti derivati da midollo osseo. PD-L2 è espresso anche su circa la metà dei due terzi dei linfociti B1 peritoneali a riposo, ma non sui linfociti B convenzionali B2. Zhong et al., *Eur. J. Immunol.* 37: 2405-10 (2007). Le cellule B1 PD-L2+ legano fosfatidilcolina e possono essere importanti per le risposte immunitarie innate contro gli antigeni batterici. L'induzione di PD-L2 da parte di IFN- γ dipende parzialmente da NF- κ B. Liang et al., *Eur. J. Immunol.* 33: 2706-16 (2003). PD-L2 può anche essere indotto su monociti e su macrofagi da GM-CSF, IL-4 e IFN- γ . Yamazaki et al., *J. Immunol.* 169: 5538-45 (2002); Loke et al., *PNAS* 100: 5336-41 (2003).

La segnalazione di PD-1 in genere ha un effetto maggiore sulla produzione di citochine rispetto alla proliferazione cellulare, con effetti significativi sulla produzione di IFN- γ , TNF- α e IL-2. La segnalazione inibitoria mediata da PD-1 dipende anche dalla forza della segnalazione TCR, con maggiore inibizione erogata a bassi livelli di stimolazione TCR. Questa riduzione può essere superata dalla costimolazione attraverso CD28 [Freeman et al., *J. Exp. Med.* 192: 1027-34 (2000)] o la presenza di IL-2 [Carter et al., *Eur. J. Immunol.* 32: 634-43 (2002)].

È evidente che la segnalazione tramite PD-L1 e PD-L2 può essere bidirezionale. Vale a dire che, oltre a modificare la segnalazione TCR o BCR, la segnalazione può essere restituita alle cellule che esprimono PD-L1 e PD-L2. Mentre non è stato trovato il trattamento di cellule dendritiche con un anticorpo anti-PD-L2 naturalmente umano isolato da un paziente con macroglobulinemia di Waldenström per sovraregolare le molecole costimolatrici di MHC II o B7, tali cellule hanno prodotto una maggiore quantità di citochine proinfiammatorie, in particolare TNF- α e IL-6, e stimolato la proliferazione dei linfociti T. Nguyen et al., *J. Exp. Med.* 196: 1393-98 (2002). Il trattamento dei topi con questo anticorpo ha anche (1) potenziato la resistenza al melanoma b16 trapiantato e rapidamente indotto CTL tumore-specifici. Radhakrishnan et al., *J. Immunol.* 170: 1830-38 (2003); Radhakrishnan et al., *Cancer Res.* 64: 4965-72 (2004); Heckman et al., *Eur. J. Immunol.* 37: 1827-35 (2007); (2) bloccato lo sviluppo di malattie infiammatorie delle vie aeree in un modello di topo di asma allergico. Radhakrishnan et al., *J. Immunol.* 173: 1360-65 (2004); Radhakrishnan et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 668-74 (2005).

Ulteriori evidenze di segnalazione inversa in cellule dendritiche ("DC") risultano da studi di DC derivate da midollo osseo coltivate con PD-1 solubile (dominio EC di PD-1 fuso alla regione costante di Ig - "s-PD-1"). Kuipers et al., *Eur. J. Immunol.* 36, 2472-82 (2006). Questo sPD-1 ha inibito l'attivazione di DC e aumentato la produzione di IL-10, in modo reversibile tramite la somministrazione di anti-PD-1.

In aggiunta, diversi studi mostrano un recettore per PD-L1 o PD-L2 indipendente da PD-1. B7.1 è già stato identificato come partner di legame per PD-L1. Butte et al., *Immunity* 27: 111-22 (2007). Studi di reticolazione chimica suggeriscono che PD-L1 e B7.1 possano interagire attraverso i loro domini IgV-simili. Le interazioni B7.1:PD-L1 possono indurre un segnale inibitorio nei linfociti T. La ligazione di PD-L1 sui linfociti T CD4+ mediante B7.1 o la ligazione di B7.1 su linfociti T CD4+ mediante PD-L1 distribuisce un segnale inibitorio. I linfociti T che non dispongono di CD28 e CTLA-4 mostrano una diminuzione della proliferazione e della produzione di citochine quando stimolati mediante granuli ricoperti di anti-CD3 e B7.1. Nei linfociti T privi di tutti i recettori per B7.1 (vale a dire, CD28, CTLA-4 e PD-L1), la proliferazione dei linfociti T e la produzione di citochine non erano più inibite dai granuli ricoperti di anti-CD3 e B7.1. Ciò indica che B7.1 agisce specificamente attraverso PD-L1 sui linfociti T in assenza di CD28 e CTLA-4. Allo stesso modo, i linfociti T, privi di PD-1, hanno mostrato una diminuzione della proliferazione e della produzione di citochine quando stimolate in presenza di granuli rivestiti di anti-CD3 e PD-L1, dimostrando l'effetto inibitorio della ligazione PD-L1 su B7.1 sui linfociti T. Quando i linfociti T sono privi di tutti i recettori noti per PD-L1 (vale a dire non PD-1 né B7.1), la proliferazione dei linfociti T non è stata più compromessa dai granuli ricoperti di anti-CD3 e PD-L1. Pertanto, PD-L1 può esercitare un effetto inibitorio sui linfociti T mediante o B7.1 o PD-1.

L'interazione diretta tra B7.1 e PD-L1 suggerisce che l'attuale comprensione della costimolazione è incompleta e sottolinea il

significato dell'espressione di queste molecole sui linfociti T. Studi di linfociti T PD-L1^{-/-} indicano che PD-L1 sui linfociti T può sottoregolare la produzione di citochina dei linfociti T. Latchman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 10691-96 (2004). Poiché sia PD-L1 sia B7.1 sono espressi su linfociti T, linfociti B, DC e macrofagi, c'è il potenziale per interazioni direzionali tra B7.1 e PD-L1 su questi tipi di cellule. In aggiunta, PD-L1 sulle cellule non ematopoietiche può interagire con B7.1 come pure PD-1 sui linfociti T, sollevando la questione se PD-L1 sia coinvolto nella loro regolazione. Una possibile spiegazione dell'effetto inibitorio dell'interazione B7.1: PD-L1 è che PD-L1 del linfocita T può intrappolare o separare APC B7.1 dall'interazione con CD28.

Come risultato, l'antagonismo della segnalazione attraverso PD-L1, che include bloccare PD-L1 dall'interagire con PD-1, B7.1 o entrambi, impedendo in tal modo che PD-L1 invii un segnale costimolatorio negativo ai linfociti T e ad altre cellule presentanti l'antigene è probabile che potenzi l'immunità in risposta all'infezione (per esempio, acuta e cronica) e all'immunità tumorale. In aggiunta, gli anticorpi anti-PD-L1 della presente invenzione possono essere combinati con antagonisti di altri componenti di segnalazione PD-1: PD-L1, per esempio anticorpi antagonisti anti-PD-1 e anti-PD-L2.

4. B7-H3

I segnali costimolatori sono forniti anche attraverso B7-H3 (B7RP-2, CD276, PRO352), che è largamente espresso nei tessuti linfoidi e non linfoidi. Chapoval et al., Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001). Nell'uomo, B7-H3 ha sia una variante 4Ig sia 2Ig, con predominio della forma 4Ig, mentre la variante 2Ig predomina nel topo. Sun et al., J. Immunol. 168: 6294-97 (2002); Steinberger et al., J. Immunol. 172: 2352-59 (2004); Ling et al, Genomics 82: 365-77 (2003).

Studi recenti hanno dimostrato che B7-H3 è sia uno stimolatore sia un inibitore delle risposte dei linfociti T. La prova dell'attivazione stimolante è fornita da quanto segue: (1) In combinazione con anti-CD3, le fusioni B7-H3/Ig costimolavano la proliferazione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, e stimolavano l'attività litica di IFN- γ e CD8, Chapoval et al., Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001); e (2) l'iniezione del plasmide di espressione B7-H3 nei tumori di un modello di linfoma EL-4 ha determinato una completa regressione del 50% dei tumori, che dipendeva dai linfociti T CD8⁺ e dalle cellule NK. Tuttavia, diversi studi recenti hanno mostrato un ruolo inibitorio per questa molecola. Knockout di APC B7-H3^{-/-} mostrano un aumento di due volte nella proliferazione alloreattiva di linfociti T in una risposta MLR. L'attivazione di linfociti T CD4 mediante anti-CD3 e anti-CD28 era inibita in HLA-DR2 trasfettate con una forma di B7-H3. Ling et al., Genomics 82: 365-77 (2003). Il risultato è stata la riduzione della proliferazione e della produzione di IFN- γ , TNF- α , IL-10 e GM-CSF. La riconciliazione di questi studi potrebbe trovarsi nell'esistenza di due recettori per B7-H3 con funzioni opposte, simili a come CD28 e CTLA-4 regolano la segnalazione tramite B7.1 e B7.2.

Come risultato, il bloccaggio della segnalazione di B7-H3 può contribuire a potenziare la risposta immunitaria all'infezione e all'immunità tumorale quando combinata con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione.

5. B7-H4

La più recente aggiunta alla famiglia B7 è B7-H4 (B7x, B7-S1, B7-H.5, VTCN1, PRO1291) che è un regolatore negativo delle risposte dei linfociti T. Zang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (18), 10388-10392 (2003); Watanabe et al., Nat. Immunol. 4 (7), 670-679 (2003); Prasad, et al., Immunity 18 (6), 863-873 (2003); Sica et al., Immunity 18 (6), 849-861 (2003). B7-H4 sia umano sia di topo sono largamente espressi sia negli organi linfoidi (milza e timo) sia negli organi non linfoidi (inclusi polmone, fegato, testicoli, ovaie, placenta, muscoli scheletrici, pancreas e intestino tenue). B7-H4 non è rilevato nei tessuti umani normali da IHC o dalla regolazione di B7-H4 a livello traduzionale. IHC dimostra che B7-H4 è altamente espresso nei tumori polmonari e ovarici, e l'analisi della reazione a catena della polimerasi in tempo reale (PCR) indica che B7-H4 di topo è anche altamente espresso nelle linee cellulari della prostata, del polmone e del colon. B7-H4 lega un recettore ancora sconosciuto sui linfociti T attivati ma non naive che è distinto da CTLA-4, ICOS, PD-1 e il recettore per B7-H3. Sebbene BTLA sia stato inizialmente riportato come il ligando per B7-H4, il legame riportato delle fusioni B7-H4/Ig a cellule wild-type, ma non BTLA^{-/-} obbliga alla conclusione che HVEM, e non BTLA sia il legante unico per B7-H4. Sedy et al., Nat. Immunol. 6: 90-98 (2004).

Gli studi con trasfettanti di B7-H4 e le fusioni immobilizzate di B7-H4/Ig dimostrano che B7-H4 fornisce un segnale che inibisce la proliferazione dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ mediata da TCR, la progressione del ciclo cellulare nella fase G0/G1 e la produzione di IL-2. Sica et al., Immunity 18: 849-61 (2003); Zang et al., PNAS 100: 10388-92 (2003); Prasad et al., Immunity 18: 863-73 (2003). La costimolazione di B7.1 non può superare l'inibizione indotta da B7-H4/Ig. Il bloccaggio dell'anticorpo anti-B7-H4 ha aumentato la proliferazione dei linfociti T e la produzione di IL-2 in vitro. La somministrazione *in vivo* di anticorpo anti-B7-H4 commisurata alla somministrazione di emocianina di patella a buco della serratura (KLH) in adiuvante completo di Freund (CFA) ha portato ad un modesto aumento della produzione di anticorpo IgM anti-KLH e un aumento di due o tre volte nella proliferazione di linfociti T e nella produzione di IL-2 al momento della ristimolazione *in vitro* con KLH, suggerendo un maggior innesco *in vivo* di linfociti T in presenza di anti-B7-H4. L'anticorpo bloccante anti-B7-H4 ha accelerato marcatamente l'insorgenza e la gravità di EAE in linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ aumentati e in macrofagi CD11b⁺ nel cervello di un modello di topo autoimmune trattato con anti-B7-H4. I dati sperimentali combinati disponibili su B7-H4 suggeriscono che possa sottoregolare le risposte immunitarie nei tessuti periferici e avere un ruolo nella regolazione della tolleranza dei linfociti T. L'espressione di B7-H4 può anche avere un ruolo nell'evasione delle risposte immunitarie dell'ospite nell'immunità tumorale. Choi et al., J. Immunol. 171: 4650-54 (2003). Di conseguenza, l'antagonismo di B7-H4 può

essere utile per potenziare la risposta immunitaria all'infezione e l'immunità tumorale quando combinato con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione.

6. BTLA:

Il membro della famiglia B7 BTLA (CD272, BTLA-1) è funzionalmente simile a PD-1 e CTLA. Inizialmente identificato come un marcatore selettivo per le cellule Th1, BTLA è espresso solo sui linfociti. Simile a CTLA-4, ICOS e PD-1, BTLA è indotto sui linfociti T durante l'attivazione. Tuttavia, a differenza di ICOS, che rimane elevato sulle cellule Th2, ma è sottoregolato a livello dei linfociti Th1, BTLA rimane espresso sulle cellule Th1, ma non sulle cellule Th2. Simile a PD-1, BTLA è espresso anche sui linfociti B. Gavrieli et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**: 1236-43 (2003). Tuttavia, BTLA è espresso sia sui linfociti B a riposo sia su quelli attivati, mentre PD-1 è sovraregolato sui linfociti T attivati. BTLA ha due motivi ITIM.

BTLA esercita effetti inibitori sui linfociti B e T. Watanabe et al., *Nat. Immunol.* **4**: 670-79 (2003). I linfociti B *BLTA*^{-/-} presentano una risposta modesta ad anti-IgM, ma una risposta aumentata ad anti-CD3 *in vitro*. Le cellule Th1 *BTLA*^{-/-} polarizzate mostrano un aumento di circa due volte nella proliferazione in risposta all'esposizione all'antigene, *in vitro*. *In vivo*, topi *BTLA*^{-/-} mostrano un aumento di tre volte delle risposte anticorpali aptene-specifiche e una potenziata suscettibilità a EAE. Il fenotipo dei topi *BTLA*^{-/-} è simile al fenotipo dei topi *PD-1*^{-/-}, mostrando una maggiore suscettibilità all'autoimmunità, ma fenotipi più sottili rispetto ai topi *CTLA-4*^{-/-}. Tuttavia, dato il suo ruolo di regolatore negativo, il blocco di BTLA può risultare utile per potenziare la risposta immunitaria nell'infezione e l'immunità antitumorale in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione.

È interessante notare, che è stato recentemente dimostrato che il membro della superfamiglia Ig BTLA interagisce anche con il membro della famiglia TNFR HVEM. Sedy et al., *Nat. Immunol.* **6**: 90-98 (2005); Gonzalez et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 1116-1121 (2005). HVEM è recensita a seguire sotto i Costimolatori della Famiglia TNFR.

E. Costimolatori della famiglia TNRF

1. OX40/OX40L (CD134)

Topi OX40 (CD134, TXPG1L, TNFRSF4) e OX40L (CD134L, CD252, GP34, TNFSF4, TXGP1) deficienti hanno risposte primarie ridotte dei linfociti T CD4+ sia agli antigeni proteici virali e comuni sia nelle reazioni di sensibilità al contatto. Chen et al., *Immunity* **11**: 689-698 (1999); Kopf et al., *Immunity* **11**: 699-708 (1999); Murata et al., *J. Exp. Med.* **191**: 365-374 (2000); Gramaglia et al., *J. Immunol.* **165**: 3043-3050 (2000). Le frequenze più basse di linfociti T effettori antigene-specifici vengono generate in ritardo nella risposta primaria e si sviluppano meno

linfociti T di memoria. Gramaglia et al., supra. Contrariamente ai linfociti T carenti in CD27, la proliferazione precoce non è compromessa in popolazioni di linfociti T CD4+ naive che sono carenti in OX40. Tuttavia, la proliferazione ridotta e la mancata morte cellulare apoptotica si verificano 4-5 giorni dopo l'attivazione, con il risultato che pochi linfociti T sopravvivono a lungo termine. Rogers et al., *Immunity* 15: 445-455 (2001). Con i linfociti T CD8+ OX40-deficienti, la divisione cellulare iniziale non è influenzata, ma l'accumulo di cellule effettrici primarie è notevolmente ridotto 3-6 giorni dopo l'incontro con l'antigene. Croft et al., *Nat. Immunol.* 3: 609-620 (2003).

L'espressione transgenica di OX40L da parte di cellule dendritiche o linfociti T ha aumentato il numero di linfociti T CD4+ che rispondono all'antigene e produce sintomi autoimmuni-simili associati a un'attivazione aberrante dei linfociti T. Brocker et al., *Eur.J. Immunol.* 29: 1610-1616 (1999); Murata et al., *J. Immunol.* 169: 4628-4636 (2002). Dopo l'immunizzazione, l'iniezione di anticorpi anti-OX40 agonisti provoca l'accumulo di un numero maggiore di linfociti T CD4+ reattivi all'antigene al picco della risposta primaria e un potenziamento concomitante del numero di linfociti T di memoria che vengono generati. Gramaglia et al., supra., Bansai-Pakala et al., *Nature Med.* 7: 907-912 (2001), Maxwell et al., *J. Immunol.* 164: 107-112 (2000); Weatherill et al., *Cell. Immunol.* 209, 63-75 (2001). Il potenziato accumulo di CTL effettori primari avviene quando i topi innescati con l'antigene vengono trattati con anticorpo agonista specifico per OX40. De Smedt et al., *J. Immunol.* 168: 661-670 (2002).

Si ritiene che OX40 fornisca un segnale che agisce in ritardo che consente la sopravvivenza di cellule effettrici appena generate al picco della risposta immunitaria primaria. C'è anche una buona evidenza che OX40 funzioni a valle di CD28 - in aggiunta a una aumentata espressione di OX40 mediata dai segnali di CD28, l'analisi funzionale della carenza di CD28 rispetto alla carenza di OX40 ha dimostrato che le prime risposte dei linfociti T primari sono notevolmente compromesse in assenza di segnali di CD28, ma solo le risposte tardive sono compromesse in assenza di segnali di OX40. Rogers et al., *Immunity* 15: 445-455 (2001); Bertram et al., *J. Immunol.* 168: 3777-3785 (2002).

Come risultato, è probabile che l'attivazione di OX40/OX40L, come tramite l'applicazione di anticorpi agonisti, possa essere utile quando combinata con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione per trattare disturbi disfunzionali dei linfociti T.

2. 4-1BB (CD137)/4-1BBL,

Simili a OX40/OX40L, i linfociti T che presentano una carenza di 4-1BB (CD137, TNFRSF9) e 4-1BBL (TNFSF9), mostrano che meno linfociti T CD8+ antigene-reattivi si accumulano nelle risposte primarie quando 4-1BBL è assente e meno linfociti T di memoria si sviluppano. DeBenedette et al., *J. Immunol.* 163: 4833-4841 (1999); Tan et al., *J. Immunol.* 163: 4859-4868 (1999); Tan et al., *J. Immunol.* 164: 2320-2325 (2000). Inoltre, bloccare 4-1BBL non altera la risposta proliferativa iniziale dei linfociti T CD8+, ma sopprime l'accumulo di CTL

effettori al picco della risposta primaria dopo 3-6 giorni, a causa dell'apoptosi di cellule che si sono divise più volte. Cooper et al., Eur. J. Immunol. 32: 521-529 (2002). Anticorpi anti-4-1BB agonisti e APC trasfettate con anti-4-1BBL hanno anche prodotto risultati simili: le risposte di CTL e linfociti T CD4+ sono notevolmente aumentate in vivo. Melero et al., Nature Med. 3: 682-685 (1997); Melero et al., Eur. J. Immunol. 28: 1116-1121 (1998); Takahashi et al., J. Immunol. 162: 5037-5040 (1999); Guinn et al., J. Immunol. 162: 5003-5010 (1999); Halstead et al., Nature Immunol. 3: 536-541 (2002); Takahashi et al., Immunol. Lett. 76: 183-191 (2001); Bansal-Pakala et al., J. Immunol. 169: 5005-5009 (2002). L'anticorpo specifico per 4-1BB non altera la risposta proliferativa iniziale, sostenendo le conclusioni dagli esperimenti di blocco di 4-1BBL e indicando l'attività tardiva di 4-1BB nel fornire segnali di sopravvivenza cellulare.

Come OX40, si ritiene che 4-1BB fornisca un segnale a tarda azione che consente la sopravvivenza di cellule effettrici appena generate al picco della risposta immunitaria primaria. Ci sono anche buone evidenze che 4-1BB funzioni più tardi di CD28 - in aggiunta a una aumentata espressione di OX40 e 4-1BB mediata dai segnali di CD28, l'analisi funzionale della carenza di CD28 rispetto alla carenza di 4-1BB ha dimostrato che le prime risposte dei linfociti T primari sono notevolmente compromesse in assenza di segnali di CD28, ma solo le risposte tardive sono compromesse in assenza di segnali di OX40. Rogers et al., Immunity 15: 445-455 (2001); Bertram et al., J. Immunol. 168: 3777-3785 (2002).

L'anticorpo anti-CD137 agonista può indurre una regressione tumorale nel cancro in cui CTL CD8+ hanno un ruolo centrale. Melero et al., Nat. Med. 3: 682-5 (1997); Hirano et al., Cancer Res. 65(3): 1089-96 (2005). L'espressione costitutiva e inducibile di PD-L1 conferisce resistenza a tali tumori, che è reversibile al momento del blocco di PD-L1. Hirano et al.

Come risultato, è probabile che l'attivazione di 4-1BB/4-1BBL, come tramite l'applicazione di anticorpi agonisti, in particolare in combinazione con antagonisti di PD-L1 (per esempio anticorpo anti-PD-L1) possa essere utile per trattare i disturbi disfunzionali dei linfociti T.

3. CD27/CD27L (CD70)

L'importanza della segnalazione di CD27 (TNFRSF7, S152) e CD27L (CD70, TNFSF7) nelle fasi iniziali di una risposta dei linfociti T è stata dimostrata negli studi di blocco *in vitro*, in cui le interazioni CD27/CD70 sono state interrotte. Oshima et al., Int. Immunol. 10: 517-526 (1998); Agematsu et al., J. Immunol. 153: 1421-1429 (1994); Hintzen et al., J. Immunol. 154: 2612-2623 (1995). I linfociti T che non dispongono di CD27 inizialmente si dividono normalmente, ma poi proliferano scarsamente 3 o più giorni dopo l'attivazione. Hendriks et al., Nature Immunol. 1: 433-440 (2000). Ciò indica che CD27 partecipa a promuovere l'espansione iniziale della popolazione di linfociti T naive, mediante o la soppressione precoce della morte dei linfociti T o agendo sul ciclo cellulare per consentire una divisione prolungata 2-3 giorni dopo l'attivazione. Questo è rafforzato da studi in vivo di topi CD27-deficienti, in cui numeri più bassi di risposte antigene-specifiche (giorni 4-8) e meno linfociti T di

memoria si sviluppano per 3 o più settimane. Hendriks et al., supra. L'espressione di CD27 è sovraregolata presto dopo l'attivazione dei linfociti T, suggerendo che fornisca principalmente segnali che mantengono la proliferazione precoce, prima del picco della risposta effettrice.

Come risultato, è probabile che l'attivazione di CD27/CD27L, anche attraverso l'applicazione di anticorpi agonisti, in particolare in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 descritti nel presente documento, possa essere utile per trattare disturbi disfunzionali dei linfociti T.

4. CD30/CD30L (CD153)

La segnalazione di CD30 (TNFRSF8, Ki-1) e CD30L (CD153, TNFSF8) è co-stimolatrice per diverse funzioni dei linfociti T *in vitro*. Del Prete et al., J. Exp. Med. 182: 1655-1661 (1995), Bowen et al., J. Immunol. 156, 442-449 (1995). Reagenti bloccanti per CD30L hanno soppresso lo sviluppo dei linfociti Th2 e potenziato lo sviluppo dei linfociti Th1 *in vitro*. Questa attività è in accordo con i dati che dimostrano che CD30 è preferenzialmente espresso dalle cellule Th2 e dalle cellule Tc2 citotossiche di tipo 2. Del Prete et al., supra, Nakamura et al., J. Immunol. 158: 2090-2098 (1996). CD30 viene espresso 3-4 giorni dopo l'attivazione di linfociti T naive in risposte primarie non polarizzate. Nakamura et al., supra, indicando che il suo ruolo non è limitato alle risposte dominate dalla citochina di tipo 2.

Mentre i meccanismi esatti di segnalazione di CD30/CD30L non sono chiari, è stato suggerito che potrebbe essere simile a OX40 e 4-1BB. Quando i linfociti T CD8+ antigene-specifici trasferiti in modo adottivo vengono trasferiti in topi CD30L-deficienti, non si accumulano in numeri elevati al picco di una risposta primaria, e si sviluppano meno linfociti T di memoria. Di conseguenza, CD30 potrebbe anche fornire segnali di proliferazione e/o sopravvivenza per consentire la generazione di un elevato numero di linfociti T antigene-specifici al picco delle risposte primarie.

Come risultato, è probabile che l'attivazione di CD27/CD27L, anche attraverso l'applicazione di anticorpi agonisti, in particolare in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 descritti qui, possa essere utile per il trattamento di disturbi disfunzionali dei linfociti T.

5. HVEM/LIGHT

L'effetto di HVEM (HVEA, ATAR, LIGHTR, TNFRSF14, PRO509) e LIGHT (CD258, HVEM, TR2, TNFSF14, PRO726) sulla costimolazione dei linfociti T è complicato da 1) la capacità di LIGHT di legare anche il recettore della linfotossina- β (LT β R) e 2) HVEM che lega LT α 3 solubile. Quindi, qualsiasi studio dell'effetto di HVEM/LIGHT dovrebbe tenere conto anche dell'effetto di altri partner di legame per questo sistema di segnalazione. Bloccare LIGHT può inibire la proliferazione precoce dei linfociti T e la secrezione di citochine nelle reazioni allogeneiche di linfociti misti (MLR). Tamada et al., J. Immunol. 164: 4105-4110 (2000), Kwon et al., J. Biol. Chem. 272: 14272-14276 (1997); Harrop et al., J. Immunol. 161: 1786-1794 (1998); Tamada et al., Nature Med. 6, 283-289 (2000). La produzione di citochine pro-infiammatorie viene soppressa

quando LIGHT è bloccata in allotrapianti di cuore non corrispondenti a MHC. Ye et al., J. Exp. Med. 195: 795-800 (2002). Inoltre, gli innesti di pelle allogenici sono rigettati con cinetica ritardata nei destinatari che sono carenti sia per LIGHT che per CD28. Scheu et al., J. Exp. Med. 195: 1613-1624 (2002). Il suggerimento è che il rigetto ritardato del trapianto possa indicare una soppressione precoce dell'espansione clonale dei linfociti T o della produzione di citochine. Questa conclusione è rafforzata da (i) studi in vitro che dimostrano che gli splenociti LIGHT-deficienti che rispondono a un alloantigene hanno una ridotta produzione di entrambe le citochine TH1 e TH2 e una debole generazione dell'attività dei linfociti T citotossica (CTL) [Sheu et al., Supra.], e (ii) studi in vivo che dimostrano che bloccare LIGHT riduce la generazione di CTL alloreattivi. Tamada et al., Nature Med. 6: 283-289 (2000).

Come risultato, HVEM/LIGHT, per esempio attraverso l'applicazione di anticorpi agonisti, in particolare in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 qui descritti, può essere utile per trattare disturbi disfunzionali dei linfociti T.

II. Definizioni

Un "*allergene*" o "*immunogeno*" è una molecola che può innescare una risposta immunitaria. Come usato qui, il termine copre sia la molecola antigenica stessa che la sua fonte, come granulo pollinico, pelo animale, veleno di insetto o prodotto alimentare. Questo è in contrasto con il termine *antigene*, che si riferisce a una molecola che può essere specificamente riconosciuta da un'immunoglobulina o un recettore di linfociti T. Qualsiasi sostanza estranea in grado di indurre una risposta immunitaria è un potenziale allergene. Molti prodotti chimici differenti di origine sia naturale sia sintetica sono noti per essere allergenici. Le sostanze chimiche organiche naturali complesse, in particolare le proteine, è probabile che causino allergia mediata da anticorpi, mentre semplici composti organici, sostanze chimiche inorganiche e metalli più preferibilmente causano allergie mediate da linfociti T. In alcuni casi, lo stesso allergene può essere responsabile di più di un tipo di allergia. L'esposizione all'allergene può essere attraverso l'inalazione, l'iniezione, l'iniezione o il contatto con la pelle.

"Disfunzione" nel contesto della disfunzione immunitaria, si riferisce ad uno stato di risposta immunitaria ridotta alla stimolazione antigenica. Il termine comprende gli elementi comuni di *esaurimento* e/o *anergia* in cui può verificarsi il riconoscimento dell'antigene, ma la conseguente risposta immunitaria è inefficace per controllare l'infezione o la crescita del tumore.

La "*tolleranza*" o "*tolleranza immunologica*" è l'incapacità del sistema immunitario di montare una risposta immunitaria difensiva verso un particolare antigene. La tolleranza può essere naturale o del sé, in cui il corpo non attacca le sue proprie proteine e antigeni, o può essere indotta, derivante dalla manipolazione del sistema immunitario. La *tolleranza centrale* si verifica durante lo sviluppo di linfociti e opera nel midollo osseo e nel timo. Durante questo processo, i linfociti T e B che riconoscono i propri antigeni vengono eliminati prima di svilupparsi in cellule

completamente immunocompetenti. Questo processo è più attivo durante lo sviluppo del feto, ma continua per tutta la vita quando i linfociti immaturi vengono generati. La *tolleranza dei linfociti T periferici* si riferisce ad una reazione di non risposta funzionale ai propri antigeni che sono presenti nei tessuti periferici, e si verifica dopo che i linfociti T e B maturano e entrano nella periferia. Questi processi includono la soppressione delle cellule autoreattive mediante linfociti T "regolatori" e la generazione di iporeattività (anergia) nei linfociti che incontrano l'antigene in assenza di segnali costimolatori che accompagnano l'infiammazione. La *"tolleranza acquisita"* o *"indotta"* si riferisce all'adattamento del sistema immunitario ad antigeni esterni caratterizzati da una specifica non reattività dei tessuti linfoidi a un dato antigene che in altre circostanze indurrebbe probabilmente un'immunità cellulo-mediata o umorale. Negli adulti, la tolleranza può essere indotta clinicamente da una ripetuta somministrazione di dosi molto elevate di antigene, o di piccole dosi che sono al di sotto della soglia richiesta per la stimolazione di una risposta immunitaria, come tramite somministrazione endovenosa o sublinguale di antigeni solubili. L'immunosoppressione agevola anche l'induzione della tolleranza. La rottura della tolleranza del self può portare ad *autoimmunità*.

"Potenziare la funzione dei linfociti T" significa indurre, provocare o stimolare un linfocita T ad avere una funzione biologica prolungata o amplificata, o rinnovare o riattivare linfociti T esauriti o inattivi. Esempi di potenziamento della funzione dei linfociti T includono: aumentata secrezione di γ -interferone da linfociti T CD8+, aumentata proliferazione, aumentata reattività antigenica (per esempio clearance virale o patogena) rispetto a tali livelli prima dell'intervento. Il livello di potenziamento può essere almeno il 50%, in alternativa 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%. Il modo di misurare questo potenziamento è noto a uno di normale abilità nella tecnica.

Un *"disturbo disfunzionale dei linfociti T"* è un disturbo o una condizione dei linfociti T caratterizzato da una diminuita reattività alla stimolazione antigenica. Un disturbo disfunzionale dei linfociti T può essere un disturbo che è specificamente associato a una segnalazione inappropriatamente aumentata tramite PD-1. Il disturbo disfunzionale del linfocita T può essere quello in cui i linfociti T sono anergici o hanno una diminuita capacità di secernere citochine, proliferare o eseguire attività citolitica. In un aspetto specifico, la diminuita reattività produce un controllo inefficace di un patogeno o di un tumore che esprime un immunogeno. Esempi di disturbi disfunzionali dei linfociti T caratterizzati da disfunzione dei linfociti T includono infezioni acute irrisolte, infezioni croniche e immunità tumorale.

"Infezione cronica" si riferisce a un'infezione in cui un agente infettivo (per esempio, agenti patogeni come virus, batteri, parassiti protozoi, funghi o simili) ha indotto una risposta immunitaria nell'ospite infetto, ma non è stata rimossa o eliminata da tale ospite come durante un'infezione acuta. Le infezioni croniche possono essere *persistenti, latenti o lente*. Mentre le infezioni acute sono tipicamente risolte dal sistema immunitario entro pochi giorni o settimane (per esempio, l'influenza), *le infezioni persistenti* possono persistere a un livello relativamente basso per

mesi, anni, decenni o una vita (per esempio, epatite B). Al contrario, *un'infezione latente* è caratterizzata da un lungo periodo di attività asintomatica punteggiata da un periodo di infezione ad alto grado in rapida crescita e da livelli patogeni elevati (per esempio Herpes simplex). Infine, *un'infezione lenta* è una caratterizzata da un graduale e continuo aumento dei sintomi della malattia, come un lungo periodo di incubazione seguito da un decorso clinico prolungato e progressivo che inizia dopo l'inizio dei sintomi clinici. A differenza delle infezioni latenti e persistenti, l'infezione lenta può non iniziare con un periodo acuto di moltiplicazione virale (per esempio infezione da picomavirus, visnavirus, scrapie, malattia di Creutzfeldt-Jakob). Agenti infettivi esemplificativi capaci di indurre un'infezione cronica includono i virus (per esempio, citomegalovirus, Epstein Barr virus, virus dell'epatite B, virus dell'epatite C, virus herpes simplex, tipi I e II, virus dell'immunodeficienza umana, tipi 1 e 2, papillomavirus umano, virus linfotropici T umani, tipi 1 e 2, virus varicella zoster e simili), batteri (per esempio *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia spp.*, *Helicobacter pylori* e simili), protozoi parassiti (per esempio, *Leishmania spp.*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Trypanosoma spp.*, *Taenia carssiceps* e simili) e funghi (per esempio *Aspergillus spp.*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis carinii* e simili). Agenti infettivi aggiuntivi includono prioni o proteine mal ripiegate che influenzano la struttura del cervello o del neurone ulteriormente propagando il cattivo ripiegamento delle proteine in questi tessuti, con conseguente formazione di placche amiloidi che causano la morte cellulare, danni ai tessuti e infine la morte. Esempi di malattie derivanti dall'infezione da prioni includono: la malattia di Creutzfeldt-Jakob e le sue varietà, la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), l'insonnia familiare fatale (sFI), il kuru, lo scrapie, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) nel bestiame (anche detta malattia della "mucca pazza"), e varie altre forme animali di encefalopatia [per esempio, l'encefalopatia trasmissibile del visone (TME), la malattia da deperimento cronico (CWD) nel cervo a coda bianca, nell'alce e nel cervo mulo, encefalopatia spongiforme felina, encefalopatia degli ungulati esotici (EUE) in nyala, orice e kudu maggiore, encefalopatia spongiforme dello struzzo].

"*Immunità tumorale*" si riferisce al processo in cui i tumori sfuggono al riconoscimento e alla clearance del sistema immunitario. Pertanto, come concetto terapeutico, l'immunità tumorale viene "trattata" quando tale fuga è attenuata, e i tumori sono riconosciuti e attaccati dal sistema immunitario. Esempi di riconoscimento del tumore includono il legame tumorale, il ritiro del tumore e la clearance tumorale.

Un "*antagonista costimolatore B7-negativo*" ("BNCA") è un agente che riduce, blocca, inibisce, abroga o interferisce con il segnale costimolatorio negativo mediato da o tramite proteine della superficie cellulare espresse su linfociti T mediati da un membro della famiglia B7. In un aspetto, un BNCA può da solo, o in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione, rendere non disfunzionale un linfocita T disfunzionale. In un altro aspetto, un BNCA può essere un agente che inibisce la sintesi di acido nucleico o proteine, l'espressione, la segnalazione

e/o l'elaborazione post-espressione di una molecola costimolatrice B7-negativa. In ancora un altro aspetto, un BNCA è un anticorpo, un frammento anticorpale legante l'antigene, oligopeptide di BNCA, RNAi di BNCA o piccola molecola di BNCA che diminuisce, blocca, inibisce, abroga o interferisce con la trasduzione del segnale mediante una molecola costimolatrice B7-negativa. Esempi di molecole costimolatrice B7-negative comprendono: CTLA-4, PD-L1, PD-1, B7.1 (espressi sui linfociti T), PD-L2, B7-H3 e B7-H4.

Un *agonista costimolatorio positivo* è una molecola che aumenta, potenzia, incrementa o facilita un segnale costimolatore mediato da o tramite le proteine della superficie cellulare espresse sui linfociti T. In un aspetto, una molecola costimolatrice positiva può essere un dominio extracellulare, un costrutto solubile o un anticorpo agonista che attiva un percorso costimolatorio positivo. Esempi di molecole costimolatrici positive includono le molecole della superfamiglia B7, per esempio B7.1, B7.2, CD28 e ICOS/ICOSL. Esempi aggiuntivi includono le molecole costimolatrici della famiglia TNFR, per esempio, OX40/OX40L, 41-BB/41-BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L e HVEM/LIGHT.

Una "*piccola molecola*" o una "*piccola molecola organica*" è quella che ha un peso molecolare inferiore a circa 500 Dalton.

Un "*RNA interferente*" "*RNAi*" è un RNA di lunghezza da 10 a 50 nucleotidi che riduce l'espressione di un gene bersaglio, in cui porzioni del filamento sono sufficientemente complementari (per esempio avendo almeno 80% identità rispetto al gene bersaglio). Il metodo dell'interferenza di RNA si riferisce alla soppressione bersaglio-specifica dell'espressione genica (vale a dire, "silenzamento del gene"), che si verifica ad un livello post-trascrizionale (per esempio, traduzione) e comprende tutti i meccanismi post-trascrizionali e trascrizionali dell'inibizione dell'espressione genica mediata dall'RNA, come quelli descritti in PD Zamore, *Science* 296: 1265 (2002) e Hannan e Rossi, *Nature* 431: 371-378 (2004). Come usato qui, RNAi può essere sotto forma di piccolo RNA interferente (siRNA), RNA a forcina breve (shRNA) e/o micro-RNA (miRNA). Tali molecole di RNAi sono spesso complessi di RNA a doppio filamento che può essere espresso in forma di filamenti di RNA separati complementari o parzialmente complementari. I procedimenti sono ben noti nella tecnica per la progettazione di complessi a RNA a doppio filamento. Per esempio, la progettazione e la sintesi di opportuni shRNA e siRNA si possono trovare in Sandy et al., *BioTechniques* 39: 215-224 (2005).

Un "*piccolo RNA interferente*" o siRNA è un duplex di RNA a doppio filamento (dsRNA) di lunghezza da 10 a 50 nucleotidi che riduce l'espressione di un gene bersaglio, in cui porzioni del primo filamento sono sufficientemente complementari (per esempio avendo almeno 80% di identità con il gene bersaglio). Gli siRNA sono progettati specificamente per evitare la risposta antivirale caratterizzata da elevata sintesi dell'interferone, l'inibizione non-specifica della sintesi proteica e la degradazione dell'RNA che spesso provoca il suicidio o la morte della cellula associata all'uso di RNAi nelle cellule di mammifero. Paddison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (3): 1443-8. (2002).

Il termine "forcina" si riferisce ad una struttura di RNA a ciclo di 7-20 nucleotidi. Un "RNA a forcina breve" o shRNA è un RNA a singolo filamento da 10 a 50 nucleotidi di lunghezza caratterizzato da un ripiegamento a forcina che riduce l'espressione di un gene bersaglio, in cui porzioni del filamento di RNA sono sufficientemente complementari (per esempio, avendo almeno l'identità dell'80% al gene bersaglio). Il termine "stelo-ansa" si riferisce ad un accoppiamento tra due regioni di coppie di basi della medesima molecola per formare una doppia elica che termina in una breve ansa non accoppiata, dando una struttura a forma di lecca-lecca.

Un "micro RNA" o "miRNA" (in precedenza noto come stRNA) è un RNA a singolo filamento di circa 10 a 70 nucleotidi di lunghezza inizialmente trascritti come pre-miRNA caratterizzato da una struttura "stem-ansa", che sono successivamente elaborati in miRNA maturo dopo un'ulteriore elaborazione tramite il complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC).

Un "RNA interferente BNCA" o "BNCA RNAi" si lega, preferibilmente specificamente, a un acido nucleico BNCA e riduce la sua espressione. Ciò significa che l'espressione della molecola costimolatrice B7 negativa è più bassa con il BNCA RNAi presente rispetto all'espressione della molecola costimolatrice B7 negativa in un controllo dove il BNCA RNAi non è presente. BNCA RNAi può essere identificato e sintetizzato usando metodi noti (Shi Y., Trends in Genetics 19 (1): 9-12 (2003), WO2003056012, WO2003064621, WO2001/075164, WO2002/044321).

Un "*oligopeptide di BNCA*" è un oligopeptide che si lega, preferibilmente specificamente, a un polipeptide costimolatore B7 negativo, che include un recettore, un ligando o un componente di segnalazione, rispettivamente come descritto qui. Tali oligopeptidi possono essere sintetizzati chimicamente usando la metodologia nota di sintesi degli oligopeptidi o possono essere preparati e purificati usando la tecnologia ricombinante. Tali oligopeptidi sono solitamente almeno circa 5 amminoacidi in lunghezza, alternativamente almeno circa 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 amminoacidi in lunghezza o più. Tali oligopeptidi possono essere identificati senza indebita sperimentazione usando tecniche ben note. A questo riguardo, si è notato che le tecniche per lo screening di librerie oligopeptidiche per gli oligopeptidi che sono in grado di legarsi specificamente a un bersaglio polipeptidico sono ben note nella tecnica (si vedano, per esempio, i Brevetti U.S. N. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; le Pubblicazioni PCT N. WO 84/03506 e WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988),

Cwirla, S. E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. et al. Biochemistry, 30:10832 (1991); Clackson, T. et al. Nature, 352: 624 (1991); Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Kang, A.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991), e Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991).

Un "*antagonista a piccola molecola di BNCA*" o "*piccola molecola di BNCA*" è una molecola organica diversa da un oligopeptide o un anticorpo come qui definito che inibisce, preferibilmente specificamente, un polipeptide costimolatore B7 negativo. Tale inibizione di segnalazione costimolatrice B7 negativa rende preferibilmente un linfocita T disfunzionale responsivo alla stimolazione dell'antigene. Per esempio le piccole molecole di BNCA possono essere identificate e sintetizzate chimicamente usando la metodologia nota (vedere per esempio la pubblicazione PCT N. WO2000/00823 e WO2000/39585). Tali piccole molecole di BNCA di solito sono di dimensioni inferiori a circa 2000 dalton, alternativamente inferiori a circa 1500, 750, 500, 250 o 200 dalton in dimensioni, sono in grado di legarsi, preferibilmente specificamente, a un polipeptidico stimolatore B7 negativo come qui descritto, e possono essere identificate senza indebita sperimentazione utilizzando tecniche ben note. A questo proposito, si nota che le tecniche di screening delle librerie di molecole organiche per le molecole capaci di legarsi ad un polipeptide bersaglio sono ben note nella tecnica (vedere, per esempio, le pubblicazioni PCT N. WO00/00823 e WO00/39585).

Il termine "*antibiotico*" comprende qualsiasi molecola che inibisce o abolisce in modo specifico la crescita di microrganismi come virus, batteri, funghi o protozoi, ma non è letale per l'ospite alla concentrazione e all'intervallo di dosaggio somministrato. Come si usa qui, il termine antibiotico comprende agente antibatterico, agente antivirale, agente antifungino e agente antiprozoi. In un aspetto specifico, un antibiotico non è tossico per l'ospite alla concentrazione somministrata e agli intervalli di dosaggio. Gli *antibiotici antibatterici* o *anti-batterici* possono essere ampiamente classificati come o battericidi (vale a dire che uccidono direttamente) o batteriostatici (vale a dire che impediscono la divisione). Gli antibiotici anti-batterici possono essere ulteriormente sottoclassificati come a stretto spettro (vale a dire che colpiscono solo una piccola classe di sottoinsieme di batteri, per esempio gram-negativi, eccetera) o ad ampio spettro (vale a dire che colpisce un'ampia classe). Esempi di antibiotici includono: (i) amminoglicosidi, per esempio amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, streptomina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicine, per esempio geldanamicina, herbimicina, (iii) carbacefemi, per esempio loracarbef (iv), carbapenemi, *per esempio*, ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporine (prima generazione), *per esempio*, cefadroxil, cefazolina, cefalotina, cefalexina, (vi) cefalosporine (seconda generazione), *per esempio*, cefaclor, cefamandolo, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, (vi) cefalosporine (terza generazione), per esempio cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazone, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibutene, ceftizoxima, ceftriaxone, (vii) cefalosporine (quarta generazione), per esempio cefepime, (viii) cefalosporine (quinta generazione), per esempio ceftobipolo, (ix)

glicopeptidi, per esempio, teicoplanina, vancomicina, (x) macrolidi, per esempio, axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, spettinomina, (xi), monobactami, per esempio, axtreonam, (xii) penicilline, per esempio amoxicillina, ampicillina, axlocillina, carbenicillina, cloxacillina, dicloxacillina, flucloxacillina, mezlocillina, meticillina, nafcillina, ossacillina, penicillina, peperacillina, ticarcillina, (xiii) polipeptidi antibiotici, per esempio bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) chinoloni, *per esempio*, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lemfloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, orfloxacina, trovafloxacina, (xv) solfonammidi, per esempio, mafenide, prontosil, sulfacetammide, sulfametizolo, sulfanilammide, sulfasalazina, sulfisoxazolo, trimetoprim, trimetoprim-sulfametossazolo (TMP-SMX), (xvi) tetracicine, per esempio demeclociclina, doxiciclina, minociclina, ossitetraciclina, tetraciclina e (xvii) altri come arspenamina, cloramfenicolo, clindamicina, lincomicina, etambutolo, fosfomicina, acido fusidico, furazolidone, isoniazide, linezolid, metronidazolo, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamide, quinupristina/dalfopristina, rifampin/rifampicina o tinidazolo.

Il termine "agente antivirale" comprende qualsiasi molecola che inibisce o abolisce la crescita, morbilità e/o sopravvivenza dei virus. Ciò comprende farmaci anti-retrovirali quali (1) **inibitori della trascrittasi inversa**, inclusi per esempio: (a) *inibitori della trascrittasi inversa di analoghi nucleosidici* (NRTI) (per esempio Aciclovir/aciclovir (ZOVIRAX[®], ZOVIR[®]), cidofovir, azidotimidina/zidovudina, (AZT, RETROVIR[®]), didanosina (ddI, VIDEX[®], zalcitabina (ddC, HIVID[®]), stavudina (d4T, ZERIT[®], lamivudina (3TC, EPIVIR[®]), abacavir (ZIAGEN[®]), emtricitabina (EMTRIVA[®]), brivudina (HELPIN[®]), entecavir (BARACLUDE[®]), idoxuridina, viramidina (taribavirina da Valeant Pharmaceuticals), inibitore della polimerasi PCI-6130 di analogo nucleosidico citidina e varianti di profarmaci (per esempio, R7128) di Pharmasset/Roche, inibitore di analogo nucleosidico di Merck/Isis Pharmaceuticals - MK-0608, (b) *inibitori di transcriptasi inversa di analoghi nucleotidici* (NtRTI) (Per esempio, tenofovir (VIREAD[®]), adefovir (PREVEON[®], HEPSERA[®]), fomivirsen (VITRAVENE[®]), (c) *inibitori della trascrittasi inversa non nucleosidici*, (NNRTI), efavirenz (SUSTIVA[®], STOCRIN[®]), nevirapina (VIRAMUNE[®]), Lavirdine (RESCRIPTOR[®]), etravirina (INTELENCE[®]), Ioviride; *Inibitore non nucleosidico di RNA polimerasi RNA-dipendente di HCV* di ViroChem Pharma - VCH-759, *inibitore non nucleosidico dell'inibitore della polimerasi di HCV* di Pfizer - PF-868554; e (d) *inibitori della polimerasi*, tra cui: RNA-polimerasi RNA-dipendente del virus dell'epatite C di Boehringer Ingelheim-BILB-1941, inibitore della RNA polimerasi da Roche-R1626; ACH-0137171 un inibitore della replicasi di Achillion Pharmaceuticals, R7128 inibitore della polimerasi di Roche/Pharmasset, ABT-333 e ABT-072 inibitori di polimerasi di Abbott, BI 207127 - inibitore della polimerasi di Boehringer Ingelheim, PSI-7851 inibitore della polimerasi da Pharmasset, ANA598 Inibitore della polimerasi di Anadys Pharmaceuticals, MK-3281 inibitore della polimerasi di Merck, IDX184 - inibitore di polimerasi di Idenix, GSK 625433 inibitore della polimerasi di Glaxo Smith Kline, INX-189 - inibitore della polimerasi da Inhibitex, NM283 inibitore della polimerasi da Idenix, HCV796 Inibitore

della polimerasi di Wyeth, GL60667 e GS9190 inibitori della polimerasi di Gilead, PF-00868554 0 inibitore della polimerasi di Pfizer, VCH759, VCH916, VX222 e VX759-inibitori della polimerasi di Virochem, IDX184 e IDX375 inibitori della polimerasi di Idenix, BMS650032 - inibitore della polimerasi da Bristol Myers Squibb; (2) **inibitori della proteasi** comprendenti per esempio: saquinavir (FOROVASE®/INVIRASE®), ritonavir (NORVIR®), indinavir (CRIXIVAN®), nelfinavir (VIRACEPT®), amprenavir (AGENERASE®), lopinavir (KALETRA®), atazanavir (REYATAZ®), fosamprenavir (LEXIVA®), tipranavir (APTIVUS®), darunavir (PREZISTA®), telaprevir (VX-950); inibitori della proteasi di HCV di seconda generazione di Vertex Pharmaceuticals - VX-500 e VX-813; inibitore della proteasi NS3/4A di Intermune/Roche - ITMN-191/R-7227, boceprevir, l'inibitore della proteasi da Schering-Plough -SCH 503034, inibitore di proteasi HCV NS3/4A di Medivir/Tibotec - TMC435/TMC435350, ACH-1625 inibitore della proteasi di Achillion Pharmaceuticals, ACH-806 inibitore della proteasi di Achillion/Gilead, BI201335 e BILN 2061 - inibitori della proteasi di Boehringer Ingelheim, SCH 900518/SP900518 (narlaprevir) - inibitore della proteasi di Schering-Plough, MK-7009 inibitore della proteasi di Merck, BMS-650032, BMS-790052 e BMS-791325 inibitori della proteasi di Bristol Myers Squibb, R7227 - inibitore della proteasi di Roche, PHX1766 - inibitore della proteasi da Phenomix, AVL-181 - inibitore della proteasi di Avila Therapeutics, biliverdin, CTS-1027 - inibitore della proteasi di Roche Biosciences, VX985 inibitore della proteasi di Vertex, VCH-759 e VCH-917 - inibitori della proteasi di Virochem/Vertex, IDX-136 e 316 - inibitore della proteasi di Idenix, ABT-450 - inibitore della proteasi di Abbott, VBY 376 - inibitore della proteasi di Virobay; (3) **inibitori di integrasi**, inclusi per esempio: raltegravir (ISENTRESS®), elvitegravir; (4) terapie combinate di inibitori analoghi nucleosidici/analoghi nucleotidici, atripla (tenofovir + emtricitabina + efavirenz), combivir (lamivudina + zidovudina), (5) **inibitori di ingresso o fusione** tra cui per esempio: maraviroc, enfuvirtide, docosanol, anticorpo anti-CD4, anticorpo anti-gp120, anticorpo anti-CCR5, antagonisti di NS5a HCV: (a) A-831, A-689 e AZD 2836 di Arrow Therapeutics, (b) BMS-790052 e BMS-824393 di Bristol Myers Squibb, (c) GSK-625433 di Glaxo Smith Kline, (d) NS4a antagonisti ACH-1095; (5) **inibitori di maturazione** che includono per esempio: bevirimat e vivecon; (6) **inibitori di rilascio virale** compresi per esempio: zanamivir (RELENZA®), oseltamivir (TAMIFLU®), arbidol; (7) **potenziatori della risposta immunitaria**, tra cui per esempio interferone- α (per esempio, BLX-883 e BLX 883 CR di Biolex Therapeutics, belerofon di Nautilus Biotech, IFN- α a lunga durata, IFN- α SR di LG Life Sciences IFN- α 2b CR a lunga durata e IFN- α 2b XL di Flamel Technologies, IFN- α pegilato (per esempio PEG-IFN- α -2a, PEGASYS®, PEG-IFN- α -2b, PEGINTRON®), proteina di fusione IFN- α 2b-sieroalbumina umana (ALBUFERON®); interferone- β , incluso IFN- β -1b (BETASERON®), interferone- γ , interferone- λ , interferone pegilato- λ (per esempio PEG-rIL-29 di ZymoGenetics/Novo Nordisk), interferone- ω /interferone di leucociti II (per esempio Intarcia Therapeutics) agonisti del recettore 7 toll-simile, tra cui imiquimod, isatoribina e loro varianti i profarmaci (per esempio, ANA-975 e ANA-971) di Anadys Pharmaceuticals,

oglu fanide (IM862, L-Glu-L-Trp-OH) e loro varianti lipido- o glicosil-coniugate di Implicit Bioscience, NOV-205 (per esempio, Molixan® - un antivirale peptidico di Novelos Therapeutics, Inc.), l'antivirale EHC18 di Enzo Biochem, gamma-D-glutamyl-L-triptofano (per esempio, SCV-07, SciClone Pharmaceuticals/Verta), aloferon (per esempio, aloferon-1-HGVSGHGQHGQVHG, aloferon-2-GVSGHGQHGQVHG), CPG 10101 - un agonista di TLR-9 di Coley Pharmaceuticals/Actilon; (8) **potenziatori sinergici antivirali**, vale a dire piccole o nessuna proprietà antivirali da soli, ma aumenta l'effetto di altri antivirali, per esempio cloroquina, succo di pompelmo, idrossiurea, leflunomide, acido micofenolico, resveratrolo, ritonavir; come pure altri farmaci antivirali come amantadina, edoxidina, famciclovir (FAMVIR®), penciclovir, foscarnet, fosfonet, ganciclovir (CYTOVENE®, CYMEVENE®, VITRASERT®), gardasil, ibacitabina, imunovir, moroxidina, nexavir, peramivir, pleconaril, podofillotossina, ribavirina, rimantadina, trifluridina, trizivir, tromanadina, trovada, valaciclovir, valganciclovir, vidarabina, e i potenziatori di interferone quali EMZ702 di Transition Therapeutics, istamina dicloridrata (per esempio Ceplene® + IFN- α); e (9) **antivirali vari** o non classificati quali: KPE-02003002 (Artemimol) di Kemin Pharmaceuticals, mitoquinone - agonista antiossidante del coenzima Q10 di Antipodean Pharmaceuticals, inibitori di alfa-glucosidasi I (per esempio MX-3253- celgosivir di Migenix Pharmaceuticals, castanospermina, antagonisti glucocorticoidi (per esempio, inibitori di IRES HCV, mifepristone, VGX-410C di VGX Pharmaceuticals), agonisti epatici (per esempio, PYN17 di Phynova Pharmaceuticals), agenti antivirali derivati da terapie a base di erbe tradizionali, per esempio, PYN18 di Phynova Pharmaceuticals, inibitori della caspasi (per esempio LB-84451 - LG Life Sciences, emricasan - PF-03491390/IDN-6556 di Pfizer), analoghi di ciclosporine che inibiscono la replicazione virale impedendo il legame con ciclofilina A (per esempio SDZ NIM 911 di Novartis, Debio-025 di Debiopharm),

Il termine "agente anti-fungino" comprende qualsiasi molecola che inibisce o abolisce la crescita, morbilità e/o la sopravvivenza dei funghi. Ciò comprende per esempio: (1) antifungini polienici come natammina, rimocidina, filipina, nystatin, amfotericina B, candicina; (2) imidazoli come miconazolo, ketoconazolo (LOTRIMIN®), econazolo, bifonazolo, butoconazolo, fenticonazolo, isoconazolo, oxiconazolo, sertaconazolo (ERTACZO®), sulconazolo, tioconazolo, (3) triazoli quali fluconazolo, itraconazolo, isuvconazolo, ravuconazolo, posaconazolo, voriconazolo, terconazolo; (4) allilammine come terbinafina (LAMISIL®), amorolfina, naftifina (Naftin®), butenafina (LOTRIMIN ULTRA®); (5) echinocandini, come anidulafungina, caspofungina, micafungina e altre sostanze con proprietà antifungine quali acido benzoico, ciclopix, flucitosina, griseofulvina, violetto genziana, aloprogina, tolnaftato (TINACTIN®, DESENEX®, AFTATE®), acido undecilenico, olio di albero del te - ISO 4730 (Olio di Melaleuca, tipo Terpinen-4-olo), olio di citronella, erba limonina, olio d'arancio, olio di palmarosa, patchouli, mirto limonino, olio di semi di neem, olio di cocco.

Il termine "agente antiprotozoi" o "agente antiprotozoico" comprende qualsiasi molecola che inibisce o abolisce la crescita, morbilità

e/o sopravvivenza di organismi protozoi. Esempi di agenti anti-protozoi includono, (1) *agenti anti-malarici*, per esempio, chinino, quinimax, quinidina, quinimax, cloroquina (ARALEN®), idrossicloroquina (PLAQUENIL®), amodiaquina, pirimetamina (DARAPRIM®), sulfadossina, proguanile, mefloquina (LARIAM®), alofantrina, primachina, artemisinina e suoi derivati (per esempio, artemether, artensunato, diidroartemisinina, arteetere), clindamicina e loro combinazioni; (2) inibitori di proteasi, e i farmaci, benzidazolo, buparvaquone, carbarsone, clioquinolo, disulfiram, eflomitina, emetina, furazolidone, meglumina antimonata, melarsoprol, metronidazolo (FLAGYL®), miltefosina, nifurtimox, nitazoxanide, ornidazolo, paromomicina solfato, pentamidina, pirimetamina (DARAPRIM®), secnidazolo, tinidazolo.

Il termine "*vaccino*", come qui utilizzato comprende qualsiasi immunogeno non-patogeno che, quando inoculato in un ospite, induce un'immunità protettiva contro uno specifico agente patogeno. I vaccini possono assumere molte forme. I vaccini possono essere organismi interi che condividono importanti antigeni con il patogeno, ma non sono essi stessi patogeni (per esempio, vaiolo bovino). I vaccini possono anche essere preparati da materiale ucciso (per esempio, vaccino polio di Salk) o attenuato (capacità persa di causare la malattia - per esempio, vaccino polio di Sabin). I vaccini possono anche essere preparati da macromolecole purificate isolate dall'organismo patogeno. Per esempio, i *vaccini tossoidi* (per esempio, tetano e difterite) che contengono la forma inattiva di tossina batterica solubile - che determina la produzione di anticorpi anti-tossici, ma non l'immunità ai batteri intatti. I *vaccini in subunità* (per esempio, epatite B) contengono solo una singola proteina immunogenica isolata dal patogeno di interesse. I *vaccini coniugati con apteni* attaccano determinati epitopi di carboidrati o polipeptidi isolati dagli agenti patogeni di interesse a vettori immunogenici, come il tossoide del tetano. Queste strategie utilizzano essenzialmente gli epitopi come apteni per indurre la produzione di anticorpi, che poi riconoscono lo stesso epitopo nel patogeno nativo. Tuttavia, per essere massimamente efficaci, tali vaccini devono incorporare epitopi di linfociti B e T e gli epitopi dei linfociti T devono essere scelti per assicurare che essi possano essere riconosciuti, presentati e ottengano risposta dai sistemi immunitari degli individui ospiti.

I *vaccini a DNA* sfruttano la capacità delle cellule ospite di captare ed esprimere il DNA codificante le proteine patogene che è iniettato per via intramuscolare.

Esempi di vaccini antivirali che possono essere usati in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 per i procedimenti descritti qui includono: vaccino HCV (virasoma) di Pevion Biotech., TG4040 (MVA-HCV di Transgene viron progettato per migliorare la risposta immunitaria cellulare (Linfociti citotossici T CD4+ e CD8+) contro NS3, NS4 e NS5B, CHRONVAC® - un vaccino a DNA NS3/4a codone-ottimizzato di Inovio Biomedical, vaccini HCV/CpG di Novartis, GI-5005 - un vaccino HCV di Globeimmune, IC41 una miscela di peptidi sintetici aventi gli epitopi di HCV T CD4 e CD8 T in combinazione con poli-L-arginina di Intercell.

Le risposte degli ospiti agli immunogeni possono essere potenziate se somministrate come miscela con *adiuvanti*. Gli immuno adjuvanti funzionano in uno o più dei seguenti modi: (1) prolungando la ritenzione dell'immunogeno, (2) aumentata dimensione efficace dell'immunogeno (e quindi favorendo la fagocitosi e la presentazione ai macrofagi), (3) stimolando l'afflusso di macrofagi o altre cellule immunitarie al sito di iniezione, o (4) promuovendo la produzione locale di citochine e altre attività immunologiche. Esempi di adjuvanti includono: adjuvante completo di Freund (CFA), sali di alluminio e proteine derivate da micobatteri come muramil di- o tri-peptidi.

Il termine "anticorpo" comprende anticorpi monoclonali (inclusi anticorpi a lunghezza intera aventi una regione Fc dell'immunoglobulina), composizioni anticorpali con specificità poliepitopica, anticorpi multispecifici (per esempio anticorpi bispecifici, diabodi e molecole a catena singola, nonché frammenti anticorpali (per esempio, Fab, F(ab')₂ e Fv). Il termine "*immunoglobulina*" (Ig) è usato qui in modo intercambiabile con "*anticorpo*".

L'unità anticorpale di base a 4 catene è una glicoproteina eterotetramerica composta da due catene identiche leggere (L) e da due catene identiche pesanti (H). Un anticorpo IgM è costituito da 5 delle unità base dell'eterotetramero insieme ad un ulteriore polipeptide chiamato catena J, e contiene 10 siti di legame all'antigene, mentre gli anticorpi IgA comprendono da 2-5 delle unità di base a 4 catene che possono polimerizzare per formare assemblaggi polivalenti in combinazione con la catena J. Nel caso di IgG, l'unità a 4 catene è generalmente di circa 150.000 dalton. Ogni catena L è legata ad una catena H mediante un legame disolfuro covalente, mentre le due catene H sono legate tra loro da uno o più legami di disolfuro a seconda dell'isotipo della catena H. Ogni catena H e L ha anche ponti di disolfuro intracatena regolarmente distanziati. Ogni catena H ha al terminale amminico, un dominio variabile (V_H) seguito da tre domini costanti (C_H) per ciascuna delle catene α e γ e quattro domini C_H per gli isotipi μ ed ϵ . Ogni catena L ha al terminale amminico, un dominio variabile (V_L) seguito da un dominio costante all'altra estremità. V_L è allineato con V_H e C_L è allineato con il primo dominio costante della catena pesante (C_{H1}). Si ritiene che residui di amminoacidi particolari costituiscano un'interfaccia tra i domini variabili della catena leggera e della catena pesante. L'accoppiamento di un V_H e di V_L insieme costituisce un singolo sito di legame all'antigene. Per la struttura e le proprietà delle diverse classi di anticorpi, vedere per esempio *Basic and Clinical Immunology*, 8^a edizione, Daniel P. Sties, Abba I. Terr e Tristram G. Parslow (a cura di), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, Pagina 71 e capitolo 6. La catena L da qualsiasi specie vertebrata può essere assegnata a uno di due tipi chiaramente distinti, chiamati kappa e lambda, basati sulle sequenze amminoacidiche dei loro domini costanti. A seconda della sequenza amminoacidica del dominio costante delle loro catene pesanti (CH), le immunoglobuline possono essere assegnate a diverse classi o isotipi. Esistono cinque classi di immunoglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, con catene pesanti designate rispettivamente α , δ , ϵ , γ e μ . Le classi di γ e α sono ulteriormente divise in sottoclassi sulla base di differenze

relativamente minori nella sequenza e nella funzione CH, per esempio, l'uomo esprime le seguenti sottoclassi: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Un anticorpo "*isolato*" è quello che è stato identificato, separato e/o recuperato da un componente del suo ambiente di produzione (per esempio, naturale o ricombinante). Preferibilmente, il polipeptide isolato è privo di associazione con tutti gli altri componenti del suo ambiente di produzione. Componenti contaminanti del suo ambiente di produzione, come quello risultante dalle cellule trasfettate ricombinanti, sono materiali che interferiscono tipicamente con gli usi di ricerca, diagnostica o terapeutici per l'anticorpo, e possono includere enzimi, ormoni e altri soluti proteici o non proteici. Il polipeptide può essere purificato: (1) fino a oltre il 95% in peso dell'anticorpo come determinato, per esempio, dal procedimento Lowry e in alcune forme di realizzazione, fino a più del 99% in peso; (1) fino a un grado sufficiente a ottenere almeno 15 residui della sequenza amminoacidica N-terminale o interna usando un sequenziatore a coppa girevole, oppure (3) all'omogeneità mediante SDS-PAGE in condizioni non riducenti o riducenti usando il blu di Coomassie o, preferibilmente, colorazione con argento. L'anticorpo isolato comprende l'anticorpo in situ nelle cellule ricombinanti poiché almeno un componente dell'ambiente naturale dell'anticorpo non sarà presente. Di solito, tuttavia, un polipeptide o un anticorpo isolato verranno preparati con almeno un passaggio di purificazione.

La "*regione variabile*" o "*dominio variabile*" di un anticorpo si riferisce ai domini ammino-terminali della catena pesante o leggera dell'anticorpo. I domini variabili della catena pesante e della catena leggera possono essere indicati rispettivamente come "VH" e "VL". Questi domini sono generalmente le parti più variabili dell'anticorpo (relative ad altri anticorpi della stessa classe) e contengono i siti di legame all'antigene.

Il termine "variabile" si riferisce al fatto che alcuni segmenti dei domini variabili differiscono in modo estensivo nella sequenza tra gli anticorpi. Il dominio V media il legame all'antigene e definisce la specificità di un particolare anticorpo per il suo particolare antigene. Tuttavia, la variabilità non è distribuita uniformemente in tutto l'intervallo dei domini variabili. Invece, è concentrata in tre segmenti chiamati regioni ipervariabili (HVR) nei domini variabili sia della catena leggera sia della catena pesante. Le porzioni più altamente conservate dei domini variabili sono chiamate regioni comice (FR). I domini variabili delle catene native pesanti e leggere comprendono ognuno quattro regioni FR, che in gran parte adottano una configurazione a foglietti beta, collegate da tre HVR, che formano anse che collegano, e in alcuni casi formano parte di, la struttura a foglietti beta. Le HVR in ciascuna catena sono tenute insieme in stretta prossimità delle regioni FR e, con le HVR dell'altra catena, contribuiscono alla formazione del sito legante l'antigene degli anticorpi (vedere Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Quinta Edizione, Istituto Nazionale della Salute, Bethesda, MD (1991)). I domini costanti non sono coinvolti direttamente nel legame dell'anticorpo a un

antigene, ma presentano diverse funzioni effettrici, come la partecipazione dell'anticorpo nella tossicità cellulare dipendente dall'anticorpo.

Il termine "*anticorpo monoclonale*", come usato qui si riferisce a un anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, vale a dire che gli anticorpi individuali che compongono la popolazione sono identici tranne per eventuali mutazioni naturali e/o modifiche post-traduzione (per esempio isomerizzazioni, amidazioni) che possono essere presenti in quantità minori. Gli anticorpi monoclonali sono altamente specifici, diretti contro un singolo sito antigenico. In contrasto con le preparazioni di anticorpi policlonali che tipicamente includono anticorpi differenti diretti contro differenti determinanti (epitopi), ogni anticorpo monoclonale è diretto contro un singolo determinante sull'antigene. Oltre alla loro specificità, gli anticorpi monoclonali sono vantaggiosi in quanto essi sono sintetizzati dalla coltura di ibridoma, non contaminati da altre immunoglobuline. Il modificatore "monoclonale" indica il carattere dell'anticorpo come ottenuto da una popolazione sostanzialmente omogenea di anticorpi, e non deve essere interpretato come richiedente la produzione dell'anticorpo mediante qualsiasi metodo particolare. Per esempio, gli anticorpi monoclonali da utilizzare secondo la presente invenzione possono essere realizzati con una varietà di tecniche, tra cui, per esempio, il metodo dell'ibridoma (*per esempio*, Kohler e Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edizione 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimenti con DNA ricombinante (vedere, *per esempio*, Brevetto U.S. N. 4,816,567), tecnologie di esposizione su fago (vedere, *per esempio*, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), e tecnologie per produrre anticorpi umani o simili a umani in animali che hanno parti o tutto dei loci o dei geni delle immunoglobuline umane che codificano le sequenze delle immunoglobuline umane (vedere, *per esempio*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); i Brevetti U.S. N. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; e 5,661,016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Il termine "*anticorpo nudo*" si riferisce a un anticorpo che non è coniugato a una porzione citotossica o a una radioetichetta.

I termini "*anticorpo a lunghezza intera*", "*anticorpo intatto*" o "*intero anticorpo*" vengono utilizzati in modo intercambiabile per fare riferimento ad un anticorpo nella sua forma sostanzialmente intatta, a differenza di un frammento anticorpale. In particolare gli anticorpi interi

comprendono quelli con catene pesanti e leggere che includono una regione Fc. I domini costanti possono essere domini costanti di sequenze native (per esempio domini costanti di sequenze native umane) o loro varianti della sequenza amminoacidica. In alcuni casi, l'anticorpo intatto può avere una o più funzioni effettrici.

Un "*frammento anticorpale*" comprende una porzione di un anticorpo intatto, preferibilmente la regione legante l'antigene e/o variabile dell'anticorpo intatto. Esempi di frammenti anticorpali comprendono frammenti Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diabodi; anticorpi lineari (vedere Brevetto U.S. 5,641,870, Esempio 2; Zapata et al., *Protein Eng* 8 (10): 1057-1062 [1995]); molecole anticorpali a catena singola e anticorpi multispecifici formati da frammenti anticorpali. La digestione con papaina degli anticorpi ha prodotto due frammenti leganti l'antigene identici, detti frammenti "Fab", e un frammento residuo "Fc", una designazione che riflette la capacità di cristallizzare prontamente. Il frammento Fab è costituito da un'intera catena L con il dominio della regione variabile della catena H (V_H) e il primo dominio costante di una catena pesante (C_{H1}). Ogni frammento Fab è monovalente rispetto al legame all'antigene, vale a dire che ha un singolo sito di legame all'antigene. Il trattamento con pepsina di un anticorpo produce un singolo grande frammento F(ab')₂ che corrisponde approssimativamente a due frammenti Fab associati con disolfuro aventi una differente attività di legame all'antigene ed è ancora in grado di reticolazione dell'antigene. I frammenti Fab' si differenziano dai frammenti Fab per avere pochi residui aggiuntivi al terminale carbossilico del dominio C_{H1} comprendente una o più cisteine della regione cerniera dell'anticorpo. Fab'-SH è la designazione qui per Fab' in cui i residui di cisteina dei domini costanti portano un gruppo tiolo libero. I frammenti anticorpali F(ab')₂ sono stati originariamente prodotti come coppie di frammenti Fab' che hanno tra loro cisteine cerniere. Sono noti anche altri accoppiamenti chimici di frammenti anticorpali.

Il frammento Fc comprende le porzioni carbossi-terminali di entrambe le catene H tenute insieme da disolfuri. Le funzioni effettrici degli anticorpi sono determinate dalle sequenze nella regione Fc, la regione che è anche riconosciuta dai recettori per Fc (FcR) trovati su certi tipi di cellule.

"Fv" è il frammento anticorpale minimo che contiene un sito completo di riconoscimento e legame dell'antigene. Questo frammento è costituito da un dimero di un dominio di una regione variabile a catena pesante e leggera in associazione stretta, non covalente. Dal ripiegamento di questi due domini emanano sei anse ipervariabili (3 anse ciascuna dalla catena H e L) che contribuiscono ai residui amminoacidici per il legame dell'antigene e conferiscono la specificità di legame all'antigene all'anticorpo. Tuttavia, anche un singolo dominio variabile (o metà di un Fv che comprende solo tre HVR specifiche per un antigene) ha la capacità di riconoscere e legare l'antigene, anche se ad una affinità inferiore rispetto all'intero sito di legame.

"Fv a catena singola" abbreviato anche come "sFv" o "scFv" sono frammenti anticorpali che comprendono i domini anticorpali V_H e V_L collegati in una singola catena polipeptidica. Preferibilmente, il polipeptide sFv comprende inoltre un linker polipeptidico tra i domini V_H e V_L che consente a sFv di formare la struttura desiderata per il legame all'antigene. Per una revisione di sFv, vedere Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore ed., Springer-Verlag, New York, pagg. 269-315 (1994).

"Frammenti funzionali" degli anticorpi dell'invenzione comprendono una porzione di un anticorpo intatto, generalmente compresa la regione legante l'antigene o variabile dell'anticorpo intatto o la regione Fc di un anticorpo che mantiene o ha modificato la capacità di legame di FcR. Esempi di frammenti anticorpali comprendono anticorpi lineari, molecole anticorpali a catena singola e anticorpi multispecifici formati da frammenti anticorpali.

Il termine "diabodi" si riferisce a piccoli frammenti anticorpali preparati mediante la costruzione di frammenti di sFv (vedere il paragrafo precedente) con brevi linker (circa 5-10 residui) tra i domini V_H e V_L così da ottenere l'accoppiamento inter-catena ma non intra-catena dei domini V, determinando in tal modo un frammento bivalente, ovvero un frammento dotato di due siti leganti l'antigene. I diabodi bispecifici sono eterodimeri di due frammenti sFv "collegati" in cui i domini V_H e V_L dei due anticorpi sono presenti su catene polipeptidiche differenti. I diabodi sono descritti in maggiore dettaglio in, per esempio, EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Gli anticorpi monoclonali qui specificatamente includono anticorpi "chimerici" (immunoglobuline) in cui una porzione della catena pesante e/o leggera è identica o omologa a sequenze corrispondenti in anticorpi derivanti da una particolare specie o appartenenti a una particolare classe o sottoclasse di anticorpi, mentre il resto della catena è identico o omologo a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti ad un'altra classe o sottoclasse di anticorpi, nonché frammenti di tali anticorpi, purché presentino la desiderata attività biologica (Brevetto U.S. N. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Gli anticorpi chimerici di interesse qui citati comprendono gli anticorpi PRIMATIZED® in cui la regione legante l'antigene dell'anticorpo è derivata da un anticorpo prodotto, per esempio, immunizzando scimmie macachi con un antigene di interesse. Come si usa qui, "anticorpo umanizzato" viene usato un sottogruppo di "anticorpi chimerici".

Le forme "umanizzate" di anticorpi non umani (per esempio murini) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da un'immunoglobulina non umana. Un anticorpo umanizzato è un'immunoglobulina umana (anticorpo ricevente) in cui i residui di una HVR (qui di seguito definiti) del ricevente sono sostituiti da residui di una HVR di una specie non umana (anticorpo donatore) come mouse, ratto,

coniglio o primate non umano avente la desiderata specificità, affinità e/o capacità. In alcuni casi, i residui di cornice ("FR") dell'immunoglobulina umana sono sostituiti da corrispondenti residui non umani. Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui non presenti nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche possono essere effettuate per perfezionare ulteriormente le prestazioni degli anticorpi, come l'affinità di legame. In generale, un anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutti di almeno uno, e tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le anse ipervariabili corrispondono a quelle di una sequenza di immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le regioni FR sono quelle di una sequenza di immunoglobulina umana, sebbene le regioni FR possano includere una o più sostituzioni di residui di FR individuali che migliorino le prestazioni degli anticorpi, come l'affinità di legame, l'isomerizzazione, l'immunogenicità, eccetera. Il numero di queste sostituzioni amminoacidiche in FR è tipicamente non più di 6 nella catena H e nella catena L, non più di 3. L'anticorpo umanizzato facoltativamente comprenderà anche almeno una porzione di una regione costante di immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di una immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli, vedere per esempio Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); e Presta, Curr. Operazione. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Vedere anche, per esempio, Vaswani e Hamilton, Ann. Allergia, Asma e Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transazioni 23: 1035-1038 (1995); Hurler e Gross, Curr. Operazione. Biotech. 5: 428-433 (1994); e i Brevetti U.S. N. 6,982,321 e 7,087,409.

Un "*anticorpo umano*" è un anticorpo che possiede una sequenza amminoacidica corrispondente a quella di un anticorpo prodotto da un essere umano e/o è stato fatto utilizzando una qualsiasi delle tecniche per la produzione di anticorpi umani come descritto qui. Questa definizione di un anticorpo umano esclude in modo specifico un anticorpo umanizzato che comprende residui leganti l'antigene non umani. Gli anticorpi umani possono essere prodotti usando varie tecniche note nell'arte, comprese le librerie esposte su fago. Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991). Inoltre disponibili per la preparazione di anticorpi monoclonali umani sono i procedimenti descritti in Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991). Vedere anche van Dijk e van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Gli anticorpi umani possono essere preparati somministrando l'antigene ad un animale transgenico che è stato modificato per produrre tali anticorpi in risposta alla stimolazione antigenica, ma i cui loci endogeni sono stati disabilitati, per esempio, xenotopi immunizzati (vedere, per esempio, i Brevetti U.S. N. 6,075,181 e 6,150,584 relativi alla tecnologia XENOMOUSE™). Vedere anche, per esempio, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006) riguardanti anticorpi umani generati attraverso la tecnologia dell'ibridoma di cellula B umana.

Il termine "regione ipervariabile", "HVR" o "HV", quando viene utilizzato qui si riferisce alle regioni di un dominio variabile

anticorpale che sono ipervariabili nelle anse strutturalmente definite della sequenza e/o della forma. Generalmente, gli anticorpi comprendono sei HVR; tre nella VH (H1, H2, H3) e tre nella VL (L1, L2, L3). Negli anticorpi nativi, H3 e L3 mostrano la maggior diversità delle sei HVR, e H3 in particolare si ritiene che abbia un ruolo unico nel conferire una precisa specificità agli anticorpi. Vedere, per esempio, Xu et al., *Immunity* **13**: 37-45 (2000); Johnson e Wu, in *Metodi in Biologia Molecolare* **248**: 1-25 (Lo, a cura di, Human Press, Totowa, NJ, 2003). Infatti, gli anticorpi camelidi naturali costituiti da una sola catena pesante sono funzionali e stabili in assenza di catena leggera. Vedere, per esempio, Hamers-Casterman et al., *Nature* **363**: 446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* **3**: 733-736 (1996).

Numerose delineazioni di HVR sono in uso e sono qui incluse. Le regioni di determinazione delle complementarietà di Kabat (CDR) sono basate sulla variabilità di sequenza e sono le più comunemente utilizzate (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)). Chothia si riferisce invece alla posizione delle anse strutturali (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* **196**: 901-917 (1987)). Le HVR di AbM rappresentano un compromesso tra le HVR di Kabat e le anse strutturali di Chothia, e vengono utilizzate dal software di modellazione degli anticorpi AbM di Oxford Molecular. Le HVR di "contatto" si basano su un'analisi delle strutture cristalline complesse disponibili. I residui di ciascuna di queste HVR sono riportati di seguito.

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contatto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Numerazione di Kabat)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Numerazione di Chothia)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Le HVR possono comprendere "HVR estese" come segue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) e 89-97 o 89-96 (L3) in VL e 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) e 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) in VH. I residui di dominio variabile sono numerati secondo Kabat et al., supra, per ciascuna di queste definizioni.

L'espressione "numerazione dei residui del dominio variabile come in Kabat" o "numerazione delle posizioni amminoacidiche come in Kabat" e loro variazioni, si riferisce al sistema di numerazione utilizzato per domini variabili a catena pesante o domini variabili a catena leggera della compilazione degli anticorpi in Kabat et al., supra. Utilizzando questo sistema di numerazione, l'effettiva sequenza amminoacidica lineare può

contenere meno o ulteriori amminoacidi corrispondenti a un accorciamento di, o a un inserimento in, una FR o HVR del dominio variabile. Per esempio, un dominio variabile a catena pesante può includere un inserto di un singolo amminoacido (residuo 52a secondo Kabat) dopo il residuo 52 di H2 e residui inseriti (per esempio residui 82a, 82b e 82c, eccetera, secondo Kabat) dopo il residuo 82 di FR a catena pesante. La numerazione Kabat dei residui può essere determinata per un determinato anticorpo allineandolo a regioni di omologia della sequenza dell'anticorpo con una sequenza numerata Kabat "standard".

I residui "cornice" o "FR" sono quei residui dei domini variabili diversi dai residui di HVR come definito qui.

Una "cornice di consenso umana" o una "cornice umana accettore" è una cornice che rappresenta i più comuni residui amminoacidici in una selezione di sequenze di comici VL o VH di immunoglobuline umane. Generalmente, la selezione delle sequenze VL o VH di immunoglobuline umane è da un sottogruppo di sequenze di dominio variabile. In genere, il sottogruppo di sequenze è un sottogruppo come in Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Esempi inclusi per VL, il sottogruppo può essere il sottogruppo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV come in Kabat et al., supra. Inoltre, per VH, il sottogruppo può essere il sottogruppo I, il sottogruppo II o il sottogruppo III come in Kabat et al., supra. In alternativa, una cornice di consenso umana può essere derivata da quanto sopra in cui determinati residui, come quando un residuo di cornice umana viene selezionato in base alla sua omologia alla cornice donatore allineando la sequenza della cornice donatore con una raccolta di varie sequenze cornice umane. Una cornice umana accettore "derivata da" una cornice di immunoglobuline umane o una cornice di consenso umana può comprendere la sua stessa sequenza amminoacidica, oppure può contenere cambiamenti della sequenza amminoacidica preesistenti. Il numero di cambiamenti di amminoacidi preesistenti può essere 10 o meno, 9 o meno, 8 o meno, 7 o meno, 6 o meno, 5 o meno, 4 o meno, 3 o meno, o 2 o meno.

Una "cornice di consenso del sottogruppo III di VH" comprende la sequenza di consenso ottenuta dalle sequenze di amminoacidi nel sottogruppo III pesante variabile di Kabat et al., supra. La sequenza amminoacidica della cornice di consenso del sottogruppo III di VH può comprendere almeno una porzione o tutte di ciascuna delle seguenti sequenze: EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAAS (HC-FR1) (SEQ ID NO: 4), WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2) (SEQ ID NO: 5), RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3) (SEQ ID NO: 6), WGQGTLVTVSA (HC-FR4), (SEQ ID NO: 7).

Una "cornice di consenso di kappa I di VL" comprende la sequenza di consenso ottenuta dalle sequenze di amminoacidi nel sottogruppo I di kappa leggero variabile di Kabat et al., supra. La sequenza amminoacidica della cornice di consenso del sottogruppo I di VH può comprendere almeno una porzione o tutte di ciascuna delle seguenti sequenze: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO: 11),

WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO: 12), GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (LC-FR3) (SEQ ID NO: 13), FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (SEQ ID NO: 14).

Una "*modificazione amminoacidica*" in una posizione specificata, per esempio della regione Fc, si riferisce alla sostituzione o alla delezione del residuo specificato, o all'inserzione di almeno un residuo amminoacidico adiacente al residuo specificato. L'inserzione "adiacente" a un residuo specificato significa inserzione all'interno di uno o due residui di esso. L'inserzione può essere N-terminale o C-terminale al residuo specificato. La modificazione amminoacidica preferita qui è una sostituzione.

Un anticorpo "*ad affinità maturata*" è uno con una o più alterazioni in una o più delle sue HVR che provocano un miglioramento dell'affinità dell'anticorpo per l'antigene, rispetto a un anticorpo d'origine che non possiede tali alterazioni. Un anticorpo ad affinità maturata può presentare affinità nanomolari o persino picomolari per l'antigene bersaglio. Gli anticorpi ad affinità maturata sono prodotti con procedure note nella tecnica. Per esempio, Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) descrive la maturazione dell'affinità mediante il rimescolamento dei domini VH e VL. La mutagenesi casuale di HVR e/o dei residui di cornice è descritta, per esempio, da Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); E Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

Come usato qui, il termine "*si lega specificamente a*" o è "*specifico per*" si riferisce a interazioni misurabili e riproducibili come il legame tra un bersaglio e un anticorpo, che è determinante della presenza del bersaglio in presenza di una popolazione eterogenea di molecole tra cui molecole biologiche. Per esempio, un anticorpo che si lega specificamente a un bersaglio (che può essere un epitopo) è un anticorpo che lega questo bersaglio con maggiore affinità, avidità, più prontamente e/o con maggiore durata rispetto a quanto si lega ad altri bersagli. L'entità del legame di un anticorpo ad un bersaglio non correlato può essere inferiore a circa il 10% del legame dell'anticorpo al bersaglio come misurato, per esempio, mediante un radioimmunosaggio (RIA). In alcune forme di realizzazione, un anticorpo che si lega specificamente ad un bersaglio ha una costante di dissociazione (Kd) di $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo si lega specificamente ad un epitopo su una proteina che è conservato tra la proteina da diverse specie. In un'altra forma di realizzazione, il legame specifico può includere, ma non richiede un legame esclusivo.

Un anticorpo "bloccante" o un anticorpo "antagonista" è quello che inibisce o riduce un'attività biologica dell'antigene che lega. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi bloccanti o gli anticorpi antagonisti sostanzialmente o completamente inibiscono l'attività biologica dell'antigene. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione bloccano la segnalazione tramite PD-1 in modo da ripristinare una risposta funzionale da

parte dei linfociti T da uno stato disfunzionale alla stimolazione dell'antigene.

Un "agonista" o anticorpo attivante è quello che potenzia o inizia la segnalazione da parte dell'antigene a cui si lega. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi agonisti provocano o attivano la segnalazione senza la presenza del ligando naturale.

Il termine "*fase solida*" descrive una matrice non acquosa a cui l'anticorpo della presente invenzione può aderire. Esempi di fasi solide comprese qui comprendono quelle formate parzialmente o interamente di vetro (per esempio vetro a pori controllati), polisaccaridi (per esempio agarosio), poliacrilammidi, polistirene, alcool polivinilico e siliconi. A seconda del contesto, la fase solida può comprendere il pozzetto di una piastra da saggio; In altri è una colonna di purificazione (per esempio una colonna per cromatografia di affinità). Questo termine comprende anche una fase solida discontinua di particelle discrete, come quelle descritte nel Brevetto U.S. N. 4,275,149.

Le "*funzioni effettrici dell'anticorpo*" si riferiscono a quelle attività biologiche attribuibili alla regione Fc (una regione Fc regione di sequenza nativa o una regione Fc variante della sequenza amminoacidica) di un anticorpo, e variano con l'isotipo dell'anticorpo. Esempi di funzioni effettrici dell'anticorpo includono: la citotossicità dipendente dal legame di C1q e dal complemento; il legame al recettore per Fc; la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC); fagocitosi; sottoregolazione dei recettori della superficie cellulare (per esempio, recettori delle cellule B); E l'attivazione delle cellule B. La funzione effettrice dell'anticorpo "*ridotta o minimizzata*" significa che è ridotta di almeno il 50% (alternativamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) dal wild-type o dall'anticorpo non modificato. La determinazione della funzione effettrice dell'anticorpo è prontamente determinabile e misurabile da uno esperto nella tecnica. Le funzioni effettrici dell'anticorpo di legame al complemento, citotossicità dipendente dal complemento e citotossicità dipendente dall'anticorpo possono essere influenzate. La funzione effettrice può essere eliminata attraverso una mutazione nella regione costante che ha eliminato la glicosilazione, per esempio "mutazione non effettrice". La mutazione non effettrice può essere una mutazione N297A o DANA (D265A + N297A) nella regione CH2. Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001). In alternativa, mutazioni aggiuntive che comportano una funzione effettrice ridotta o eliminata includono: K322A e L234A/L235A (LALA). In alternativa, la funzione effettrice può essere ridotta o eliminata attraverso tecniche di produzione, come l'espressione in cellule ospite che non glicosilano (per esempio E. coli) o in cui determinano un alterato schema di glicosilazione che è inefficace o meno efficace nella promozione della funzione effettrice (per esempio, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278 (5): 3466-3473 (2003).

La "*citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente*" o ADCC si riferisce ad una forma di citotossicità in cui l'Ig secreta legata ai recettori di Fc (FcR) presenti in alcune cellule citotossiche (per esempio cellule naturali killer (NK), neutrofilo e macrofagi) consentono a queste

cellule effettrici citotossiche di legarsi specificamente ad una cellula bersaglio portante l'antigene e successivamente uccidere la cellula bersaglio con le citotossine. Gli anticorpi "amano" le cellule citotossiche e sono richiesti per l'uccisione della cellula bersaglio mediante questo meccanismo. Le cellule primarie per mediare le cellule ADCC, NK, esprimono solo Fc γ RIII, mentre i monociti esprimono Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. L'espressione di Fc sulle cellule ematopoietiche è riepilogata nella Tabella 3 a pagina 464 di Ravetch e Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Per valutare l'attività ADCC di una molecola di interesse, può essere eseguito un saggio ADCC *in vitro*, come quello descritto nel Brevetto U.S. N. 5,500,362 o 5,821,337. Le cellule effettrici utili per tali saggi includono le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e le cellule natural killer (NK). In alternativa, o in aggiunta, l'attività ADCC della molecola di interesse può essere valutata *in vivo*, per esempio in un modello animale come quello descritto in Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998).

Se non altrimenti indicato qui, la numerazione dei residui in una catena pesante di immunoglobulina è quella dell'indice UE come in Kabat et al., supra. L'"indice UE come in Kabat" si riferisce alla numerazione dei residui dell'anticorpo IgG1 UE umano.

Il termine "*regione Fc*" è qui usato per definire una regione C-terminale di una catena pesante di immunoglobulina, comprese regioni Fc di sequenza nativa e regioni Fc varianti. Sebbene i confini della regione Fc di una catena pesante dell'immunoglobulina possano variare, la regione Fc della catena pesante di IgG umana è di solito definito che si estende da un residuo amminoacidico in posizione Cys226, o da Pro230, fino al suo terminale carbossilico. La lisina C-terminale (residuo 447 secondo il sistema di numerazione UE) della regione Fc può essere rimossa, per esempio, durante la produzione o la purificazione dell'anticorpo, oppure ingegnerizzando in maniera ricombinante l'acido nucleico che codifica una catena pesante dell'anticorpo. Di conseguenza, una composizione di anticorpi intatti può comprendere popolazioni di anticorpi con tutti i residui K447 rimossi, popolazioni di anticorpi senza residui K447 rimossi, e popolazioni di anticorpi aventi una miscela di anticorpi con e senza il residuo K447.

"*Recettore per Fc*" o "*FcR*" descrive un recettore che si lega alla regione Fc di un anticorpo. Il FcR preferito è FcR umano di sequenza nativa. Inoltre, un FcR preferito è quello che lega un anticorpo IgG (un recettore gamma) e comprende recettori delle sottoclassi Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, comprese le varianti alleliche e le forme alternativamente giuntate di questi recettori, i recettori Fc γ RII includono Fc γ RIIA (un "recettore attivante ") e Fc γ RIIB (un "recettore inibitore "), che hanno sequenze amminoacidiche simili che si differenziano principalmente nei loro domini citoplasmatici. Il recettore attivante Fc γ RIIA contiene un motivo di attivazione a base di tirosina dell'immunorecettore (ITAM) nel suo dominio citoplasmatico. Il recettore inibitore Fc γ RIIB contiene un motivo di inibizione basata sulla tirosina dell'immunorecettore (ITIM) nel suo dominio citoplasmatico. (vedere M. Daëron, Annu Rev. Immunol 15: 203-234 (1997), I FcR sono recensiti in Ravetch e Kinet, Annu Rev. Immunol 9: 457-

92 (1991), Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994) e de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Altri FcR, inclusi quelli da identificare in futuro, sono qui compresi nel termine "FcR".

Il termine "*recettore per Fc*" o "*FcR*" comprende anche il recettore neonatale, *FcRn*, che è responsabile del trasferimento di IgG materno al feto. Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) e Kim et al., J. Immunol. 24, 249 (1994). Sono noti i procedimenti per misurare il legame a FcRn (vedere per esempio Ghetie e Ward, Immunol., 18: (12): 592-8 (1997), Ghetie et al., Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997) Hinton et al., J. Biol. Chem 279 (8): 6213-6 (2004), WO 2004/92219 (Hinton et al.). Il legame a FcRn in vivo e l'emivita nel siero di polipeptidi di legame ad alta affinità per FcRn possono essere saggiati, per esempio, in topi transgenici o linee cellulari umane trasfettate che esprimono FcRn umano, o nei primati a cui vengono somministrati i polipeptidi aventi una regione Fc variante. WO 2004/42072 (Presta) descrive varianti anticorpali che miglioravano o diminuivano il legame ai FcR. Vedere anche, per esempio, Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (2): 6591-6604 (2001).

Le "*cellule effettrici*" sono leucociti che esprimono uno o più FcR e svolgono funzioni effettrici. In un aspetto, le cellule effettrici esprimono almeno FcγRIII e svolgono funzioni effettrici ADCC. Esempi di leucociti umani che mediano ADCC includono le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), cellule natural killer (NK), monociti, linfociti T citotossici e neutrofilii. Le cellule effettrici possono essere isolate da una fonte nativa, per esempio sangue. Le cellule effettrici sono generalmente linfociti associati alla fase effettrice e funzionano per produrre citochine (linfociti T helper), uccidendo le cellule infettate da patogeni (linfociti T citotossici) o secernendo anticorpi (linfociti B differenziati).

La "*citotossicità dipendente dal complemento*" o "*CDC*" si riferisce alla lisi di una cellula bersaglio in presenza di complemento. L'attivazione del percorso classico del complemento è iniziata con il legame del primo componente del sistema di complemento (C1q) agli anticorpi (della sottoclasse appropriata) che vengono legati al loro antigene affine. Per valutare l'attivazione del complemento, un saggio per CDC, per esempio, come descritto in Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996), può essere eseguito. Varianti di anticorpi con sequenze amminoacidiche della regione Fc alterate e capacità di legame a C1q aumentata o diminuita sono descritte nel Brevetto US No. 6,194,551B1 e W099/51642. Vedere, anche, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Il sito di N-glicosilazione in IgG è a Asn297 nel dominio CH2. La presente invenzione fornisce anche composizioni di un anticorpo umanizzato, legante l'antigene avente una regione Fc con funzione effettrice ridotta o assente. Un modo in cui questo può essere compiuto è una sostituzione A297N, che è stato precedentemente dimostrato che abolisce il legame al complemento e la funzione effettrice ("mutante di Fc non effettrice") in un anticorpo anti-CD20. Idusogie et al., supra. Come risultato di questa mutazione, la produzione di anticorpi anti-PD-L1 delle presenti invenzioni contenenti questa mutazione di Fc nelle cellule di mammifero come CHO non avrà alcuna glicosilazione e, a sua volta, determina una

funzione effettrice ridotta o minima. In alternativa, la funzione effettrice dell'anticorpo può essere eliminata senza sostituzione CH2 mediante l'espressione in cellule non di mammifero quali *E. Coli*.

L'"affinità di legame" si riferisce generalmente alla forza della somma totale di interazioni non covalenti tra un singolo sito di legame di una molecola (per esempio, un anticorpo) e il suo partner di legame (per esempio, un antigene). Se non altrimenti indicato, come usato qui, l'"affinità di legame" si riferisce all'affinità di legame intrinseca che riflette un'interazione 1:1 tra i membri di una coppia di legame (per esempio, anticorpo e antigene). L'affinità di una molecola X per il suo partner Y può essere generalmente rappresentata dalla costante di dissociazione (Kd). L'affinità può essere misurata con procedimenti comuni noti nella tecnica, inclusi quelli descritti qui. Gli anticorpi a bassa affinità in genere legano l'antigene lentamente e tendono a dissociarsi prontamente, mentre gli anticorpi ad alta affinità in genere legano l'antigene più velocemente e tendono a rimanere legati più a lungo. Una varietà di procedimenti per misurare l'affinità di legame è nota nella tecnica, ognuno dei quali può essere utilizzato per gli scopi della presente invenzione. Le forme di realizzazione specifiche illustrative ed esemplificative per misurare l'affinità di legame sono descritte in quanto segue.

La "Kd" o il "valore di Kd" secondo questa invenzione è misurato in una forma di realizzazione con un saggio di legame all'antigene radioetichettato (RIA) eseguito con la versione Fab dell'anticorpo e la molecola dell'antigene come descritto dal saggio seguente che misura l'affinità di legame in soluzione di Fab per l'antigene equilibrando Fab con una minima concentrazione di antigene etichettato-^(125I) in presenza di una serie di titolazione dell'antigene non etichettato, quindi catturando l'antigene legato con una piastra rivestita con anticorpi anti-Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881). Per stabilire le condizioni per il saggio, le piastre da microtitolazione (Dynex) vengono ricoperti di notte con 5 ug/ml di un anticorpo di cattura anti-Fab (Cappel Labs) in carbonato di sodio 50 mM (pH 9,6) e successivamente bloccati con il 2% (p/v) di siero albumina bovina in PBS per due a cinque ore a temperatura ambiente (circa 23°C). In una piastra non adsorbente (Nunc # 269620), l'antigene- [¹²⁵I] 100 pM o 26 pM viene mescolato con diluizioni seriali di un Fab di interesse (compatibile con la valutazione di un anticorpo anti-VEGF, Fab-12, in Presta et Al., (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599). Il Fab di interesse viene poi incubato per tutta la notte; tuttavia, l'incubazione può continuare per un periodo più lungo (per esempio, 65 ore) per assicurare che l'equilibrio sia raggiunto. Successivamente, le miscele vengono trasferite alla piastra di cattura per l'incubazione a temperatura ambiente per un'ora. La soluzione viene quindi rimossa e la piastra lavata otto volte con 0,1% Tween-20 in PBS. Quando le piastre sono essiccate, si aggiungono 150 ul/pozzetto di scintillante (MicroScint-20; Packard), e le piastre vengono conteggiate su un contatore gamma Topcount (Packard) per dieci minuti. Le concentrazioni di ciascun Fab che danno meno del o uguale al 20% di legame massimo sono scelte per l'utilizzo in saggi di legame competitivi.

La K_d può essere misurata usando saggi di risonanza plasmonica di superficie utilizzando uno strumento BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25° C con chip di antigene immobilizzato CM5 a ~ 10 unità di risposta (RU). In breve, i chip di biosensori di destrano carbossimetilato (CM5, BIAcore Inc.) vengono attivati con N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide cloridrato (EDC) e N-idrossisuccinimmide (NHS) secondo le istruzioni del fornitore. L'antigene viene diluito con acetato di sodio 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/ml (~ 0,2 µM) prima dell'iniezione ad una velocità di flusso di 5 µl/min per raggiungere circa 10 unità di risposta (RU) di proteina accoppiata. Dopo l'iniezione di antigene, viene iniettata etanolamina 1 M per bloccare i gruppi che non hanno reagito. Per le misurazioni di cinetica, vengono iniettate in PBS diluizioni seriali di due volte di Fab (da 0,78 nM a 500 nM) con tensioattivo TWEEN 20™ 0,05% (PBST) a 25° C a una velocità di flusso di circa 25 µl/min. I tassi di associazione (k_{on}) e i tassi di dissociazione (k_{off}) sono calcolati usando un semplice modello di legame Langmuir uno a uno (BIAcore® Evaluation Software versione 3.2) adattando contemporaneamente i sensogrammi di associazione e dissociazione. La costante di dissociazione all'equilibrio (K_d) è calcolata come il rapporto k_{off}/k_{on} . Vedere, per esempio, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Se il tasso-on supera $10^6 M^{-1} s^{-1}$ con il test di risonanza plasmonica di superficie sopra riportato, allora il tasso-on può essere determinato usando una tecnica di smorzamento della fluorescenza che misura l'aumento o la diminuzione nell'intensità di emissione di fluorescenza (eccitazione = 295 Nm, emissione = 340 nm, passabanda di 16 nm) a 25° C di un anticorpo anti-antigene 20 nM (forma Fab) in PBS, pH 7,2, in presenza di concentrazioni crescenti di antigene come misurato in uno spettrometro, come uno spettrofotometro dotato di arresto del flusso (Aviv Instruments) o uno spettrofotometro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cuvetta mescolata.

Un "tasso-on", "tasso di associazione" o " k_{on} " secondo questa invenzione possono anche essere determinati come sopra descritto utilizzando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25° C con chip di antigene immobilizzato CM5 a circa 10 unità di risposta (RU). In breve, i chip di biosensori di destrano carbossimetilato (CM5, BIAcore Inc.) vengono attivati con N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)-carbodiimmide cloridrato (EDC) e N-idrossisuccinimmide (NHS) secondo le istruzioni del fornitore. L'antigene viene diluito con acetato di sodio 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/ml (\approx 0,2 µM) prima dell'iniezione ad una velocità di flusso di 5 µl/min per raggiungere circa 10 unità di risposta (RU) di proteina accoppiata. Dopo l'iniezione di antigene, viene iniettata etanolamina 1 M per bloccare i gruppi che non hanno reagito. Per le misurazioni di cinetica, vengono iniettate in PBS diluizioni seriali di due volte di Fab (da 0,78 nM a 500 nM) con tensioattivo Tween 20 0,05% (PBST) a 25° C a una velocità di flusso di circa 25 µl/min. I tassi di associazione (k_{on}) e i tassi di dissociazione (k_{off}) sono calcolati usando un semplice modello di legame Langmuir uno a uno (BIAcore® Evaluation Software versione 3.2) adattando contemporaneamente i sensogrammi di associazione e dissociazione. La costante di dissociazione all'equilibrio (K_d) è calcolata come il rapporto k_{off}/k_{on} . Vedere, per esempio, Chen, Y., et

al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. Tuttavia, se il tasso-on supera $10^6 M^{-1} s^{-1}$ con il test di risonanza plasmonica di superficie sopra riportato, allora il tasso-on può essere determinato usando una tecnica di smorzamento della fluorescenza che misura l'aumento o la diminuzione nell'intensità di emissione di fluorescenza (eccitazione = 295 Nm, emissione = 340 nm, passabanda di 16 nm) a 25° C di un anticorpo anti-antigene 20 nM (forma Fab) in PBS, pH 7,2, in presenza di concentrazioni crescenti di antigene come misurato in uno spettrometro, come uno spettrofotometro dotato di arresto del flusso (Aviv Instruments) o uno spettrofotometro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cuvetta mescolata.

La frase "*sostanzialmente ridotta*" o "*sostanzialmente diversa*", come qui usata, indica un grado sufficientemente elevato di differenza tra due valori numerici (generalmente uno associato a una molecola e l'altro associato a una molecola di riferimento/confronto) in modo tale che uno esperto nella tecnica considererebbe la differenza tra i due valori di significatività statistica nel contesto della caratteristica biologica misurata da detti valori (per esempio, valori di Kd). La differenza tra detti due valori è, per esempio, maggiore di circa il 10%, maggiore di circa il 20%, maggiore di circa il 30%, maggiore di circa il 40% e/o maggiore di circa il 50% come funzione del valore per la molecola di riferimento/confronto.

Il termine "*sostanzialmente simile*" o "*sostanzialmente il medesimo*", come qui usato, indica un grado sufficientemente elevato di similarità tra due valori numerici (per esempio, uno associato a un anticorpo dell'invenzione e l'altro associato a un anticorpo di riferimento/confronto), in modo tale che uno esperto nella tecnica considererebbe la differenza tra i due valori di poca o nessuna significatività biologica e/o statistica nel contesto della caratteristica biologica misurata da detti valori (per esempio, valori di Kd). La differenza tra detti due valori è, per esempio, minore di circa il 50%, minore di circa il 40%, minore di circa il 30%, minore di circa il 20% e/o minore di circa il 10% come funzione del valore di riferimento/confronto.

"L'identità di sequenza amminoacidica percentuale (%)" e "omologia" rispetto a un peptide, polipeptide o sequenza di anticorpo sono definiti come la percentuale di residui amminoacidici in una sequenza candidato che sono identici ai residui amminoacidici nella specifica sequenza peptidica o polipeptidica, dopo allineamento delle sequenze e introduzione di spazi, se necessario, per ottenere l'identità di sequenza percentuale massima, e non considerando alcuna sostituzione conservativa come parte dell'identità di sequenza. L'allineamento per determinare la percentuale di identità di sequenza amminoacidica può essere ottenuto in vari modi che rientrano nell'abilità della tecnica, per esempio utilizzando software informatici pubblicamente disponibili come il software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Gli esperti nella tecnica possono determinare i parametri appropriati per la misurazione dell'allineamento, compresi eventuali algoritmi necessari per ottenere un allineamento massimo sulla lunghezza totale delle sequenze da confrontare. Per gli scopi del presente documento, invece, i valori dell'identità di sequenza amminoacidica % vengono generati utilizzando il programma per computer di confronto delle sequenze ALIGN-2, di Genentech, Inc. Il

codice sorgente di ALIGN-2 è stato archiviato con la documentazione dell'utente nell'U.S. Copyright Office, Washington DC, 20559, dove è registrato con il numero di registrazione di U.S. Copyright TXU510087. Il programma ALIGN-2 è pubblicamente disponibile tramite Genentech, Inc., South San Francisco, California. Il programma ALIGN-2 dovrebbe essere compilato per essere utilizzato su un sistema operativo UNIX, preferibilmente UNIX V4.0D digitale. Tutti i parametri di confronto delle sequenze sono impostati dal programma ALIGN-2 e non variano.

In situazioni in cui ALIGN-2 è impiegato per i confronti di sequenze amminoacidiche, l'identità % delle sequenze amminoacidiche di una determinata sequenza amminoacidica A verso, con o contro una determinata sequenza amminoacidica B (che può essere alternativamente definita come una data sequenza amminoacidica A che ha o comprende una certa identità % di sequenza amminoacidica verso, con o contro una determinata sequenza amminoacidica B) è calcolata come segue:

$$100 \text{ volte la frazione } X/Y$$

dove X è il numero di residui amminoacidici registrati come appaiamenti identici dal programma di allineamento delle sequenze ALIGN-2 nell'allineamento di A e B di tale programma, e dove Y è il numero totale di residui amminoacidici in B. Si apprezzerà che dove la lunghezza della sequenza amminoacidica A non è uguale alla lunghezza della sequenza amminoacidica B, l'identità % di sequenza amminoacidica di A verso B non sarà uguale alla identità % di sequenza amminoacidica di B verso A.

Se non altrimenti indicato in maniera specifica, tutti i valori di identità % di sequenza amminoacidica usati qui sono ottenuti come descritto nel paragrafo immediatamente precedente usando il programma per computer ALIGN-2.

Una molecola di acido nucleico "isolato" che codifica gli anticorpi qui menzionati è una molecola di acido nucleico che è identificata e separata da almeno una molecola di acido nucleico contaminante con cui è normalmente associata nell'ambiente in cui è stata prodotta. Preferibilmente, l'acido nucleico isolato è privo di associazione con tutti i componenti associati all'ambiente di produzione. Le molecole di acido nucleico isolato che codificano i polipeptidi e gli anticorpi qui menzionati sono in una forma diversa dalla forma o dall'impostazione con cui si trova in natura. Le molecole di acido nucleico isolato perciò si distinguono dall'acido nucleico che codifica i polipeptidi e gli anticorpi qui menzionati presenti in natura nelle cellule.

Il termine "sequenze di controllo" si riferisce a sequenze di DNA necessarie per l'espressione di una sequenza codificante funzionalmente collegata in un determinato organismo ospite. Le sequenze di controllo che sono adatte per i procarioti, per esempio, includono un

promotore, eventualmente una sequenza operatore e un sito di legame ai ribosomi. Le cellule eucariotiche sono note per utilizzare promotori, segnali di poliadenilazione e potenziatori.

L'acido nucleico è "*funzionalmente collegato*" quando viene posto in un rapporto funzionale con un'altra sequenza di acido nucleico. Per esempio, il DNA per una presequenza o una guida secretoria è funzionalmente collegato al DNA per un polipeptide se è espresso come preproteina che partecipa alla secrezione del polipeptide; Un promotore o un potenziatore è funzionalmente collegato ad una sequenza codificante se influenza la trascrizione della sequenza; o un sito di legame ai ribosomi è funzionalmente collegato ad una sequenza codificante se è posizionato in modo da facilitare la traduzione. Generalmente, "funzionalmente collegato" significa che le sequenze di DNA che sono collegate sono contigue, e, nel caso di una guida secretoria, contigue e in fase di lettura. Tuttavia, i potenziatori non devono essere contigui. La connessione viene effettuata mediante ligazione negli opportuni siti di restrizione. Se tali siti non esistono, adattatori o linker oligonucleotidi sintetici vengono utilizzati secondo la pratica convenzionale.

Il termine "*epitopo etichettato*" quando viene utilizzato qui si riferisce ad un polipeptide chimerico che comprende un polipeptide o un anticorpo qui descritto fuso in un "polipeptide etichetta". Il polipeptide etichetta ha sufficienti residui per fornire un epitopo contro il quale può essere fatto un anticorpo, tuttavia è abbastanza breve da non interferire con l'attività del polipeptide a cui è fuso. Il polipeptide etichetta è preferibilmente anche abbastanza unico in modo che l'anticorpo non reagisca sostanzialmente con altri epitopi. Gli appropriati polipeptidi etichetta hanno generalmente almeno sei residui amminoacidici e di solito tra circa 8 e 50 residui amminoacidici (preferibilmente, tra circa 10 e 20 residui amminoacidici).

Come usato qui, il termine "*immunoadesina*" indica molecole simili a anticorpi che combinano la specificità di legame di una proteina eterologa (una "adesione") con le funzioni effettrici di domini costanti di immunoglobulina. Strutturalmente, le immunoadesine comprendono una fusione di una sequenza amminoacidica con la specificità di legame desiderata che è diversa dal sito di riconoscimento e legame dell'antigene di un anticorpo (vale a dire, è "eterologo") e una sequenza di dominio costante di immunoglobulina. La parte di adesina di una molecola di immunoadesina tipicamente è una sequenza amminoacidica contigua che comprende almeno il sito di legame di un recettore o un ligando. La sequenza del dominio costante dell'immunoglobulina nell'immunoadesina può essere ottenuta da qualsiasi immunoglobulina, come i sottotipi IgG-1, IgG-2 (compresi IgG2A e IgG2B), IgG-3 o IgG-4, IgA (inclusi IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Le fusioni Ig includono preferibilmente la sostituzione di un dominio di un polipeptide o di un anticorpo qui descritto al posto di almeno una regione variabile all'interno di una molecola Ig. La fusione di immunoglobulina può comprendere la cerniera, CH2 e CH3 o la cerniera, le regioni CH1, CH2 e CH3 di una molecola IgG1. Per la

produzione di fusioni di immunoglobuline vedere anche il Brevetto U.S. N. 5,428,130 rilasciato il 27 giugno 1995. Per esempio, immunoadesine utili come secondi medicinali utili per la terapia in combinazione qui includono polipeptidi che comprendono le porzioni extracellulari o di legame a PD-1 di PD-L1 o PD-L2, o viceversa, fuse a un dominio costante di una sequenza di immunoglobulina.

Una "*proteina di fusione*" e un "*polipeptide di fusione*" si riferiscono ad un polipeptide avente due porzioni collegate covalentemente insieme, in cui ciascuna delle porzioni è un polipeptide avente una proprietà diversa. La proprietà può essere una proprietà biologica, come attività *in vitro* o *in vivo*. La proprietà può anche essere una semplice proprietà chimica o fisica, come il legame a una molecola bersaglio, la catalizzazione di una reazione, eccetera. Le due porzioni possono essere collegate direttamente da un singolo legame peptidico o tramite un linker peptidico che sarà nella griglia di lettura con l'altro.

Una formulazione "stabile" è quella in cui la proteina in essa mantiene sostanzialmente la sua stabilità fisica e chimica e l'integrità allo stoccaggio. Varie tecniche analitiche per misurare la stabilità proteica sono disponibili nell'arte e sono recensite in Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pub. (1991) e Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La stabilità può essere misurata a una temperatura selezionata per un periodo di tempo selezionato. Per un rapido screening, la formulazione può essere tenuta a 40° C per 2 settimane a 1 mese, al cui tempo viene misurata la stabilità. Se la formulazione deve essere conservata a 2-8° C, in genere la formulazione deve essere stabile a 30° C o 40° C per almeno 1 mese e/o stabile a 2°-8° C per almeno 2 anni. Se la formulazione deve essere conservata a 30°C, generalmente la formulazione deve essere stabile per almeno 2 anni a 30°C e/o stabile a 40°C per almeno 6 mesi. Per esempio, l'ampiezza dell'aggregazione durante lo stoccaggio può essere utilizzata come indicatore della stabilità proteica. Pertanto, una formulazione "stabile" può essere quella in cui meno di circa il 10% e preferibilmente meno di circa il 5% della proteina sono presenti come un aggregato nella formulazione. È possibile determinare qualsiasi aumento nella formazione di aggregato durante lo stoccaggio della formulazione.

Una formulazione "*ricostituita*" è una che è stata preparata sciogliendo una formulazione di proteina o anticorpo liofilizzati in un diluente tale che la proteina sia completamente dispersa. La formulazione ricostituita è adatta per la somministrazione (per esempio somministrazione sottocutanea) ad un paziente da trattare con la proteina di interesse e può essere quella che è adatta per la somministrazione parenterale o endovenosa.

Una formulazione "*isotonica*" è quella che ha sostanzialmente la stessa pressione osmotica del sangue umano. Le formulazioni isotoniche hanno generalmente una pressione osmotica da circa 250 a 350 mOsm. Il termine "ipotonica" descrive una formulazione con una pressione osmotica inferiore a quella del sangue umano. Corrispondentemente, il termine "ipertonico" viene usato per descrivere una formulazione

con una pressione osmotica superiore a quella del sangue umano. L'isotonicità può essere misurata, per esempio, usando un osmometro del tipo a pressione di vapore o a congelamento. Le formulazioni della presente invenzione sono ipertoniche a seguito dell'aggiunta di sale e/o tampone.

"Carrier" come usato qui include carrier, eccipienti, o stabilizzatori farmaceuticamente accettabili che sono non tossici per la cellula o il mammifero che viene esposto a essi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati. Spesso il carrier fisiologicamente accettabile è una soluzione acquosa a pH tamponato. Esempi di carrier fisiologicamente accettabili includono tamponi quali fosfato, citrato e altri acidi organici; antiossidanti incluso acido ascorbico; polipeptide a basso peso molecolare (meno di circa 10 residui); proteine, quali siero albumina, gelatina o immunoglobuline; polimeri idrofili come polivinilpirrolidone; amminoacidi come glicina, glutammina, asparagina, arginina o lisina; monosaccaridi, disaccaridi e altri carboidrati inclusi glucosio, mannosio o destrine; agenti chelanti come EDTA; alcoli di zucchero come il mannitolo o il sorbitolo; controioni che formano sale come sodio; e/o tensioattivi non ionici come TWEEN™, polietilen glicole (PEG) e PLURONICS™.

Un "foglietto illustrativo" si riferisce alle istruzioni abitualmente incluse nelle confezioni commerciali dei medicinali che contengono informazioni riguardo alle indicazioni abitualmente incluse nelle confezioni commerciali dei medicinali che contengono informazioni riguardo alle indicazioni, l'uso, il dosaggio, la somministrazione, le controindicazioni, altri medicinali da combinare con il prodotto confezionato e/o avvertenze riguardanti l'uso di tali medicinali, eccetera.

Un "acido farmaceuticamente accettabile" include acidi inorganici e organici che non sono tossici alla concentrazione e nel modo in cui sono formulati. Per esempio, gli acidi inorganici adatti includono cloridrico, perclorico, bromidrico, iodidrico, nitrico, solforico, solfonico, sulfonico, sulfanilico, fosforico, carbonico, eccetera. Gli acidi organici adatti includono alchili a catena lineare e ramificata, aromatici, ciclici, cicloalifatici, arilalifatici, eterociclici, saturi, insaturi, mono, di- e tri-carbossilici, inclusi per esempio, formico, acetico, 2-idrossiacetico, trifluoroacetico, fenilacetico, trimetilacetico, t-butilacetico, antranilico, propanoico, 2-idrossipropanoico, 2-ossopropanoico, propandioico, ciclopentanopropionico, ciclopentano propionico, 3-fenilpropionico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-idrossibenzoil)benzoico, 2-acetossibenzoico, ascorbico, cinnamico, lauril solforico, stearico, muconico, mandelico, succinico, embonico, fumarico, malico, maleico, idrossimaleico, malonico, lattico, citrico, tartarico, glicolico, gliconico, gluconico, piruvico, gliossalico, ossalico, mesilico, succinico, salicilico, ftalico, palmoico, palmeico, tiocianico, metansolfonico, etanosolfonico, 1,2-etanodisolfonico, 2-idrossietanosolfonico, benzensolfonico, 4-clorobenzenesolfonico, naftalen-2-solfonico, p-toluenesolfonico, camforsolfonico, 4-metilbicyclo[2.2.2]-ott-2-ene-1-carbossilico, glucoeptonico, acido 4,4'-metilenebis-3-(idrossi-2-ene-1-carbossilico), idrossinaftoico.

Le "basi farmaceuticamente accettabili" includono basi inorganiche e organiche che sono non tossiche alla concentrazione e nel modo

in cui vengono formulate. Per esempio, le basi appropriate includono quelle formate da metalli formanti basi inorganiche come litio, sodio, potassio, magnesio, calcio, ammonio, ferro, zinco, rame, manganese, alluminio, N-metilglucammina, morfina, piperidina e le basi non tossiche organiche che includono, ammine primarie, secondarie e terziarie, ammine sostituite, ammine cicliche e resine a scambio ionico basico [per esempio, $N(R')_4^+$ (dove R' è indipendente H o C₁₋₄ alchile, per esempio, ammonio, Tris)], per esempio, isopropilammina, trimetilammina, dietilammina, trietilammina, tripropilammina, etanolammina, 2-dietilamminoetanolo, trimetammina, dicioesilammina, lisina, arginina, istidina, caffeina, procaina, idrabamina, colina, betaina, etilendiammina, glucosammina, metilglucammina, teobromina, purine, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resine poliamminiche e simili. Basi organiche non tossiche particolarmente preferite sono isopropilammina, dietilammina, etanolammina, trimetammina, dicioesilammina, colina e caffeina. Ulteriori acidi e basi farmaceuticamente accettabili utilizzabili con la presente invenzione includono quelli derivanti dagli amminoacidi, per esempio, istidina, glicina, fenilalanina, acido aspartico, acido glutammico, lisina e asparagina.

Tamponi e sali "*farmaceuticamente accettabili*" includono quelli derivati da sali di addizione sia acidi sia basici degli acidi e delle basi indicati sopra. Tamponi e/o sali specifici includono istidina, succinato e acetato.

Uno "*zucchero farmaceuticamente accettabile*" è una molecola che, se combinata con una proteina di interesse, impedisce o riduce in modo significativo l'instabilità chimica e/o fisica della proteina al momento dello stoccaggio. Se la formulazione è destinata per essere liofilizzata e poi ricostituita, gli "zuccheri farmaceuticamente accettabili" possono anche essere noti come "lioprotettori". Gli zuccheri esemplificativi e i loro corrispondenti alcoli zucchero includono: un amminoacido come glutammato monosodico o istidina; una metilammina come betaina; un sale liotropico come solfato di magnesio; un poliolo come gli alcol zucchero tridrici o a peso molecolare superiore, per esempio glicerina, destrina, eritritolo, glicerolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo e mannitolo; glicole propilenico; glicole polietilenico; PLURONICS®; e loro combinazioni. Lioprotettori esemplificativi aggiuntivi includono glicerina e gelatina, e gli zuccheri mellibiosio, melezzitoso, raffiniosio, mannotriosio e stachiosio. Esempi di zuccheri riducenti includono glucosio, maltosio, lattosio, maltulosio, iso-maltulosio e lattulosio. Esempi di zuccheri non riducenti includono i glicosidi non riducenti di composti poliidrossi scelti tra alcol zuccheri e altri polialcooli a catena lineare. Gli alcol zuccheri preferiti sono monoglicosidi, in particolare quei composti ottenuti per riduzione di disaccaridi come lattosio, maltosio, lattulosio e maltulosio. Il gruppo laterale glicosidico può essere o glucosidico o galattosidico. Esempi aggiuntivi di alcol zuccheri sono glucitolo, maltitolo, lattitolo e iso-maltulosio. Gli zuccheri farmaceuticamente accettabili preferiti sono gli zuccheri non riducenti trealosio o saccarosio. Gli zuccheri farmaceuticamente accettabili vengono aggiunti alla formulazione in una "quantità protettiva" (per esempio pre-liofilizzazione), il che significa che la proteina

conserva sostanzialmente la sua stabilità fisica e chimica e l'integrità durante lo stoccaggio (per esempio, dopo la ricostituzione e lo stoccaggio).

Il "*diluyente*" di interesse qui è quello che è farmacologicamente accettabile (sicuro e non tossico per la somministrazione a un essere umano) ed è utile per la preparazione di una formulazione liquida, come una formulazione ricostituita dopo liofilizzazione. Diluenti esemplificativi includono acqua sterile, acqua batteriostatica per iniezione (BWFI), una soluzione a pH tamponato (per esempio, tampone fosfato isotonic), soluzione salina sterile, soluzione di Ringer o soluzione di destrosio. I diluenti possono includere soluzioni acquose di sali e/o tamponi.

Un "*conservante*" è un composto che può essere aggiunto alle formulazioni qui riportate per ridurre l'attività batterica. L'aggiunta di un conservante può, per esempio, facilitare la produzione di una formulazione multiuso (dosaggio multiplo). Esempi di potenziali conservanti includono ottadecildimetilbenzil ammonio cloruro, cloruro di esametonio, cloruro di benalconio (una miscela di cloruri di alchilbenzildimetilammonio in cui i gruppi alchilici sono composti a catena lunga) e cloruro di benzetonio. Altri tipi di conservanti includono alcoli aromatici come fenolo, alcool butilico e benzilico, alchil parabeni come metil o propil parabene, catecolo, resorcinolo, cicloesanololo, 3-pentanololo e m-cresolo. Il conservante maggiormente preferito è qui l'alcool benzilico.

"*Trattamento*" si riferisce a interventi clinici progettati per alterare il corso naturale dell'individuo o della cellula da trattare, e può essere eseguito o per profilassi o durante il decorso di una patologia clinica. Effetti desiderabili del trattamento includono prevenire il verificarsi o la ricorrenza della malattia, prevenire metastasi, diminuire la velocità di progressione della malattia, migliorare o alleviare lo stato morboso, e la remissione o una prognosi migliorata. Gli anticorpi dell'invenzione possono essere usati per ritardare lo sviluppo di una malattia o di un disturbo. Un soggetto viene "trattato" con successo, per esempio, utilizzando gli anticorpi apoptotici anti-PD-L1 dell'invenzione se uno o più sintomi associati a un disturbo disfunzionale dei linfociti T viene mitigato.

Una "*quantità efficace*" si riferisce ad almeno una quantità efficace, a dosaggi e per periodi di tempo necessari, per ottenere l'effetto desiderato o indicato, incluso un risultato terapeutico o profilattico. Per esempio, una quantità efficace degli anticorpi anti-PD-L1 della presente invenzione è almeno la concentrazione minima che determina l'inibizione della segnalazione da PD-L1, o tramite PD-1 sui linfociti T o B7.1 su altre APC o entrambi.

Una "*quantità terapeuticamente efficace*" è almeno la concentrazione minima richiesta per effettuare un miglioramento misurabile o la prevenzione di un particolare disturbo. Una quantità terapeuticamente efficace qui può variare a seconda di fattori quali lo stato morboso, l'età, il sesso e il peso del paziente e la capacità dell'anticorpo di suscitare una risposta desiderata nell'individuo. Una quantità terapeuticamente efficace è anche quella in cui qualsiasi effetto tossico o dannoso dell'anticorpo è sovrastato dagli effetti terapeuticamente benefici. Per esempio, una quantità

terapeuticamente efficace degli anticorpi anti-PD-L1 della presente invenzione è almeno la concentrazione minima che comporta l'inibizione di almeno un sintomo di un *disturbo disfunzionale dei linfociti T*.

Una "*quantità profilatticamente efficace*" si riferisce a una quantità efficace, ai dosaggi e per i periodi di tempo necessari, per ottenere il risultato profilattico desiderato. Per esempio, una quantità profilatticamente efficace degli anticorpi anti-PD-L1 della presente invenzione è almeno la concentrazione minima che previene o attenua lo sviluppo di almeno un sintomo di un *disturbo disfunzionale dei linfociti T*.

Somministrazione "*cronica*" si riferisce alla somministrazione del medicamento in una modalità continua in quanto opposta ad acuta, così da mantenere l'effetto terapeutico iniziale (attività) per un periodo esteso di tempo. La somministrazione "*intermittente*" è il trattamento che non è effettuato consecutivamente senza interruzione, ma piuttosto è ciclico in natura.

"*Mammifero*" per gli scopi del trattamento si riferisce a qualsiasi animale classificato come un mammifero, inclusi gli esseri umani, animali domestici e di allevamento, animali da zoo, da sport o animali da compagnia, quali cani, cavalli, conigli, bovini, suini, criceti, gerbilli, topi, furetti, ratti, gatti, eccetera. Preferibilmente, il mammifero è un essere umano.

Il termine "*formulazione farmaceutica*" si riferisce a una preparazione in forma tale da consentire all'attività biologica dell'ingrediente attivo di essere efficace, e che non contiene componenti aggiuntivi che siano inaccettabilmente tossici per un soggetto a cui la formulazione sarà somministrata. Tali formulazioni sono sterili.

Una formulazione "*sterile*" è asettica o priva di tutti i microrganismi viventi e delle loro spore.

Il termine "*circa*" come usato qui si riferisce al solito campo di variazione dell'errore per il rispettivo valore prontamente noto alla persona esperta in questo campo tecnico.

Un "*disturbo autoimmune*" è una malattia o disturbo derivante da e diretto contro i tessuti o gli organi propri di un individuo, o una co-segregazione o sua manifestazione o una condizione risultante da esso. Le malattie autoimmuni possono essere una malattia specifica dell'organo (vale a dire che la risposta immunitaria è specificatamente diretta contro un sistema di organi come il sistema endocrino, il sistema ematopoietico, la pelle, il sistema cardiopolmonare, i sistemi gastrointestinale ed epatico, il sistema renale, la tiroide, le orecchie, il sistema neuromuscolare, il sistema nervoso centrale, eccetera) o una malattia sistemica che può influenzare sistemi multipli di organi (per esempio, lupus eritematoso sistemico (SLE), artrite reumatoide (RA), polimiosite, eccetera). Tali malattie preferite includono disturbi reumatologici autoimmuni (come, per esempio, RA, sindrome di Sjögren, scleroderma, lupus come SLE e lupus nefriti, polimiositi-dermatomiositi, crioglobulinemia, sindrome dell'anticorpo anti-fosfolipide e artrite psoriasica), disturbi autoimmuni gastrointestinali ed epatici (come, per esempio, malattie infiammatorie intestinali (per esempio

colite ulcerosa e malattia di Crohn), gastrite autoimmune e anemia perniziosa, epatite autoimmune, cirrosi biliare primaria, colangite sclerosante primaria e malattia celiaca), vasculite (come, per esempio, vasculite ANCA-negativa e vasculite associata ad ANCA, inclusa vasculite di Churg-Strauss, granulomatosi di Wegener e la poliangite microscopica), disturbi neurologici autoimmuni (come, per esempio, sclerosi multipla, sindrome opsoclonia-mioclonia, miastenia grave, neuromielite ottica, morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer e polineuropatie autoimmuni), disturbi renali (come, per esempio, glomerulonefrite, sindrome di Goodpasture e malattia di Berger), disturbi dermatologici autoimmuni (come, per esempio psoriasi, orticaria, eruzione cutanea, pemfigus vulgaris, pemfigoide bolloso e lupus eritematoso cutaneo), disturbi ematologici (come, per esempio, porpora trombocitopenica, porpora trombocitopenica trombotica, porpora post-trasfusionale e anemia emolitica autoimmune), aterosclerosi, uveite, malattie dell'udito autoimmuni (come, per esempio, malattia dell'orecchio interno e perdita dell'udito), malattia di Behcet, sindrome di Raynaud, trapianto di organo, e disturbi endocrini autoimmuni (come, per esempio, malattie autoimmuni legate al diabete come diabete mellito insulino-dipendente (IDDM), malattia di Addison e malattia autoimmune della tiroide (per esempio, malattia di Graves e tiroidite)). Le più preferite tra le malattie includono, per esempio, RA, colite ulcerosa, vasculite associata ad ANCA, lupus, sclerosi multipla, sindrome di Sjögren, malattia di Graves, IDDM, anemia perniziosa, tiroidite e glomerulonefrite.

Il termine "*agente citotossico*" come usato qui si riferisce ad una sostanza che inibisce o previene la funzione delle cellule e/o provoca la distruzione delle cellule. Il termine include isotopi radioattivi (per esempio At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isotopi radioattivi di Lu) e tossine come tossine a molecola piccola o tossine enzimaticamente attive di origine batterica, fungina, vegetale o animale, o loro frammenti

Un "*agente chemioterapico*" è un composto chimico utile nel trattamento del cancro. Esempi di agenti chemioterapici includono agenti alchilanti quali tiotepa e ciclofosfamide (CYTOXAN®); alchilsolfonati come busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridine come benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etilenimine e metilamelammine incluse altretamina, trietilenemelamina, trietilenofosforamide, trietilenetiosfosforamide e trimetilomelamina; acetogenine (in particolare bullatacina e bullatacinone); delta-9-tetraidrocannabinolo (dronabinolo, MARINOL®); beta-lapachone; lapachol; colchicine; acido betulinico; una camptotecina (incluso l'analogo sintetico topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, scoplectina e 9-amminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; callistatina; CC-1065 (inclusi i suoi analoghi sintetici adozelesin, carzelesin e bizelesin); podofillotossina; acido podofillinico; teniposide; criptoficine (in particolare criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (inclusi gli analoghi sintetici, KW-2189 e CBI-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inibitore dell'integrina alfa-4 orale; una sarcodictina; spongistatina; mostarde d'azoto come clorambucil, chlomapazina, colofosfamide, estramustina, ifosfamide, mecloretamina, cloridrato di mecloretamina ossido, melphalan,

novembichin, fenesterina, prednimustina, trofosfamide, mostarda di uracile; nitrosuree quali carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibiotici quali gli antibiotici enedina (per esempio calicheamicina, in particolare calicheamicina gammaII e calicheamicina omegaII (vedere, per esempio, Nicolaou et al., Angew Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)), dinemicina, inclusa dinamicina A; esperamicina; come pure cromoforo di neocarcinostatina e cromofori di antibiotico enedina cromoproteina correlati), aclacinomisine, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicine, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-osso-L-norleucina, doxorubicina (inclusi ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, iniezione liposomica di doxorubicina HCl (DOXIL®) e desossidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicine come mitomicina C, acido micofenolico, nogalamicina, olivomicine, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metaboliti come metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), un epotilone e 5-fluorouracile (5-FU); analoghi dell'acido folico come denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; analoghi della purina quali fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; analoghi della pirimidina come ancitabina, azacidina, 6-azauridina, carmofuro, citarabina, didesossiridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (un derivato di 2-fenilamminopirimidina), come pure altri inibitori di c-Kit; anti-adrenalinici come amminoglutetimmide, mitotano, trilostano; rigeneratore dell'acido folico come acido froinico; aceglatone; aldossosfamide glicoside; acido amminolevulinico; eniluracile; amsacrina; bestrabucile; bisantrene; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquone; elfomitina; ellittinio acetato; etoglucide; nitrato di gallio; idrossiurea; lentinan; lonidainina; maytansinoidi quali maytansina e ansamitocine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmolo; nitraerina; pentostatina; phenamet; pirarubicina; losoxantrone; 2-etilidrazone; procarbазina; PSK® complesso polisaccaridico (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rhizoxina; sizofiran; spirogermanio; acido tenuazonico; triaziqone; 2,2',2"-triclorotrietilammina, trichoteceni (in particolare tossina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina), uretano, vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), dacarbazina, mannomustina, mitobronitolo, mitolattolo, pipobromano, gacitosina; arabinoside ("Ara-C"), tiotepa, tassoidi, per esempio, paclitaxel (TAXOL®), formulazione nanoparticellare di paclitaxel ingegnerizzata con albumina (ABRAXANE™) e doxetaxel (TAXOTERE®), cloranbucil, 6-tioguanina, mercaptopurina, metotrexato; analoghi del platino come cisplatino e carboplatino, vinblastina (VELBAN®), platino, etoposide (VP-16), ifosfamida, mitoxantrone, vincristina (ONCOVIN®), oxaliplatino, leucovovina, vinorelbina (NAVELBINE®), novantrone, edatrexato, daunomicina, amminopterina, ibandronato, inibitore della topoisomerasi RFS 2000, difluorometilomitina (DMFO), retinoidi come l'acido retinoico, sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno qualsiasi di quelli sopra, come pure combinazioni di due o più di quelli sopra come CHOP, un'abbreviazione per una terapia

combinata con ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisolone, e FOLFOX, un'abbreviazione per un regime di trattamento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinato con 5-FU e leucovorina. Un agente chemioterapico particolarmente preferito utile in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione, specialmente nel trattamento dell'immunità tumorale è la gemcitabina.

Sono anche inclusi in questa definizione gli agenti anti-ormonali che agiscono per regolare, ridurre, bloccare o inibire gli effetti degli ormoni che possono promuovere la crescita del cancro, e spesso sono in forma di trattamento sistemico, o per tutto il corpo. Possono essere essi stessi ormoni. Gli esempi includono anti-estrogeni e modulatori selettivi del recettore dell'estrogeno (SERM), inclusi, per esempio, tamoxifene (incluso il tamoxifene NOLVADEX®), raloxifene (EVISTA®), droloxifene, 4-idrossitamoxifene, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone e toremifene FARESTON®); anti-progesteroni; sottoregolatori del recettore degli estrogeni (ERD); antagonisti del recettore degli estrogeni come fulvestrant (FASLODEX®); agenti che funzionano per sopprimere o fermare le ovaie, per esempio, agonisti dell'ormone per il rilascio dell'ormone luteinizzante (LHRH) quali leuprolide acetato (LUPRON® e ELIGARD®), goserelin acetato, busarelina acetato e triptorelina; anti-androgeni quali flutamide, nilutamide e bicalutamide; e inibitori di aromatasi che inibiscono l'enzima aromatasi, che regola la produzione di estrogeni nelle ghiandole surrenali, come, per esempio 4(5)-imidazoli, amminoglutetimide, megesterol acetato (MEGASE®), esemestano (AROMASIN®), formestano, fradrozolo, vorozolo (RIVISOR®), letrozolo (FEMARA®) e anastrozolo (ARIMIDEX®). In aggiunta, tale definizione di agenti chemioterapici include bisfosfonati come clodronato (per esempio, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, acido zoledronico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); come pure troxacitabina (un analogo della citosina 1,3-diossolano nucleoside); oligonucleotidi anti-senso, in particolare quelli che inibiscono l'espressione di geni nei percorsi di segnalazione implicati nella proliferazione cellulare aberrante, quali, per esempio PKC-alfa, Raf, H-Ras e recettori del fattore di crescita epidermico (EGF-R); vaccini come il vaccino THERATOPE® e vaccini per la terapia genica, per esempio, il vaccino ALLOVECTIN®, il vaccino LEUVECTIN® e il vaccino VAXID®; inibitore della topoisomerasi 1 (per esempio LURTOTECAN®); un antiestrogeno come fulvestrant; un inibitore Kit come imatinib o EXEL-0862 (un inibitore della tirosina chinasi); inibitore di EGFR come erlotinib o cetuximab; un inibitore anti-VEGF come bevacizumab; arinotecano; RmRH (per esempio, ABARELIX®); lapatinib e lapatinib ditosilato (un inibitore a molecola piccola della tirosina chinasi duplice di ErbB-2 e EGFR noto anche come GW572016); 17AAG (derivato di geldanamicina che è un veleno 90 di proteina da shock termico (Hsp) e sali, acidi o derivati farmaceuticamente accettabili di uno qualsiasi di quelli sopra riportati.

Un "agente inibitorio della crescita" si riferisce ad un composto o composizione che inibisce la crescita di una cellula, la cui crescita dipende dall'attivazione del recettore o *in vitro* o *in vivo*. Così, l'agente inibitorio della crescita ne include uno che riduce significativamente la

percentuale di cellule dipendenti dal recettore in fase S. Esempi di agenti inibitori della crescita includono agenti che bloccano la progressione del ciclo cellulare (in un punto diverso dalla fase S), come agenti che inducono l'arresto in G1 e l'arresto nella fase M. I classici bloccanti della fase M includono i vinca e gli alcaloidi della vinca (vincristina e vinblastina), i tassani, e gli inibitori della topoisomerasi II come doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposide e bleomicina. Quegli agenti che arrestano G1 debordano anche nell'arresto della fase S, per esempio, agenti alchilanti il DNA come tamoxifene, prednisone, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracile e ara-C. Ulteriori informazioni sono disponibili in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, a cura di, Capitolo 1, dal titolo "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" di Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), in particolare p. 13. I tassani (paclitaxel e docetaxel) sono farmaci antitumorali, entrambi derivati dall'albero del tasso. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivato dal tasso europeo, è un analogo semisintetico del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).

Il termine "*citochina*" è un termine generico per le proteine rilasciate da una popolazione cellulare che agisce su un'altra cellula come mediatori intercellulari. Esempi di tali citochine sono linfocine, monochine; interleuchine (IL) come IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL- IL-12, IL-13, IL-15 ... IL-35, incluso PROLEUKIN® rIL-2; un fattore di necrosi tumorale come TNF- α o TNF- β ; e altri fattori polipeptidici inclusi LIF e il ligando kit (KL), mentre il termine "interleuchina" è ormai essenzialmente diventato sinonimo di citochina. Come usato qui, il termine citochina include proteine provenienti da fonti naturali o da colture cellulari ricombinanti ed equivalenti biologicamente attivi delle citochine a sequenza nativa, incluse entità a molecola piccola prodotte sinteticamente e loro derivati e sali farmaceuticamente accettabili. Le citochine possono essere classificate in base alla posizione prossimale del bersaglio destinato, in cui *autocrina* si riferisce all'azione sulla stessa cellula da cui viene secreta, *paracrina* si riferisce a un'azione limitata alle immediate vicinanze al punto in cui la citochina viene secreta, ed *endocrina* si riferisce all'azione in regioni distanti del corpo. Le citochine immunitarie possono anche essere classificate in base al fatto che potenzino una risposta di tipo I (per esempio, IFN- γ , TGF- β , eccetera), che favoriscano l'immunità cellulare o una risposta di tipo II (IL-4, IL-10, IL-13, eccetera), che favoriscano l'immunità anticorpale o umorale. Le citochine immunitarie hanno ruoli nella costimolazione, maturazione, proliferazione, attivazione, infiammazione, crescita, differenziazione, produzione e secrezione di citochine, sopravvivenza di varie cellule immunitarie.

Il termine "*ormone*" si riferisce a ormoni polipeptidici, che sono generalmente secreti da organi ghiandolari con condotti. Tra gli ormoni sono inclusi, per esempio, ormone della crescita come l'ormone della crescita umano, l'ormone della crescita umano N-metionilico e l'ormone della crescita bovina; ormone paratiroideo; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; estradiolo; terapia ormonale sostitutiva; androgeni

come calusterone, dromostanolone propionato, epitiostanolo, mepitiostanolo o testolattone; prorelaxina; ormoni glicoproteici come l'ormone follicolo-stimolante (FSH), l'ormone stimolante della tiroide (TSH) e l'ormone luteinizzante (LH); prolattina, lattogeno placentare, peptide associato alla gonadotropina di topo, ormone che rilascia la gonadotropina; inibina; activina; sostanza inibitrice mulleriana; e trombopoietina. Come usato qui, il termine ormone include proteine provenienti da fonti naturali o da colture cellulari ricombinanti ed equivalenti biologicamente attivi dell'ormone con sequenza nativa, incluse le entità a molecola piccola prodotte sinteticamente e loro derivati e sali farmaceuticamente accettabili.

III. Modalità per realizzare l'invenzione

A. Umanizzazione usando l'esposizione su fago

Le varianti con regione ipervariabile innestata qui descritte sono state generate mediante mutagenesi di Kunkel di acido nucleico codificante le sequenze accettori umane, utilizzando un oligonucleotide separato per ogni regione ipervariabile. Kunkel et al., *Methods Enzymol.* **154**: 367-382 (1987). Appropriati cambiamenti possono essere introdotti all'interno della regione comice e/o ipervariabile utilizzando tecniche di routine, per correggere e ristabilire adeguate interazioni regione ipervariabile-antigene.

L'esposizione su fago(fagemide) (qui riportata anche come esposizione su fago) può essere utilizzata come metodo conveniente e veloce per generare e sottoporre a screening molti differenti anticorpi varianti potenziali in una libreria generata dalla randomizzazione della sequenza. Tuttavia, altri procedimenti per la fabbricazione e lo screening di anticorpi alterati sono a disposizione della persona esperta.

L'esposizione su fago(fagemide) (qui riportata anche come esposizione su fago in alcuni contesti) può essere utilizzata come metodo conveniente e veloce per generare e sottoporre a screening molti differenti anticorpi varianti potenziali in una libreria generata dalla randomizzazione della sequenza. Tuttavia, altri procedimenti per la fabbricazione e lo screening di anticorpi alterati sono a disposizione della persona esperta.

La tecnologia di esposizione su fago(fagemide) ha fornito un potente strumento per generare e selezionare nuove proteine che si legano a un ligando, come un antigene. Usare le tecniche di esposizione su fago(fagemide) permette la generazione di grandi librerie di varianti di proteine che possono essere rapidamente ordinate per quelle sequenze che si legano a una molecola bersaglio con alta affinità. Gli acidi nucleici che codificano polipeptidi varianti sono generalmente fusi ad una sequenza di acido nucleico che codifica una proteina dell'involucro virale, come la proteina del gene III o la proteina del gene VIII. Sono stati sviluppati sistemi di esposizione su fagemide monovalenti in cui la sequenza di acido nucleico che codifica la proteina o il polipeptide è fusa a una sequenza di acido nucleico che codifica una porzione della proteina del gene III. (Bass, S., *Proteins*, **8**: 309 (1990); Lowman e Wells, *Methods: Companion to Methods in Enzymology*, **3**: 205 (1991)). In un sistema di esposizione

su fagemide monovalente, la fusione genica viene espressa a bassi livelli e le proteine del gene III wild-type vengono anche espresse in modo tale che l'infettività delle particelle sia mantenuta. I procedimenti per generare librerie peptidiche e per sottoporre a screening tali librerie sono stati descritti in molti brevetti (per esempio Brevetto U.S. N. 5,723,286, Brevetto U.S. N. 5,432,018, Brevetto U.S. N. 5,580,717, Brevetto U.S. N. 5,427,908 e Brevetto U.S. N. 5,498,530).

Librerie di anticorpi o di polipeptidi leganti l'antigene sono state preparate in numerose maniere incluso alterando un singolo gene inserendo sequenze di DNA random o clonando una famiglia di geni correlati. I procedimenti per esporre anticorpi o frammenti leganti l'antigene usando l'esposizione su fago(fagemide) sono stati descritti nei Brevetti U.S. N. 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242, 5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, e 5,658,727. La libreria è quindi sottoposta a screening per l'espressione degli anticorpi o delle proteine leganti l'antigene con le caratteristiche desiderate.

I procedimenti per sostituire un amminoacido di elezione in un modello di acido nucleico sono ben consolidati nella tecnica, alcuni dei quali sono descritti qui. Per esempio, residui delle regioni ipervariabili possono essere sostituiti usando il procedimento di Kunkel. Vedere, per esempio, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987).

La sequenza degli oligonucleotidi include uno o più dei gruppi di codoni progettati per i residui delle regioni ipervariabili da alterare. Un gruppo di codoni è un gruppo di differenti sequenze di triplette nucleotidiche usate per codificare gli amminoacidi varianti desiderati. I gruppi di codoni possono essere rappresentati usando simboli per indicare particolari nucleotidi o miscele equimolari di nucleotidi come mostrato sotto secondo il codice IUB.

CODICI IUB

G (Guanina)	Y (C o T)	H (A o C o T)
A (Adenina)	M (A o C)	B (C o G o T)
T (Timina)	K (G o T)	V (A o C o G)
C (Citosina)	S (C o G)	D (A o G o T)
R (A o G)	W (A o T)	N (A o C o G o T)
Per esempio, nel gruppo di codoni DVK, D può essere il nucleotide A o G o T; V può essere A o G o C; e K può essere G o T. Questo gruppo di codoni può presentare 18 codoni differenti e può codificare gli amminoacidi Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly e Cys.		

I gruppi di oligonucleotidi o inneschi possono essere sintetizzati usando procedimenti standard. Un gruppo di oligonucleotidi può essere sintetizzato, per esempio, mediante la sintesi su fase solida, contenente sequenze che rappresentano tutte le possibili combinazioni di triplette

nucleotidiche fornite dal gruppo di codoni e che codificheranno il gruppo desiderato di amminoacidi. La sintesi di oligonucleotidi con la "degenerazione" di nucleotidi selezionati in determinate posizioni è ben nota in quella tecnica. Tali gruppi di nucleotidi aventi certi gruppi di codoni possono essere sintetizzati utilizzando sintetizzatori commerciali di acido nucleico (disponibili, per esempio, da Applied Biosystems, Foster City, CA), o possono essere ottenuti in commercio (per esempio, da Life Technologies, Rockville, MD). Pertanto, un gruppo di oligonucleotidi sintetizzati aventi un particolare gruppo di codoni includerà tipicamente una pluralità di oligonucleotidi con sequenze differenti, le differenze stabilite dal gruppo di codoni nella sequenza complessiva. Gli oligonucleotidi, come usati secondo l'invenzione, hanno sequenze che permettono l'ibridazione a un template di acido nucleico di dominio variabile e possono anche includere siti di restrizione enzimatica per scopi di clonazione.

In un procedimento, le sequenze di acido nucleico codificanti amminoacidi varianti possono essere create mediante mutagenesi mediata da oligonucleotidi. Questa tecnica è ben nota nell'arte come descritto da Zoller et al. *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). In breve, sequenze di acido nucleico codificanti amminoacidi varianti sono create ibridando un gruppo di oligonucleotidi codificanti i gruppi di codoni desiderati a un template di DNA, dove il template è la forma a filamento singolo del plasmide contenente una sequenza stampo di acido nucleico di regione variabile. Dopo l'ibridazione, viene usata una DNA polimerasi per sintetizzare un intero secondo filamento complementare del template che pertanto incorporerà l'innesco oligonucleotidico, e conterrà i gruppi di codoni come fornito dal gruppo di oligonucleotidi.

In generale, vengono utilizzati oligonucleotidi di almeno 25 nucleotidi di lunghezza. Un oligonucleotide ottimale avrà 12 a 15 nucleotidi che sono completamente complementari al template su entrambi i lati del(i) nucleotide(i) che codifica(n) per la(e) mutazione(i). Ciò assicura che l'oligonucleotide si ibriderà correttamente alla molecola template di DNA a filamento singolo. Gli oligonucleotidi sono prontamente sintetizzati usando tecniche note nell'arte come quella descritta da Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75: 5765 (1978).

Il template di DNA è generato da quei vettori che sono o derivati dai vettori del batteriofago M13 (sono adatti i vettori M13mp18 e M13mp19 commercialmente disponibili), o quei vettori che contengono un'origine della replicazione di fago a filamento singolo come descritto da Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Pertanto, il DNA che è da mutare può essere inserito in uno di questi vettori per generare un template a filamento singolo. La produzione del template a filamento singolo è descritta nelle sezioni 4.21-4.41 of Sambrook *et al.*, sopra riportato.

Per alterare la sequenza di DNA nativo, l'oligonucleotide è ibridato al template a filamento singolo in opportune condizioni di ibridazione. Un enzima polimerizzante il DNA, solitamente T7 DNA polimerasi o il frammento di Klenow della DNA polimerasi I, viene quindi aggiunto per sintetizzare il filamento complementare del template usando l'oligonucleotide come innesco per la sintesi. Una molecola a doppio eterofilamento viene pertanto formata in modo che un filamento di DNA codifica la forma mutata del gene 1, e l'altro filamento (il template

originale) codifica la sequenza nativa, inalterata del gene 1. Questa molecola a doppio eterofilamento viene quindi trasformata in un'opportuna cellula ospite, solitamente un procariote come *E. coli* JM101. Dopo aver fatto crescere le cellule, esse sono piastrate su piastre di agarosio e sottoposte a screening usando l'innesco oligonucleotidico radioetichettato con un ³²-Fosfato per identificare le colonie batteriche che contengono il DNA mutato.

Il procedimento descritto immediatamente sopra può essere modificato in modo tale da creare una molecola a doppio omofilamento in cui entrambi i filamenti del plasmide contengono la(e) mutazione(i). Le modificazioni sono come segue: L'oligonucleotide a filamento singolo viene riassociato al template a filamento singolo come descritto sopra. Una miscela di tre desossiribonucleotidi, desossiriboadenosina (dATP), desossiriboguanosina (dGTP), e desossiribotimidina (dTTP), viene combinata con una tiodesossiribocitosina modificata chiamata dCTP-(aS) (che può essere ottenuta da Amersham). Questa miscela è aggiunta al complesso template-oligonucleotide. Al momento dell'aggiunta di DNA polimerasi a questa miscela, viene generato un filamento di DNA identico al template eccetto per le basi mutate. In aggiunta, questo nuovo filamento di DNA conterrà dCTP-(aS) al posto di dCTP, che serve a proteggerlo dalla digestione delle endonucleasi di restrizione. Dopo che il filamento template del doppio eterofilamento viene intaccato con un appropriato enzima di restrizione, il filamento template può essere digerito con ExoIII nucleasi o un'altra nucleasi appropriata per tagliare in un punto diverso dalla regione che contiene il(i) sito(i) da mutagenizzare. La reazione viene quindi arrestata per lasciare una molecola che è solo parzialmente a filamento singolo. Un DNA a doppio omofilamento completo viene quindi formato usando DNA polimerasi in presenza di tutti e quattro i desossiribonucleotidi trifosfati, ATP e DNA ligasi. Questa molecola a doppio omofilamento può quindi essere trasformata in un'opportuna cellula ospite.

Come indicato in precedenza, la sequenza del gruppo di oligonucleotidi è di lunghezza sufficiente per ibridarsi all'acido nucleico template e può anche, ma non necessariamente, contenere siti di restrizione. Il template di DNA può essere generato da quei vettori che sono o derivati dai vettori del batteriofago M13 o vettori che contengono un'origine della replicazione di fago a filamento singolo come descritto da Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Pertanto, il DNA che è da mutare deve essere inserito in uno di questi vettori per generare un template a filamento singolo. La produzione del template a filamento singolo è descritta nelle sezioni 4.21-4.41 of Sambrook *et al.*, *supra*.

Secondo un altro procedimento, una libreria può essere generata fornendo gruppi di oligonucleotidi a monte e a valle, ogni gruppo avente una pluralità di oligonucleotidi con sequenze differenti, le differenti sequenze stabilite dai gruppi di codoni forniti all'interno della sequenza degli oligonucleotidi. I gruppi di oligonucleotidi a monte e a valle, insieme a una sequenza di acido nucleico template di dominio variabile, possono essere utilizzati in una reazione a catena della polimerasi per generare una "libreria" di prodotti PCR. I prodotti PCR possono essere riportati come

"cassette di acido nucleico", in quanto possono essere fusi con altre sequenze di acido nucleico correlate o non correlate, per esempio, proteine dell'involucro virale e domini di dimerizzazione, utilizzando tecniche di biologia molecolare consolidate.

La sequenza degli inneschi per PCR include uno o più dei gruppi di codoni progettati per le posizioni accessibili al solvente e molto differenti in una regione ipervariabile. Come descritto sopra, un gruppo di codoni è un gruppo di differenti sequenze di triplette nucleotidiche utilizzate per codificare gli amminoacidi varianti desiderati. I selettori di anticorpi che soddisfano i criteri desiderati, selezionati tramite appropriati passaggi di screening/selezione possono essere isolati e clonati utilizzando tecniche ricombinanti standard.

B. Preparazione ricombinante

Nella presente sono anche descritti un acido nucleico isolato codificante anticorpi anti-PD-L1, vettori e cellule ospite comprendenti tale acido nucleico, e tecniche ricombinanti per la produzione dell'anticorpo.

Per la produzione ricombinante dell'anticorpo, l'acido nucleico che lo codifica viene isolato e inserito in un vettore replicabile per l'ulteriore clonazione (amplificazione del DNA) o per l'espressione. Il DNA codificante l'anticorpo monoclonale viene prontamente isolato e sequenziato usando procedure convenzionali (per esempio, usando sonde oligonucleotidiche che sono in grado di legarsi in modo specifico ai geni che codificano le catene pesanti e leggere dell'anticorpo). Molti vettori sono disponibili. La scelta del vettore dipende in parte dalla cellula ospite da usare. In generale, le cellule ospite preferite sono di origine o procariotica o eucariotica (generalmente di mammifero).

1. Produzione di anticorpi in cellule procariotiche

a) *Costruzione del vettore*

Le sequenze polinucleotidiche codificanti le componenti polipeptidiche degli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere ottenute usando tecniche ricombinanti standard. Le sequenze polinucleotidiche desiderate possono essere isolate e sequenziate da cellule che producono anticorpi come cellule di ibridoma. Alternativamente, i polinucleotidi possono essere sintetizzati usando un sintetizzatore di nucleotidi o tecniche PCR. Una volta ottenute, le sequenze codificanti i polipeptidi sono inserite in un vettore ricombinante in grado di replicare ed esprimere polinucleotidi eterologhi in ospiti procariotici. Molti vettori che sono disponibili e noti nella tecnica possono essere usati per gli scopi della presente invenzione. La selezione di un vettore appropriato dipenderà principalmente dalla dimensione degli acidi nucleici da inserire nel vettore e dalla particolare cellula ospite da trasformare con il vettore. Ogni vettore contiene vari componenti, a seconda della sua funzione (amplificazione o espressione di un polinucleotide eterologo, o entrambe) e della sua compatibilità con la particolare cellula ospite in cui risiede. I componenti del vettore includono generalmente, ma non sono limitati a: un'origine della replicazione, un gene marcatore per la selezione, un promotore, un sito di

legame al ribosoma (RBS), una sequenza segnale, l'inserto di acido nucleico eterologo e una sequenza di terminazione della trascrizione.

In generale, i vettori plasmidici contenenti repliconi e sequenze di controllo che sono derivate da specie compatibili con la cellula ospite sono usati in combinazione con questi ospiti. Il vettore normalmente porta un sito per la replicazione, come pure sequenze marcanti che sono in grado di fornire una selezione fenotipica nelle cellule trasformate. Per esempio, *E. coli* è solitamente trasformato usando pBR322, un plasmide derivato da una specie di *E. coli*. pBR322 contiene geni che codificano la resistenza all'ampicillina (Amp) e alla tetraciclina (Tet) e pertanto forniscono facili mezzi per identificare le cellule trasformate. pBR322, i suoi derivati, o altri plasmidi microbici o batteriofagi possono anche contenere, o essere modificati per contenere, promotori che possono essere usati dall'organismo microbico per l'espressione di proteine endogene. Esempi di derivati di pBR322 usati per l'espressione di particolari anticorpi sono descritti in dettaglio in Carter et al., Brevetto U.S. N. 5,648,237.

In aggiunta, i vettori fagici contenenti repliconi e sequenze di controllo che sono compatibili con il microrganismo ospite possono essere usati come vettori trasformanti in combinazione con questi ospiti. Per esempio, un batteriofago come GEM.TM.-11 può essere utilizzato per realizzare un vettore ricombinante che può essere usato per trasformare cellule ospite suscettibili come *E. coli* LE329.

Il vettore di espressione può comprendere due o più coppie promotore-cistrone codificanti ognuno dei componenti polipeptidici. Un promotore è una sequenza regolatrice non tradotta localizzata a monte (5') di un cistrone che modula la sua espressione. I promotori procariotici tipicamente ricadono in due classi, inducibile e costitutivo. Il promotore inducibile è un promotore che inizia livelli aumentati di trascrizione del cistrone sotto il suo controllo in risposta a cambiamenti nelle condizioni di coltura, per esempio la presenza o l'assenza di un nutriente o un cambiamento nella temperatura.

Un gran numero di promotori riconosciuti da una varietà di cellule ospite potenziali è ben noto. Il promotore selezionato può essere funzionalmente collegato a un DNA cistronico codificante la catena leggera o pesante rimuovendo il promotore dal DNA di origine tramite digestione con enzimi di restrizione e inserendo la sequenza del promotore isolata nel vettore. Sia la sequenza nativa del promotore sia molti promotori eterologhi possono essere usati per l'amplificazione e/o l'espressione diretta dei geni bersaglio. Possono essere utilizzati promotori eterologhi, poiché essi generalmente permettono una maggiore trascrizione e rese più elevate del gene bersaglio espresso in confronto al promotore del polipeptide bersaglio nativo.

I promotori adatti per l'uso con ospiti procariotici includono il promotore PhoA, i sistemi dei promotori di galattamasi e lattosio, un sistema promotore del triptofano (*trp*) e promotori ibridi come il promotore *tac* o *trc*. Tuttavia, altri promotori che sono funzionali nei batteri (come altri promotori batterici o fagici noti) sono pure adatti. Le loro sequenze nucleotidiche sono state pubblicate, permettendo in tal modo all'operatore

esperto di ligarli funzionalmente ai cistroni codificanti le catene leggere e pesanti bersaglio (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) usando linker o adattatori per fornire qualsiasi sito di restrizione richiesto.

Ogni cistrone nel vettore ricombinante può comprendere un componente di sequenza segnale di secrezione che dirige la traslocazione dei polipeptidi espressi attraverso la membrana. In generale, la sequenza segnale può essere un componente del vettore, o può essere una parte del DNA del polipeptide bersaglio che è inserito nel vettore. La sequenza segnale selezionata per lo scopo di questa invenzione dovrebbe essere quella che è riconosciuta ed elaborata (vale a dire clivata da una peptidasi segnale) dalla cellula ospite. Per le cellule ospite procariotiche che non riconoscono né elaborano le sequenze segnale native dei polipeptidi eterologhi, la sequenza segnale è sostituita da una sequenza segnale procariotica scelta, per esempio, dal gruppo che consiste di fosfatasi alcalina, penicillinasi, Ipp, o guide dell'enterotossina stabile al calore II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA e MBP. Le sequenze segnale usate in entrambi i cistroni del sistema di espressione possono essere sequenze segnale STII o loro varianti.

La produzione degli anticorpi anti-PD-L1 secondo l'invenzione può avvenire nel citoplasma della cellula ospite, e quindi non richiede la presenza di sequenze segnale di secrezione in ogni cistrone. A questo riguardo, le catene leggere e pesanti di immunoglobuline vengono espresse, ripiegate e assemblate per formare immunoglobuline funzionali all'interno del citoplasma. Alcuni ceppi ospiti (per esempio i ceppi di *E. coli trxB*) forniscono condizioni citoplasmatiche che sono favorevoli alla formazione di legame disolfuro, consentendo così una corretta ripiegatura e assemblaggio delle sottounità proteiche espresse. Proba e Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

Nella presente viene anche descritto un sistema di espressione in cui il rapporto quantitativo dei componenti polipeptidici espressi può essere modulato in modo da massimizzare la resa di anticorpi secreti e correttamente assemblati dell'invenzione. Tale modulazione viene realizzata almeno in parte modulando simultaneamente le forze di traduzione per i componenti del polipeptide.

Una tecnica per modulare la forza di traduzione è descritta in Simmons et al., Brevetto U.S. N. 5,840,523. Essa utilizza varianti della regione di inizio della traduzione (TIR) all'interno di un cistrone. Per una data TIR, una serie di varianti di sequenza di amminoacidi o di acidi nucleici può essere creata con una gamma di forze di traduzione, fornendo così un mezzo conveniente per regolare questo fattore per il livello di espressione desiderata della catena specifica. Le varianti TIR possono essere generate mediante tecniche di mutagenesi convenzionali che portano a cambi di codoni che possono alterare la sequenza di amminoacidi, anche se si preferiscono cambiamenti silenziosi nella sequenza nucleotidica. Le alterazioni nella TIR possono includere, per esempio, alterazioni nel numero o nella spaziatura delle sequenze Shine-Dalgarno, insieme ad alterazioni della sequenza segnale. Un procedimento per generare sequenze segnale mutanti è la generazione di una "banca di codoni" all'inizio di

una sequenza codificante che non cambia la sequenza amminoacidica della sequenza segnale (vale a dire che i cambiamenti sono silenziosi). Ciò può essere ottenuto cambiando la terza posizione nucleotidica di ciascun codone; in aggiunta, alcuni amminoacidi, come la leucina, la serina e l'arginina, hanno molteplici prime e seconde posizioni che possono aggiungere complessità nel fare la banca. Questo procedimento di mutagenesi è descritto in dettaglio in Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

Preferibilmente, viene generato un gruppo di vettori con un campo di variazione di forze di TIR per ogni cistrone in esso. Questo gruppo limitato fornisce un confronto dei livelli di espressione di ogni catena come pure la resa dell'anticorpo desiderato prodotto nelle varie combinazioni di forza di TIR. Le forze di TIR possono essere determinate quantificando il livello di espressione di un gene reporter come descritto in dettaglio in Simmons et al. Brevetto U.S. N. 5,840,523. Sulla base del confronto delle forze di traduzione, le TIR individuali desiderate sono scelte per essere combinate nei costrutti dei vettori di espressione dell'invenzione.

b) *Cellule ospite procariotiche*

Le cellule ospite procariotiche adatte per esprimere gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione includono Archaeobacteria ed Eubacteria, come organismi Gram-negativi o Gram-positivi. Esempi di batteri utili includono Escherichia (per esempio, *E. coli*), Bacilli (per esempio, *B. subtilis*), Enterobacteria, *Pseudomonas* spp. (per esempio, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. Possono essere usate cellule gram-negative. Cellule di *E. coli* possono essere usate come ospiti per l'invenzione. Esempi di ceppi di *E. coli* includono il ceppo W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pagg. 1190-1219; N. di Deposito ATCC 27,325) e suoi derivati, incluso il ceppo 33D3 avente genotipo W3110 *γfhuA (γtonA) ptr3 lac Iq lacL8 γompTγ(nmpc-fepE) degP41 kan^R* (Brevetto U.S. N. 5,639,635). Altri ceppi e loro derivati, come *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) ed *E. coli* RV308(ATCC 31,608) sono anche adatti. Questi esempi sono illustrativi piuttosto che limitanti. Procedimenti per costruire derivati di ciascuno dei batteri sopra menzionati aventi genotipi definiti sono noti nella tecnica e descritti in, per esempio, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). È generalmente necessario selezionare i batteri appropriati prendendo in considerazione la replicabilità del replicone nelle cellule di un batterio. Per esempio, le specie *E. coli*, *Serratia*, or *Salmonella* possono essere opportunamente usate come ospite quando plasmidi ben noti come pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 sono usati per fornire il replicone.

Tipicamente la cellula ospite dovrebbe secernere quantità minime di enzimi proteolitici, e inibitori di proteasi aggiuntivi potrebbero essere desiderabilmente incorporati nella coltura cellulare.

c) *Produzione di anticorpi*

Le cellule ospite sono trasformate con i vettori di espressione descritti sopra e coltivate in terreni nutrienti convenzionali modificati quanto appropriato per indurre i promotori, selezionare i trasformanti, o amplificare i geni codificanti le sequenze desiderate. Trasformazione significa introdurre DNA nell'ospite procariote così che il DNA sia replicabile, o come elemento extracromosomiale o mediante integrazione cromosomiale. A seconda della cellula ospite usata, la trasformazione è effettuata usando tecniche standard appropriate per tali cellule. Il trattamento con calcio che impiega cloruro di calcio è generalmente usato per le cellule batteriche che contengono sostanziali barriere cellulari. Un altro procedimento per la trasformazione impiega glicole polietilenico/DMSO. Ancora un'altra tecnica usata è l'elettroporazione.

Le cellule procariote usate per produrre gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione sono cresciute in terreni noti nella tecnica e adatti per la coltura delle cellule ospite selezionate. Esempi di terreni adatti includono il brodo di Luria (LB) più i necessari integratori nutrienti. Il terreno può anche contenere un agente di selezione, scelto in base alla costruzione del vettore di espressione, per permettere in maniera selettiva la crescita delle cellule procariote contenenti il vettore di espressione. Per esempio, ampicillina è aggiunta al terreno per la crescita di cellule che esprimono il gene della resistenza all'ampicillina.

Qualsiasi integratore necessario oltre alle fonti di carbonio, azoto, e fosfato inorganico può anche essere incluso in concentrazioni appropriate introdotto da solo o come miscela con un altro integratore o terreno come una fonte di azoto complessa. Facoltativamente il terreno di coltura può contenere uno o più agenti riducenti scelti dal gruppo che consiste di glutazione, cisteina, cistamina, tioglicolato, ditioeritritolo e ditiotreitolo.

Le cellule ospite procariote sono coltivate a temperature opportune. Per la crescita di *E. coli*, per esempio, la temperatura preferita spazia da circa 20°C a circa 39°C, più preferibilmente da circa 25°C a circa 37°C, ancora più preferibilmente a circa 30°C. il pH del terreno può essere qualsiasi pH che spazia da circa 5 a circa 9, a seconda principalmente dell'organismo ospite. Per *E. coli*, il pH è preferibilmente da circa 6,8 a circa 7,4, e più preferibilmente circa 7,0.

Se un promotore inducibile viene usato nel vettore di espressione dell'invenzione, l'espressione della proteina è indotta in condizioni adatte all'attivazione del promotore. In un aspetto dell'invenzione, i promotori PhoA sono usati per controllare la trascrizione dei polipeptidi. Di conseguenza, le cellule ospite trasformate sono coltivate in un terreno limitante il fosfato per induzione. Preferibilmente, il terreno limitante il fosfato è il terreno C.R.A.P. (vedere, per esempio, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Una varietà di altri induttori può essere usata, secondo il costruito del vettore impiegato, come è noto nella tecnica.

Le proteine anticorpali espresse possono essere secrete nel e recuperate dal periplasma delle cellule ospite. Il recupero delle proteine

implica tipicamente la rottura del microrganismo, generalmente mediante mezzi quali shock osmotico, sonicazione o lisi. Una volta che le cellule sono rotte, i detriti cellulari o le cellule intere possono essere rimossi mediante centrifugazione o filtrazione. Le proteine possono essere ulteriormente purificate, per esempio, mediante cromatografia su resina per affinità. Alternativamente, le proteine possono essere trasportate nel terreno di coltura e isolate lì. Le cellule possono essere rimosse dalla coltura e il surnatante della coltura venir filtrato e concentrato per ulteriore purificazione delle proteine prodotte. I polipeptidi espressi possono essere ulteriormente isolati e identificati usando procedimenti comunemente noti come elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) e saggio Western blot.

Alternativamente, la produzione di anticorpo è condotta in grande quantità mediante un processo di fermentazione. Varie procedure di fermentazione in fed-batch su larga scala sono disponibili per la produzione di proteine ricombinanti. Le fermentazioni su larga scala hanno almeno 1000 litri di capacità, preferibilmente circa 1000 a 100.000 litri di capacità. Questi fermentatori usano rotori agitatori per distribuire ossigeno e nutrienti, soprattutto glucosio (la fonte preferita di carbonio/energia). La fermentazione su piccola scala si riferisce generalmente alla fermentazione in un fermentatore che non è più di approssimativamente 100 litri in capacità volumetrica, e può spaziare da circa 1 litro a circa 100 litri.

Durante il processo di fermentazione, l'induzione dell'espressione della proteina viene tipicamente iniziata dopo che le cellule sono state fatte crescere in condizioni opportune a una densità desiderata, per esempio, una DO_{550} di circa 180-220, nel quale stadio le cellule sono nella fase stazionaria precoce. Una varietà di induttori può essere usata, a seconda del costrutto del vettore impiegato, come è noto nella tecnica e descritto sopra. Le cellule possono essere fatte crescere per periodi più brevi prima dell'induzione. Le cellule sono solitamente indotte per circa 12-50 ore, sebbene si possano usare tempi di induzione più lunghi o più brevi.

Per migliorare la resa della produzione e la qualità degli anticorpi dell'invenzione, varie condizioni di fermentazione possono essere modificate. Per esempio, per migliorare l'assemblaggio appropriato e il ripiegamento dei polipeptidi anticorpali secreti, vettori aggiuntivi sovraesprimenti proteine chaperone, come proteine Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD e/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasi con attività di chaperone) possono essere usati per co-trasformare le cellule procariotiche ospite. Le proteine chaperone è stato dimostrato che facilitano l'appropriato ripiegamento e la solubilità di proteine eterologhe prodotte in cellule ospite batteriche. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou et al., Brevetto U.S. N. 6,083,715; Georgiou et al., Brevetto U.S. N. 6,027,888; Bothmann e Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm e Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Per minimizzare la proteolisi delle proteine eterologhe espresse (soprattutto quelle che sono proteoliticamente sensibili), certi ceppi ospiti privi di enzimi proteolitici possono essere usati per la presente invenzione. Per esempio, i ceppi di cellule ospite possono essere modificati

per effettuare mutazioni genetiche nei geni che codificano proteasi batteriche note come Proteasi III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasi I, Proteasi Mi, Proteasi V, Proteasi VI e loro combinazioni. Alcuni ceppi di *E. coli* proteasi-deficienti sono disponibili e descritti in, per esempio, Joly et al. (1998), *supra*; Georgiou et al., Brevetto U.S. N. 5,264,365; Georgiou et al., Brevetto U.S. N. 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

I ceppi di *E. coli* privi di enzimi proteolitici e trasformati con plasmidi sovraesprimenti una o più proteine chaperone possono essere usati come cellule ospite nel sistema di espressione codificante gli anticorpi dell'invenzione.

d) *Purificazione degli anticorpi*

La proteina anticorpale prodotta qui è ulteriormente purificata per ottenere preparazioni che siano sostanzialmente omogenee per ulteriori saggi e usi. Possono essere impiegati i procedimenti standard di purificazione delle proteine noti nella tecnica. Le seguenti procedure sono esemplificative di procedure di purificazione opportune: frazionamento su colonne per immunoaffinità o scambio ionico, precipitazione in etanolo, HPLC in fase inversa, cromatografia su silice o su una resina a scambio cationico come DEAE, cromatofocusing, SDS-PAGE, precipitazione con solfato di ammonio, e gel filtrazione usando, per esempio, Sephadex G-75.

In un aspetto, la Proteina A immobilizzata su una fase solida è usata per la purificazione per immunoaffinità dei prodotti anticorpali a lunghezza intera dell'invenzione. La Proteina A è una proteina di 41 kD della parete cellulare da *Staphylococcus aureus* che si lega con elevata affinità alla regione Fc degli anticorpi. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase solida su cui è immobilizzata la Proteina A è preferibilmente una colonna comprendente una superficie di vetro o di silice, più preferibilmente una colonna di vetro a pori controllati o una colonna con acido silicico. In alcune applicazioni, la colonna è stata rivestita con un reagente, come glicerolo, nel tentativo di prevenire l'aderenza non specifica di contaminanti. La fase solida viene quindi lavata per rimuovere i contaminanti non specificamente legati alla fase solida. Infine l'anticorpo di interesse viene recuperato dalla fase solida mediante eluizione.

2. Produzione di anticorpi in cellule eucariotiche

Per l'espressione eucariotica, i componenti del vettore generalmente includono, ma non sono limitati a, uno o più dei seguenti, una sequenza segnale, un'origine della replicazione, uno o più geni marcatori, e un elemento potenziatore, un promotore, e una sequenza di terminazione della trascrizione.

a) *Componente della sequenza segnale*

Un vettore per l'uso in un ospite eucariote può anche un inserto che codifica una sequenza segnale o un altro polipeptide avente un sito

di clivaggio specifico al terminale amminico della proteina matura o del polipeptide. La sequenza segnale eterologa selezionata preferibilmente è quella che è riconosciuta ed elaborata (vale a dire, clivata mediante una peptidasi segnale) dalla cellula ospite. Nell'espressione in cellule di mammifero, le sequenze segnale di mammifero come pure le guide secretorie virali, per esempio, il segnale gD di herpes simplex, sono disponibili.

Il DNA per tale regione precursore è legato nella griglia di lettura al DNA codificante gli anticorpi dell'invenzione.

b) Origine della replicazione

Generalmente, il componente per l'origine della replicazione non è necessario per i vettori di espressione dei mammiferi (l'origine di SV40 può essere tipicamente usata solo perché contiene il promotore precoce).

c) Componente per il gene di selezione

I vettori di espressione e clonazione possono contenere un gene di selezione, anche denominato marcatore selezionabile. I tipici geni di selezione codificano proteine che (a) conferiscono resistenza ad antibiotici o ad altre tossine, per esempio, ampicillina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementano deficienze auxotrofiche, o (c) forniscono nutrienti critici non disponibili dai terreni complessi, per esempio, il gene codificante D-alanina racemasi per *Bacilli*.

Un esempio di uno schema di selezione utilizza un farmaco per arrestare la crescita di una cellula ospite. Quelle cellule che sono trasformate con successo con un gene eterologo producono una proteina che conferisce farmaco resistenza e pertanto sopravvivono al regime di selezione. Gli esempi di tale selezione dominante usano i farmaci neomicina, acido micofenolico e igromicina.

Un altro esempio di marcatori selezionabili opportuni per cellule di mammifero sono quelli che permettono l'identificazione di cellule in grado di tenere l'acido nucleico che codifica gli anticorpi dell'invenzione, come DHFR, timidina chinasi, metallotioneina-I e -II, preferibilmente geni per la metallotioneina di primate, adenosina deaminasi, ornitina decarbossilasi, eccetera.

Per esempio, le cellule trasformate con il gene di selezione DHFR sono prima identificate coltivando tutti i trasformanti in un terreno di coltura che contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo di DHFR. Una cellula ospite appropriata quando è impiegato DHFR wild-type è la linea cellulare di ovaio di criceto cinese (CHO) priva di attività DHFR (per esempio, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, le cellule ospite (particolarmente gli ospiti wild-type che contengono DHFR endogeno) trasformate o co-trasformate con le sequenze di DNA codificanti l'anticorpo, la proteina DHFR wild-type, e un altro marcatore selezionabile come aminoglicoside 3'-fosfotransferasi (APH) possono essere selezionate mediante crescita cellulare in terreno contenente un agente di selezione per il marcatore selezionabile come un antibiotico aminoglicosidico, per esempio, kanamicina, neomicina, o G418. Vedere il Brevetto U.S. N. 4,965,199.

d) *Componente promotore*

I vettori di espressione e clonazione solitamente contengono un promotore che è riconosciuto dall'organismo ospite ed è funzionalmente collegato all'acido nucleico che codifica le sequenze dell'anticorpo desiderato. Virtualmente tutti i geni eucariotici hanno una regione ricca in AT localizzata approssimativamente 25 a 30 basi a monte dal sito in cui è iniziata la trascrizione. Un'altra sequenza trovata 70 a 80 basi a monte dall'avvio della trascrizione di molti geni è una regione CNCAAT dove N può essere qualsiasi nucleotide. All'estremità 3' della maggior parte degli eucarioti c'è una sequenza AATAAA che può essere il segnale per l'aggiunta della coda poli A all'estremità 3' della sequenza codificante. Tutte queste sequenze possono essere inserite in vettori di espressione eucariotici.

Altri promotori adatti per l'uso con ospiti procarioti includono il promotore *phoA*, - i sistemi dei promotori di lattamasi e lattosio, il promotore della fosfatasi alcalina, un sistema del promotore del triptofano (*trp*), e promotori ibridi come il promotore *tac*. Tuttavia, altri promotori batterici noti sono adatti. I promotori per l'uso nei sistemi batterici conterranno anche una sequenza Shine-Dalgarno (S.D.) funzionalmente collegata al DNA codificante il polipeptide dell'anticorpo.

La trascrizione dei polipeptidi anticorpali dai vettori in cellule di mammifero è controllata, per esempio, da promotori ottenuti da genomi di virus come poliovirus, virus del vaiolo del pollame, adenovirus (come Adenovirus 2), papilloma virus bovino, virus del sarcoma aviario, citomegalovirus, un retrovirus, virus dell'epatite B e nel modo più preferibile Simian Virus 40 (SV40), da promotori di mammifero eterologhi, per esempio, il promotore di actina o il promotore di un'immunoglobulina, da promotore di shock termico, a condizione che tali promotori siano compatibili con i sistemi della cellula ospite.

I promotori precoce e tardivo del virus SV40 sono comodamente ottenuti come frammento di restrizione di SV40 che contiene anche l'origine della replicazione virale di SV40. Il promotore precoce immediato del citomegalovirus umano è comodamente ottenuto come frammento di restrizione con HindIII E. Un sistema per esprimere il DNA in ospiti mammifero usando il papillomavirus bovino come vettore è descritto nel Brevetto U.S. N. 4,419,446. Una modificazione di questo sistema è descritta nel Brevetto U.S. N. 4,601,978. Vedere anche Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) sull'espressione del cDNA di interferone umano in cellule di topo sotto il controllo di un promotore di timidina chinasi dal virus herpes simplex. Alternativamente, la lunga ripetizione terminale del virus del Sarcoma di Rous può essere usata come promotore.

e) *Componente dell'elemento potenziatore*

La trascrizione di un DNA codificante gli anticorpi di questa invenzione da parte di eucarioti superiori è spesso aumentata inserendo una sequenza potenziatrice nel vettore. Molte sequenze potenziatrici sono note dai geni di mammifero (globina, elastasi, albumina, α -fetoproteina, e

insulina). Tipicamente, tuttavia, si userà un potenziatore da un virus di cellule eucariotiche. Esempi includono il potenziatore di SV40 sul lato tardivo dell'origine della replicazione (bp 100-270), il potenziatore del promotore precoce di citomegalovirus, il potenziatore di polioma sul lato tardivo dell'origine della replicazione, e potenziatori di adenovirus. Vedere anche Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sugli elementi potenzianti per l'attivazione dei promotori eucariotici. Il potenziatore può essere aggiunto nel vettore in una posizione 5' o 3' rispetto alla sequenza codificante l'anticorpo, ma è preferibilmente localizzato nel sito 5' dal promotore.

f) *Componente di terminazione della trascrizione*

I vettori di espressione usati nelle cellule ospite eucariote (di lievito, funghi, insetto, pianta, animale, essere umano, o cellule nucleate da altri organismi multicellulari) conterranno anche le sequenze necessarie per la terminazione della trascrizione e per stabilizzare l'mRNA. Tali sequenze sono comunemente disponibili dalle regioni non tradotte 5' e, occasionalmente 3', di DNA o cDNA eucariotici o virali. Queste regioni contengono segmenti nucleotidici trascritti come frammenti poliadenilati nella porzione non tradotta dell'mRNA codificante l'anticorpo. Un componente di terminazione della trascrizione utile è la regione di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino. Vedere WO94/11026 e il vettore di espressione lì descritto.

g) *Selezione e trasformazione delle cellule ospite*

Cellule ospite adatte per clonare o esprimere il DNA nei vettori qui riportati includono cellule di eucarioti superiori descritte qui, incluse cellule ospite di vertebrato. La propagazione di cellule di vertebrato in coltura (coltura tissutale) è diventata una procedura di routine. Esempi di linee cellulari ospite di mammifero utili sono linea di rene di scimmia CV1 trasformata da SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linea di rene embrionale umano (cellule 293 o 293 subclonate per la crescita in coltura in sospensione, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); cellule di rene di cucciolo di criceto (BHK, ATCC CCL 10); cellule di ovaio di criceto cinese/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); cellule del Sertoli di topo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); cellule di rene di scimmia (CV1 ATCC CCL 70); cellule di rene di scimmia verde africana (VERO-76, ATCC CRL-1587); cellule di carcinoma cervicale umano (HELA, ATCC CCL 2); cellule di rene di cane (MDCK, ATCC CCL 34); cellule di fegato di ratto norvegese (BRL 3A, ATCC CRL 1442); cellule di polmone umano (W138, ATCC CCL 75); cellule di fegato umano (Hep G2, HB 8065); tumore mammario di topo (MMT 060562, ATCC CCL51); cellule TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); cellule MRC 5; cellule FS4; e una linea di epatoma umano (Hep G2).

Le cellule ospite sono trasformate con i vettori di espressione o clonazione sopra descritti per la produzione di anticorpi e coltivati in terreno nutriente convenzionale modificato quanto appropriato per indurre i promotori, selezionare i trasformanti, o amplificare i geni codificanti le

sequenze desiderate. Esempi di linee cellulari ospite di mammifero utili sono

h) Coltivare cellule ospite

Le cellule ospite usate per produrre l'anticorpo di questa invenzione possono essere coltivate in una varietà di terreni. Terreni commercialmente disponibili come Ham's F10 (Sigma), Terreno Minimo Essenziale ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Terreno Eagle Modificato di Dulbecco ((DMEM), Sigma) sono adatti per coltivare le cellule ospite. In aggiunta, uno qualsiasi dei terreni descritti in Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), nei Brevetti U.S. N. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; in WO 90/03430; WO 87/00195; o nel Brevetto U.S. Re. 30,985 può essere usato come terreno di coltura per le cellule ospite. Qualsiasi di questi terreni può essere integrato quando necessario con ormoni e/o altri fattori di crescita (come insulina, transferrina, o fattore di crescita epidemico), sali (come cloruro di sodio, calcio, magnesio, e fosfato), tamponi (come HEPES), nucleotidi (come adenosina e timidina), antibiotici (come il farmaco GENTAMYCIN™), elementi in tracce (definiti come composti inorganici solitamente presenti a concentrazioni finali nel campo di variazione micromolare), e glucosio o una fonte equivalente di energia. Qualsiasi altro integratore necessario può anche essere incluso a concentrazioni appropriate che saranno note a quelli esperti nella tecnica. Le condizioni di coltura, come temperatura, pH, e simili, sono quelle precedentemente usate con la cellula ospite selezionata per l'espressione, e saranno evidenti all'operatore normalmente esperto.

i) Purificazione dell'anticorpo

Quando si usano tecniche ricombinanti, l'anticorpo può essere prodotto intracellularmente, nello spazio periplasmico, o secreto direttamente nel terreno. Se l'anticorpo è prodotto intracellularmente, come primo passaggio, i residui particolati, o cellule ospite o frammenti lisati, vengono rimossi, per esempio, mediante centrifugazione o ultrafiltrazione. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) descrivono una procedura per isolare anticorpi che sono secreti verso lo spazio periplasmico di *E. coli*. In breve, la pasta cellulare è scongelata in presenza di acetato di sodio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) per circa 30 minuti. I detriti cellulari possono essere rimossi mediante centrifugazione. Se l'anticorpo è secreto nel terreno, i sumatanti da tali sistemi di espressione sono generalmente prima concentrati usando un filtro per concentrazione delle proteine commercialmente disponibile, per esempio, un'unità per ultrafiltrazione Pellicon Amicon o Millipore. Un inibitore di proteasi come PMSF può essere incluso in qualsiasi dei precedenti passaggi per inibire la proteolisi e gli antibiotici possono essere inclusi per prevenire la crescita di contaminanti avventizi.

La composizione anticorpale preparata dalle cellule può essere purificata usando, per esempio, cromatografia con idrossil apatite, elettroforesi su gel, dialisi, e cromatografia per affinità, con la cromatografia per affinità che è la tecnica di purificazione preferita. La convenienza

della proteina A come ligando di affinità dipende dalla specie e dall'isotipo del dominio Fc di qualsiasi immunoglobulina che è presente nell'anticorpo. La proteina A può essere usata per purificare anticorpi che si basano su immunoglobuline umane contenenti 1, 2, o 4 catene pesanti (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteina G è raccomandata per tutti gli isotipi di topo e per il 3 umano (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matrice a cui è attaccato il ligando di affinità è molto spesso agarosio, ma altre matrici sono disponibili. Le matrici meccanicamente stabili come il vetro a pori controllati o poli(stirene-divinil)benzene permettono velocità di flusso maggiori e tempi di elaborazione più brevi di quelli che possono essere ottenuti con l'agarosio. Quando l'anticorpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) è utile per la purificazione. Altre tecniche per la purificazione delle proteine come il frazionamento su una colonna a scambio ionico, la precipitazione con etanolo, HPLC in fase inversa, cromatografia su silice, cromatografia su eparina SEPHAROSE™, cromatografia su una resina a scambio anionico o cationico (come una colonna di acido poliaspartico), cromatofocusing, SDS-PAGE, e precipitazione con solfato di ammonio sono anche disponibili a seconda dell'anticorpo da recuperare.

Successivamente a qualsiasi passaggio di purificazione preliminare, la miscela comprendente l'anticorpo di interesse e i contaminanti può essere sottoposta a cromatografia per interazione idrofoba a pH basso usando un tampone di eluizione a un pH tra circa 2,5-4,5, preferibilmente eseguita a basse concentrazioni di sale (per esempio, da circa 0-0,25M di sale).

C. Preparazione dell'anticorpo

1) *Anticorpi policlonali*

Gli anticorpi policlonali sono generalmente suscitati negli animali mediante iniezioni multiple sottocutanee (sc) o intraperitoneali (ip) dell'antigene rilevante e di un adiuvante. Può essere utile coniugare l'antigene rilevante a una proteina che sia immunogenica nella specie da immunizzare, per esempio, emocianina di patella a buco della serratura (KLH), siero albumina, tiroglobulina bovina, o inibitore di tripsina di soia, usando un agente bifunzionale o derivatizzante, per esempio, estere di maleimidobenzil solfosuccinimide (coniugazione tramite residui di cisteina), N-idrossisuccinimide (tramite residui di lisina), glutaraldeide, anidride succinica, SOCl₂ o R¹N=C=NR, dove R e R¹ sono in maniera indipendente gruppi alchilici inferiori. Esempi di adiuvanti che possono essere impiegati includono l'adiuvante completo di Freund e l'adiuvante MPL-TDM (monofosforil Lipide A, trealosio dicorinomicolato sintetico). Il protocollo di immunizzazione può essere selezionato da uno esperto nella tecnica senza indebita sperimentazione.

Gli animali sono immunizzati contro l'antigene, i coniugati immunogenici, o derivati combinando, per esempio, 100 µg o 5 µg della proteina o del coniugato (per conigli o topi, rispettivamente) con 3 volumi di adiuvante completo di Freund e iniettando la soluzione per via

intrademica in siti multipli. Un mese più tardi, gli animali vengono richiamati con 1/5 a 1/10 della quantità originale di peptide o coniugato in adiuvante completo di Freund mediante iniezione sottocutanea in siti multipli. Da sette a quattordici giorni più tardi, gli animali sono fatti sanguinare e il siero viene saggiato per il titolo anticorpale. Gli animali sono richiamati fino al plateau del titolo. I coniugati possono anche essere realizzati in coltura di cellule ricombinanti come fusioni di proteine. Inoltre, agenti aggreganti come allume sono adatti per potenziare la risposta immunitaria.

2) *Anticorpi monoclonali*

Gli anticorpi monoclonali sono ottenuti da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, vale a dire che gli anticorpi individuali che costituiscono la popolazione sono identici eccetto per possibili mutazioni che si verificano naturalmente e/o modificazioni post-traduzionali (per esempio, isomerizzazioni, amidazioni) che possono essere presenti in minori quantità. Pertanto, il modificatore "monoclonale" indica il carattere dell'anticorpo per non essere una miscela di anticorpi discreti.

Per esempio, gli anticorpi monoclonali possono essere realizzati usando il procedimento dell'ibridoma descritto la prima volta da Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o possono essere realizzati mediante procedimenti con DNA ricombinante (Brevetto U.S. N. 4,816,567).

Nel procedimento con ibridoma, un topo o un altro animale ospite appropriato, come un criceto, viene immunizzato come qui sopra prima descritto per suscitare linfociti che producano o siano in grado di produrre anticorpi che si legheranno in maniera specifica alla proteina usata per l'immunizzazione. Alternativamente, i linfociti possono essere immunizzati *in vitro*. I linfociti sono quindi fusi con cellule di mieloma usando un opportuno agente di fusione, come glicole polietilenico, per formare una cellula di ibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pagg. 59-103 (Academic Press, 1986).

L'agente immunizzante includerà tipicamente la proteina antigenica o una sua variante di fusione. Generalmente vengono usati o i linfociti del sangue periferico ("PBL") se si desiderano cellule di origine umana, o cellule della milza o vengono usate cellule di linfonodi se si desiderano fonti di mammifero non umano. I linfociti sono quindi fusi con una linea cellulare immortalizzata usando un opportuno agente di fusione, come glicole polietilenico, per formare una cellula di ibridoma Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pagg. 59-103.

Le linee cellulari immortalizzate sono solitamente cellule di mammifero trasformate, in particolare cellule di mieloma di origine da roditori, bovina e umana. Solitamente, sono impiegate linee cellulari di mieloma di ratto o di topo. Le cellule di ibridoma così preparate sono seminate e cresciute in un opportuno terreno di coltura che contiene preferibilmente una o più sostanze che inibiscono la crescita o la sopravvivenza

delle cellule di mieloma d'origine, non fuse. Per esempio, se le cellule di mieloma d'origine mancano dell'enzima ipoxantina guanina fosforibosil transferasi (HGPRT o HPRT), il terreno di coltura per gli ibridomi includerà tipicamente ipoxantina, amminopterin, e timidina (terreno HAT), che sono sostanze che impediscono la crescita di cellule HGPRT-deficienti.

Le cellule di mieloma immortalizzate preferite sono quelle che si fondono in maniera efficace, sostengono una produzione stabile di alto livello dell'anticorpo da parte delle cellule che producono l'anticorpo selezionate, e sono sensibili a un terreno come il terreno HAT. Tra queste, sono preferite le linee di mieloma murino, come quelle derivate dai tumori di topo MOPC-21 e MPC-11 disponibili dal Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, e le cellule SP-2 (e i loro derivati, per esempio, X63-Ag8-653) disponibili da American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA. Linee cellulari di mieloma umano e di eteromioma topo-umano sono state anche descritte per la produzione di anticorpi monoclonali umani (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pagg. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Il terreno di coltura in cui crescono le cellule di ibridoma viene saggiato per la produzione di anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene. Preferibilmente, la specificità di legame degli anticorpi monoclonali prodotti dalle cellule di ibridoma è determinata mediante immunoprecipitazione o mediante un saggio di legame *in vitro*, come un radioimmunosaggio (RIA) o un saggio immunoassorbente con enzima coniugato (ELISA).

Il terreno di coltura in cui sono coltivate le cellule di ibridoma può essere saggiato per la presenza di anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene desiderato. Preferibilmente, l'affinità di legame e la specificità dell'anticorpo monoclonale possono essere determinate mediante immunoprecipitazione o mediante un saggio di legame *in vitro*, come un radioimmunosaggio (RIA) o un saggio immunoassorbente con enzima coniugato (ELISA). Tali tecniche e saggi sono noti nell'arte. Per esempio, l'affinità di legame può essere determinata mediante l'analisi di Scatchard di Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Dopo che sono state identificate le cellule di ibridoma che producono gli anticorpi della desiderata specificità, affinità, e/o attività, i cloni possono essere subclonati mediante procedure di diluizione limitante e fatti crescere mediante procedimenti standard (Goding, supra). I terreni di coltura adatti per questo scopo includono, per esempio, terreno D-MEM o RPMI-1640. In aggiunta, le cellule di ibridoma possono essere cresciute *in vivo* come tumori in un mammifero.

Gli anticorpi monoclonali secreti dai subcloni sono opportunamente separati dal terreno di coltura, dal fluido ascitico, o dal siero mediante procedure convenzionali di purificazione di immunoglobuline come, per esempio, proteina A-Sepharose, cromatografia con idrossil

apatite, elettroforesi su gel, dialisi, o cromatografia per affinità.

Gli anticorpi monoclonali possono anche essere realizzati mediante procedimenti con DNA ricombinante, come quelli descritti nel Brevetto U.S. N. 4,816,567, e come descritto sopra. Il DNA codificante gli anticorpi monoclonali è prontamente isolato e sequenziato usando procedure convenzionali (per esempio, usando sonde oligonucleotidiche che sono in grado di legarsi in modo specifico ai geni codificanti le catene pesanti e leggere degli anticorpi murini). Le cellule di ibridoma servono come fonte preferita di tale DNA. Una volta isolato, il DNA può essere posto in vettori di espressione, che sono quindi trasfettati in cellule ospite come cellule di *E. coli*, cellule COS di scimmia, cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), o cellule di mieloma che non producono altrimenti proteina immunoglobulina, per sintetizzare anticorpi monoclonali in tali cellule ospite ricombinanti. Articoli di recensione sull'espressione ricombinante nei batteri di DNA codificante l'anticorpo includono Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) e Plückerthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

Gli anticorpi possono essere isolati da librerie fagiche di anticorpi generate usando le tecniche descritte in McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrivono l'isolamento di anticorpi murini e umani, rispettivamente, usando librerie fagiche. Pubblicazioni successive descrivono la produzione di anticorpi umani ad alta affinità (nel campo di variazione nM) mediante rimescolamento delle catene (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), come pure infezione combinatoria e ricombinazione *in vivo* come strategia per costruire librerie fagiche molto grandi (Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Pertanto, queste tecniche sono alternative praticabili alle tradizionali tecniche di ibridomi per anticorpi monoclonali per l'isolamento di anticorpi monoclonali.

Il DNA può anche essere modificato, per esempio, sostituendo la sequenza codificante per i domini costanti umani delle catene pesane e leggera al posto delle sequenze murine omologhe (Brevetto U.S. N. 4,816,567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o unendo in maniera covalente alla sequenza codificante l'immunoglobulina tutto o parte della sequenza codificante per un polipeptide non immunoglobulina. Tipicamente tali polipeptidi non immunoglobulina sono sostituiti per i domini costanti di un anticorpo, o sono sostituiti per i domini variabili di un sito combinante l'antigene di un anticorpo per creare un anticorpo bivalente chimerico comprendente un sito combinante l'antigene avente specificità per un antigene e un altro sito combinante l'antigene avente specificità per un antigene differente.

Gli anticorpi monoclonali descritti qui possono essere monovalenti, la preparazione dei quali è ben nota nella tecnica. Per esempio, un procedimento implica l'espressione ricombinante di una catena leggera di immunoglobulina e di una catena pesante modificata. La catena pesante è troncata generalmente in qualsiasi punto nella regione Fc così da impedire la reticolazione della catena pesante. Alternativamente, i residui di

cisteina rilevanti possono essere sostituiti con un altro residuo amminoacidico o vengono cancellati così da impedire la reticolazione. Procedimenti *in vitro* sono anche adatti per preparare anticorpi monovalenti. La digestione degli anticorpi per produrre loro frammenti, in particolare frammenti Fab, può essere compiuta usando tecniche di routine note nell'arte.

Anticorpi chimerici o ibridi possono anche essere preparati *in vitro* usando procedimenti noti nella chimica sintetica delle proteine, inclusi quelli che implicano agenti di reticolazione. Per esempio, possono essere costruite immunotossine usando una reazione di scambio di disolfuro o formando un legame tioetere. Esempi di reagenti adatti per questo scopo includono iminotiolasto e metil-4-mercaptobutirrimidato.

3) *Anticorpi umanizzati.*

Gli anticorpi dell'invenzione possono inoltre comprendere anticorpi umanizzati o umani. Le forme umanizzate di anticorpi non umani (per esempio, murini) sono immunoglobuline chimeriche, catene di immunoglobuline o loro frammenti (come Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ o altre sequenze di anticorpi leganti l'antigene) che contengono sequenze minime derivate da immunoglobulina non umana. Gli anticorpi umanizzati includono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui residui da una regione determinante la complementarità (CDR) (HVR come usato qui) del ricevente sono sostituiti con residui da una CDR di una specie non umana (anticorpo donatore) come topo, ratto o coniglio avente la desiderata specificità, affinità e capacità. In alcuni casi, residui della struttura di Fv dell'immunoglobulina umana sono sostituiti dai corrispondenti residui non umani. Gli anticorpi umanizzati possono anche comprendere residui che non si trovano né nell'anticorpo ricevente né nella CDR importata o nelle sequenze comice. In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutto di almeno uno, e tipicamente due, dominio variabile, in cui tutto o sostanzialmente tutto delle regioni CDR corrisponde a quello di un'immunoglobulina non umana e tutto o sostanzialmente tutto delle regioni FR è quello di una sequenza di consenso di un'immunoglobulina umana. L'anticorpo umanizzato comprenderà anche in maniera ottimale almeno una porzione di una regione costante di immunoglobulina (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) e Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

I procedimenti per umanizzare anticorpi non umani sono ben noti nella tecnica. Generalmente, un anticorpo umanizzato ha uno o più residui amminoacidici introdotti in esso da una fonte che è non umana. Questi residui amminoacidici non umani sono spesso riportati come residui "import", che sono tipicamente presi da un dominio variabile "import", che sono tipicamente presi da un dominio variabile "import". L'umanizzazione può essere essenzialmente eseguita seguendo il procedimento di Winter e collaboratori, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988), o tramite la sostituzione di CDR di roditori o

sequenze CDR con le sequenze corrispondenti di un anticorpo umano. Di conseguenza, tali anticorpi "umanizzati" sono anticorpi chimerici (Brevetto U.S. N. 4,816,567), in cui sostanzialmente meno di un dominio variabile umano intatto è stato sostituito con la sequenza corrispondente da una specie non umana. In pratica, gli anticorpi umanizzati sono tipicamente anticorpi umani in cui alcuni residui di CDR e possibilmente alcuni residui di FR sono sostituiti con residui da siti analoghi in anticorpi di roditori.

La scelta dei domini variabili umani, sia leggeri sia pesanti, da usare per realizzare gli anticorpi umanizzati è molto importante per ridurre l'antigenicità. Secondo il cosiddetto procedimento del "più adatto", la sequenza del dominio variabile di un anticorpo di roditore è sottoposta a screening contro l'intera libreria di sequenze note del dominio variabile umano. La sequenza umana che è più vicina a quella del roditore è quindi accettata come cornice umana (FR) per l'anticorpo umanizzato. Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Un altro procedimento usa una cornice particolare derivata dalla sequenza di consenso di anticorpi tutti umani di un particolare sottogruppo di catene leggera e pesante. La medesima cornice può essere usata per parecchi anticorpi umanizzati differenti. Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

È inoltre importante che gli anticorpi siano umanizzati con conservazione dell'alta affinità per l'antigene e altre favorevoli proprietà biologiche. Per ottenere questo obiettivo, secondo un procedimento preferito, gli anticorpi umanizzati sono preparati mediante un processo di analisi delle sequenze d'origine e vari prodotti umanizzati concettuali usando modelli tridimensionali delle sequenze d'origine e umanizzate. I modelli di immunoglobulina tridimensionali sono comunemente disponibili e sono familiari a quelli esperti nella tecnica. Sono disponibili programmi per computer che illustrano e mostrano le probabili strutture conformazionali tridimensionali delle sequenze di immunoglobulina candidata selezionata. L'ispezione di queste esposizioni permette l'analisi del probabile ruolo dei residui nel funzionamento della sequenza di immunoglobulina candidata, vale a dire, l'analisi dei residui che influenzano la capacità dell'immunoglobulina candidata di legare il suo antigene. In questo modo, i residui di FR possono essere selezionati e combinati dal ricevente e le sequenze import così che le caratteristiche desiderate dell'anticorpo, come un'aumentata affinità per l'antigene bersaglio, sia ottenuta. In generale, i residui di CDR sono coinvolti direttamente e nel modo più sostanziale nell'influenzare il legame all'antigene.

Sono contemplate varie forme dell'anticorpo umanizzato. Per esempio, l'anticorpo umanizzato può essere un frammento anticorpale, che è facoltativamente coniugato con uno o più agenti citotossici per generare un immunoconiugato. Alternativamente, l'anticorpo umanizzato può essere un anticorpo intatto, come un anticorpo IgG1.

4) *Anticorpi umani*

Come alternativa all'umanizzazione, possono essere generati anticorpi umani. Per esempio, è ora possibile produrre animali transgenici (per esempio topi) che sono in grado, al momento dell'immunizzazione, di produrre un repertorio completo di anticorpi umani in assenza di produzione di immunoglobulina endogena. Per esempio, è stato descritto che la delezione omozigote del gene della regione (J_H) che si unisce alla catena pesante dell'anticorpo in topi mutanti nella linea germinale e chimerici determina l'inibizione completa della produzione di anticorpi endogeni. Il trasferimento dell'array di geni di immunoglobulina della linea germinale umana in tale linea germinale del topo mutante risulterà nella produzione di anticorpi umani al momento della stimolazione con l'antigene. Vedere, per esempio, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); Brevetto U.S. N. 5,591,669 e WO 97/17852.

Alternativamente, la tecnologia di esposizione su fago può essere usata per produrre anticorpi umani e frammenti anticorpali in vitro, da repertori di geni del dominio variabile (V) di immunoglobulina da donatori non immunizzati. McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990); Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). Secondo questa tecnica, geni del dominio V anticorpale sono clonati in griglia in un gene o maggiore o minore della proteina di rivestimento di un batteriofago filamentoso, come M13 o fd, ed esposti come frammenti anticorpali funzionali sulla superficie della particella fagica. Poiché la particella filamentosa contiene una copia del DNA a filamento singolo del genoma fagico, le selezioni basate sulle proprietà funzionali dell'anticorpo determinano anche la selezione del gene codificante l'anticorpo che presenta quelle proprietà. Pertanto, il fago imita alcune delle proprietà della cellula B. L'esposizione su fago può essere eseguita in una varietà di formati, recensiti in, per esempio, Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., Curr. Opin Struct. Biol. 3:564-571 (1993). Parecchie fonti di segmenti di geni V possono essere usati per l'esposizione su fago. Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) hanno isolato un differente array di anticorpi anti-ossazolone da una piccola libreria combinatoria casuale di geni V derivati dalle milze dei topi immunizzati. Un repertorio di geni V da donatori umani non immunizzati può essere costruito, e gli anticorpi verso un diverso array di antigeni (inclusi antigeni self) possono essere isolati essenzialmente seguendo le tecniche descritte da Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Vedere anche i Brevetti U.S. N. 5,565,332 e 5,573,905.

Le tecniche di Cole *et al.*, e Boemer *et al.*, sono anche disponibili per la preparazione di anticorpi monoclonali umani (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boemer et al., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). In maniera simile, anticorpi umani possono essere realizzati introducendo loci di immunoglobulina umana in animali transgenici, per esempio, topi in cui i geni delle immunoglobuline endogene sono stati parzialmente o completamente inattivati. Al momento della stimolazione, si osserva la produzione

anticorpale umana, che assomiglia molto a quella vista negli esseri umani in ogni aspetto, incluso il riarrangiamento genico, l'assemblaggio e il repertorio anticorpale. Questo approccio è descritto, per esempio, nei Brevetti U.S. N.: 5,545,807; 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016 e nelle seguenti pubblicazioni scientifiche: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996), e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Infine, anticorpi umani possono anche essere generati in vitro da cellule B attivate (vedere i Brevetti U.S. N. 5,567,610 e 5,229,275).

5) *Frammenti Anticorpali*

In certe circostanze esistono vantaggi nell'utilizzare frammenti anticorpali, anziché interi anticorpi. Le dimensioni dei frammenti più piccole consentono una rapida eliminazione e possono portare ad un migliore accesso ai tumori solidi.

Sono state sviluppate varie tecniche per la produzione di frammenti anticorpali. Tradizionalmente, questi frammenti sono stati derivati mediante la digestione proteolitica di anticorpi intatti (vedere, per esempio, Morimoto et al., *J Biochem Biophys Method* 24: 107-117 (1992) e Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985)). Tuttavia, questi frammenti possono ora essere prodotti direttamente da cellule ospite ricombinanti. I frammenti anticorpali Fab, Fv e scFv possono essere tutti espressi in e secreto da *E. coli*, consentendo così la facile produzione di grandi quantità di questi frammenti. I frammenti dell'anticorpo possono essere isolati dalle librerie fagiche di anticorpi esaminate in precedenza. In alternativa, i frammenti Fab'-SH possono essere recuperati direttamente da *E. coli* e associati chimicamente per formare frammenti F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Secondo un altro approccio, i frammenti F(ab')₂ possono essere isolati direttamente dalla coltura di cellule ospite ricombinanti. Fab e F(ab')₂ con aumento di emivita in vivo sono descritti nel Brevetto U.S. N. 5,869,046. L'anticorpo di scelta può essere un frammento Fv a singola catena (scFv). Vedere WO 93/16185; il Brevetto U.S. n. 5,571,894 e il Brevetto U.S. n. 5,587,458. Il frammento dell'anticorpo può anche essere un "anticorpo lineare", per esempio, come descritto nel Brevetto U.S. N. 5,641,870. Tali frammenti lineari di anticorpi possono essere monospecifici o bispecifici.

6) *Terapia con Profarmaco Enzima-Mediata Anticorpo-Dipendente (ADEPT)*

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere utilizzati anche in ADEPT coniugando l'anticorpo ad un enzima che attiva il profarmaco che converte un profarmaco (per esempio, un agente chemioterapeutico peptidile, vedere WO 81/01145) in un farmaco anticancro attivo. Vedere, per esempio, WO 88/07378 e il brevetto U.S. n. 4,975,278.

La componente enzimatica dell'immunoconiugato utile per ADEPT comprende qualsiasi enzima capace di agire su un profarmaco in

modo tale da trasformarlo nella sua forma più attiva, citotossica.

Gli enzimi che sono utili nel procedimento della presente invenzione includono, ma non sono limitati a, la glicosidasi, la glucosio ossidasi, il llisozima umano, la glucuronidasi umana, la fosfatasi alcalina utile per la conversione di profarmaci contenenti fosfati in farmaci liberi; arilsulfatasi utile per la conversione di profarmaci contenenti solfato in farmaci liberi; citosina deaminasi utile per la conversione della 5-fluorocitosina non tossica nel farmaco anticancro 5-fluorouracile; proteasi come proteasi di serratia, termolisina, subtilisina, carbossipeptidasi (per esempio, carbossipeptidasi G2 e carbossipeptidasi A) e catepsine (come le catepsine B e L), utili per la conversione di profarmaci contenenti peptidi in farmaci liberi; D-alanilcarbossipeptidasi, utili per la conversione di profarmaci che contengono sostituenti di D-amminoacidi; enzimi che clivano carboidrati come β -galattosidasi e neuraminidasi utili per la conversione di profarmaci glicosilati in farmaci liberi; β -lattamasi utile per la conversione di farmaci derivatizzati con β -lattami in farmaci liberi; e penicillina amidasi, come la penicillina Vamidasi o la penicillina G amidasi, utili per la conversione di farmaci derivatizzati negli atomi di azoto delle loro ammine con gruppi fenossiacetil o fenilacetil, rispettivamente, in farmaci liberi. In alternativa, gli anticorpi con attività enzimatica, noti anche nella tecnica come "abzimi", possono essere utilizzati per convertire i profarmaci dell'invenzione in farmaci attivi liberi (vedere, per esempio, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Possono essere preparati coniugati di anticorpo-abzima come qui descritto per il rilascio dell'abzima ad una popolazione di cellule tumorali.

Gli enzimi sopra menzionati possono essere legati covalentemente al polipeptide o agli anticorpi qui descritti con tecniche ben note nell'arte come l'uso degli agenti di reticolazione eterobifunzionali esaminati in precedenza. In alternativa, proteine di fusione contenenti almeno la regione di legame all'antigene dell'anticorpo dell'invenzione collegata ad almeno una porzione funzionalmente attiva di un enzima dell'invenzione possono essere costruite usando tecniche del DNA ricombinante ben note nell'arte (v. per esempio, Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)).

7) Anticorpi bispecifici e polispecifici

Gli anticorpi bispecifici (BsAb) sono anticorpi che hanno specificità di legame per almeno due epitopi diversi, inclusi quelli sulla stessa o su un'altra proteina. In alternativa, un braccio può legarsi all'antigene bersaglio e un altro braccio può essere combinato con un braccio che si lega a una molecola di innesco su un leucocita come una molecola del recettore di linfociti T (per esempio CD3) o recettori Fc per IgG (Fc γ R) Come Fc γ R1 (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), in modo da focalizzare e localizzare i meccanismi di difesa cellulare sulla cellula esprimente l'antigene bersaglio. Tali anticorpi possono essere derivati da anticorpi di lunghezza intera o frammenti anticorpali (per esempio anticorpi bispecifici di F(ab')₂).

Gli anticorpi bispecifici possono anche essere usati per localizzare gli agenti citotossici alle cellule che esprimono l'antigene bersaglio.

Tali anticorpi possiedono un braccio che lega l'antigene desiderato e un altro braccio che lega l'agente citotossico (per esempio, saporina, anti-interferone- α , alcaloide della vinca, catena di ricina A, metotrexato o aptene di isotopo radioattivo). Esempi di anticorpi bispecifici noti includono anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII (WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-Fc γ RI (U.S.P. 5,837,234), anti-ErbB2/anti-CD3 (U.S. 5,821,337).

Metodi per la produzione di anticorpi bispecifici sono noti nella tecnica. La produzione tradizionale di anticorpi bispecifici a lunghezza intera si basa sulla coespressione di due coppie di catene pesanti/catene leggere di immunoglobulina, dove le due catene presentano specificità diverse. Millstein et al., *Nature*, **305**: 537-539 (1983). A causa dell'assortimento casuale di catene pesanti e leggere di immunoglobuline, questi ibridomi (quadromi) producono una potenziale miscela di 10 diverse molecole anticorpali, di cui solo una ha la corretta struttura bispecifica. La purificazione della molecola corretta, di solito fatta con passi di cromatografia di affinità, è piuttosto ingombrante e le rese del prodotto sono basse. Procedure simili sono descritte in WO 93/08829 e in Traunecker et al., *EMBO J.*, **10**: 3655-3659 (1991).

Secondo un approccio diverso, i domini variabili di anticorpi con le specificità di legame desiderate (siti di combinazione anticorpo-antigene) sono fusi alle sequenze di dominio costante di immunoglobuline. La fusione è preferibilmente con un dominio costante della catena pesante dell'immunoglobulina, che comprende almeno una parte delle regioni cerniera, CH2 e CH3. Si preferisce avere la prima regione costante della catena pesante (CH1) contenente il sito necessario per legare catena leggera, presente in almeno una delle fusioni. I DNA che codificano le fusioni della catena pesante dell'immunoglobulina e, se lo si desidera, la catena leggera dell'immunoglobulina, vengono inseriti in vettori di espressione separati e vengono co-trasfettati in un idoneo organismo ospite. Ciò garantisce una grande flessibilità nella regolazione delle proporzioni reciproche dei tre frammenti di polipeptidi nelle forme di realizzazione quando rapporti ineguali delle tre catene polipeptidiche utilizzate nella costruzione forniscono i rendimenti ottimali. È comunque possibile inserire le sequenze codificanti per due o tutte le tre catene polipeptidiche in un vettore di espressione quando l'espressione di almeno due catene di polipeptidi in rapporti uguali determina rese elevate o quando i rapporti non hanno alcun significato particolare.

Gli anticorpi bispecifici possono essere composti da una catena pesante di immunoglobulina ibrida con una prima specificità di legame in un braccio e una coppia ibrida catena pesante-catena leggera di immunoglobulina (formando una seconda specificità di legame) nell'altro braccio. Si è scoperto che questa struttura asimmetrica facilita la separazione del composto bispecifico desiderato dalle combinazioni di catene immunoglobuliniche indesiderate, poiché la presenza di una catena leggera di immunoglobulina in una sola metà delle molecole bispecifiche fornisce un modo semplice di separazione. Questo approccio è descritto in WO 94/04690. Per ulteriori dettagli sulla generazione di anticorpi bispecifici, vedere per esempio Suresh et al., *Methods in Enzymology* **121**: 210 (1986).

Secondo un altro approccio descritto nella WO 96/27011 o U.S.P. 5,731,168, l'interfaccia tra una coppia di molecole anticorpali può essere progettata per massimizzare la percentuale di eterodimeri che sono recuperati dalla coltura cellulare ricombinante. L'interfaccia preferita comprende almeno una parte della regione CH3 di un dominio costante dell'anticorpo. In questo metodo, una o più catene laterali di amminoacidi piccole dall'interfaccia della prima molecola di anticorpo sono sostituite da catene laterali più grandi (per esempio tirosina o triptofano). Le "cavità" compensatorie di dimensioni identiche o simili alle grandi catene laterali sono create sull'interfaccia della seconda molecola di anticorpi sostituendo le catene laterali di amminoacidi grandi con quelle più piccole (per esempio, alanina o treonina). Ciò fornisce un meccanismo per aumentare la resa dell'eterodimero su altri prodotti finali indesiderati, come gli omodimeri.

Tecniche per la generazione di anticorpi bispecifici da frammenti anticorpali sono state descritte in letteratura. Per esempio, gli anticorpi bispecifici possono essere preparati utilizzando il legame chimico. Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985) descrivono una procedura in cui gli anticorpi intatti vengono clivati proteoliticamente per generare frammenti F(ab')₂. Questi frammenti sono ridotti in presenza dell'arsenite di sodio agente complessante ditiolo per stabilizzare ditioli vicini e prevenire la formazione di disolfuri intermolecolari. I frammenti Fab' generati vengono quindi convertiti in derivati di tionitrobenzoato (TNB). Uno dei derivati Fab'-TNB viene quindi riconvertito nel derivato Fab'-TNB per formare l'anticorpo bispecifico. Gli anticorpi bispecifici prodotti possono essere usati come agenti per la immobilizzazione selettiva di enzimi.

I frammenti Fab' possono essere recuperati direttamente da *E. coli* e accoppiati chimicamente per formare anticorpi bispecifici. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) descrive la produzione di molecole di F(ab')₂ di anticorpi bispecifici completamente umanizzate. Ogni frammento Fab' è stato secreto separatamente da *E. coli* e sottoposto ad accoppiamento chimico diretto *in vitro* per formare l'anticorpo bispecifico. L'anticorpo bispecifico così formato è stato in grado di legarsi alle cellule che sovraesprimono il recettore ErbB2 e i normali linfociti T umani, nonché innescare l'attività litica dei linfociti citotossici umani contro i bersagli del tumore al seno umano.

Sono state inoltre descritte varie tecniche per la produzione e l'isolamento di frammenti anticorpali bivalenti direttamente dalla coltura cellulare ricombinante. Per esempio, eterodimeri bivalenti sono stati prodotti usando le cerniere di leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). I peptidi della cerniera di leucine dalle proteine Fos e Jun sono stati legati alle porzioni Fab' di due diversi anticorpi mediante fusione genica. Gli omodimeri anticorpali sono stati ridotti alla regione di cerniera per formare monomeri e quindi ri-ossidati per formare gli eterodimeri degli anticorpi. La tecnologia "diabodi" descritta da Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha fornito un meccanismo alternativo per la produzione di frammenti bispecifici/bivalenti di anticorpi. I frammenti comprendono un dominio variabile a catena pesante (V_H) collegato ad un dominio variabile a catena leggera (V_L) da un linker troppo breve per consentire l'abbinamento tra i due domini sulla

stessa catena. Di conseguenza, i domini V_H e V_L di un frammento sono costretti a accoppiarsi con i domini V_L e V_H complementari di un altro frammento, formando così due siti di legame all'antigene. È stata inoltre riportata un'altra strategia per la produzione di frammenti anticorpali bispecifici/bivalenti mediante l'utilizzo di dimeri Fv (sFv) a catena singola. Vedere Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Sono contemplati anticorpi con più di due valenze. Per esempio, si possono preparare anticorpi trispecifici. Tutt et al., J. Immunol. 147:60(1991).

Gli anticorpi bispecifici esemplificativi possono legarsi a due differenti epitopi su una determinata molecola. In alternativa, un braccio anti-proteina può essere combinato con un braccio che si lega a una molecola innescante su un leucocita come una molecola del recettore dei linfociti T (per esempio CD2, CD3, CD28 o B7) o recettori Fc per IgG (Fc γ R), come Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16) in modo da focalizzare i meccanismi di difesa cellulare sulla cellula che esprime la particolare proteina. Gli anticorpi bispecifici possono anche essere usati per localizzare agenti citotossici a cellule che esprimono una particolare proteina. Tali anticorpi possiedono un braccio che lega la proteina e un braccio che lega un agente citotossico o un chelatore radionuclide, come EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Un altro anticorpo bispecifico di interesse lega la proteina di interesse e lega inoltre il fattore tissutale (TF).

8) *Anticorpi multivalenti*

Un anticorpo multivalente può essere internalizzato (e/o catabolizzato) più velocemente di un anticorpo bivalente da una cellula che esprime un antigene a cui gli anticorpi si legano. Gli anticorpi della presente invenzione possono essere anticorpi multivalenti (che sono diversi dalla classe IgM) con tre o più siti leganti l'antigene (per esempio anticorpi tetravalenti), che possono essere prontamente prodotti mediante espressione ricombinante di acido nucleico che codifica le catene polipeptidiche dell'anticorpo. L'anticorpo multivalente può comprendere un dominio di dimerizzazione e tre o più siti di legame all'antigene. Il dominio di dimerizzazione preferito comprende (o è composto da) una regione Fc o una regione di cerniera. In questo scenario, l'anticorpo comprenderà una regione Fc e tre o più siti di legame all'antigene amino-terminale alla regione Fc. L'anticorpo multivalente preferito qui comprende (o è composto da) tre a circa otto, ma preferibilmente quattro, siti di legame all'antigene. L'anticorpo multivalente comprende almeno una catena di polipeptidi (e preferibilmente due catene di polipeptidi), in cui la catena polipeptidica comprende due o più domini variabili. Per esempio, la catena polipeptidica può comprendere VD1- (X1)_n-VD2- (X2)_n-Fc, in cui VD1 è un primo dominio variabile, VD2 è un secondo dominio variabile, Fc è una catena di polipeptidi di una Fc Regione, X1 e X2 rappresentano un amminoacido o un polipeptide, e n è 0 o 1. Per esempio, la catena dei polipeptidi può comprendere: la catena della regione VH-CH1-linker flessibile-VH-CH1-Fc; o la catena della regione VH-CH1-VH-CH1-Fc. L'anticorpo multivalente qui preferibilmente comprende inoltre almeno due

(e preferibilmente quattro) polipeptidi del dominio variabile a catena leggera. Per esempio, l'anticorpo multivalente qui può comprendere da circa due a circa otto polipeptidi del dominio variabile di catena leggera. I polipeptidi di dominio variabile di catena leggera contemplati qui comprendono un dominio variabile di catena leggera e, facoltativamente, comprendono inoltre un dominio CL.

9) *Anticorpi eteroconiugati*

Gli anticorpi eteroconiugati sono anche nell'ambito della presente invenzione. Gli anticorpi eteroconiugati sono composti da due anticorpi uniti covalentemente. Per esempio, uno degli anticorpi nel eteroconiugato può essere accoppiato all'avidina, l'altro alla biotina. Per esempio, tali anticorpi sono stati proposti per indirizzare le cellule del sistema immunitario verso cellule indesiderate, U.S.P. 4,676,980, e per il trattamento dell'infezione da HIV. WO 91/00360, WO 92/200373 e EP 0308936. Si prevede che gli anticorpi possano essere preparati in vitro utilizzando procedimenti noti nella chimica sintetica delle proteine, compresi quelli che coinvolgono agenti reticolanti. Per esempio, le immunotossine possono essere costruite utilizzando una reazione di scambio di disolfuro o formando un legame di tioetere. Esempi di reagenti adatti a questo scopo includono l'iminotiolato e il metil-4-mercaptobutirrimidato e quelli descritti, per esempio, nel Brevetto U.S. No. 4.676.980. Gli anticorpi eteroconiugati possono essere realizzati usando qualsiasi procedimento di reticolazione conveniente. Agenti di reticolazione adatti sono ben noti nell'arte, e sono descritti nel Brevetto U.S. No. 4,676,980, insieme a numerose tecniche di reticolazione.

10) *Ingegnerizzazione della Funzioni Effettrice*

Può essere desiderabile modificare l'anticorpo dell'invenzione rispetto alla funzione effettrice di Fc, per esempio per modificare (per esempio, potenziare o eliminare) la citotossicità cellulo-mediata antigene-dipendente (ADCC) e/o la citotossicità dipendente da complemento (CDC) dell'anticorpo. La funzione effettrice di Fc degli anticorpi anti-PD-L1 può essere ridotta o eliminata. Ciò può essere ottenuto introducendo una o più sostituzioni di amminoacidi in una regione Fc dell'anticorpo. In alternativa o in aggiunta, i residui di cisteina possono essere introdotti nella regione Fc, consentendo così la formazione di legami disolfuri intercatena in questa regione. L'anticorpo omodimerico così ottenuto può avere una migliorata capacità di intemalizzazione e/o un' aumentata uccisione delle cellule mediata dal complemento e citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC). Vedere Caron et al., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpi omodimerici con attività antitumorale potenziata possono anche essere preparati utilizzando cross-linker eterobifunzionali come descritto in Wolff et al., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). In alternativa, può essere progettato un anticorpo dotato di doppie regioni Fc e può quindi avere una potenziata lisi del complemento e capacità ADCC. Vedere Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

Per aumentare l'emivita nel siero dell'anticorpo, si può incorporare un epitopo di legame al recettore wild-type nell'anticorpo (in

particolare un frammento anticorpale) come descritto nel Brevetto U.S. 5,739,277, per esempio. Come usato qui, il termine "epitopo di legame al recettore wild-type" si riferisce a un epitopo della regione Fc di una molecola IgG (per esempio IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) responsabile dell'incremento dell'emivita nel siero *in vivo* della molecola IgG.

11) Altre modificazioni delle sequenze di amminoacidi

Sono contemplate modificazioni delle sequenze di amminoacidi degli anticorpi qui descritti. Per esempio, può essere desiderabile migliorare l'affinità di legame e/o altre proprietà biologiche dell'anticorpo. Le varianti delle sequenze di amminoacidi dell'anticorpo vengono preparate introducendo opportune modifiche nucleotidiche nell'acido nucleico dell'anticorpo, o mediante sintesi peptidica. Tali modifiche includono, per esempio, le delezioni da e/o inserzioni in e/o sostituzioni di, residui all'interno delle sequenze di amminoacidi dell'anticorpo. Qualsiasi combinazione di delezione, inserzione e sostituzione viene fatta per arrivare al costrutto finale, a condizione che il costrutto finale possieda le caratteristiche desiderate. Le modificazioni dell'amminoacido possono anche alterare i processi post-traduzionali dell'anticorpo, come cambiare il numero o la posizione dei siti di glicosilazione.

Un procedimento utile per identificare determinati residui o regioni dell'anticorpo che sono luoghi preferiti per la mutagenesi è chiamato "mutagenesi con scansione di alanina" come descritto da Cunningham e Wells in *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Qui, sono identificati un residuo o un gruppo di residui bersaglio (per esempio, residui carichi quali arg, asp, his, lys e glu) e sostituiti da un amminoacido neutro o negativamente caricato (più preferibilmente alanina o polialanina) per influenzare l'interazione degli antigeni degli amminoacidi. Quelle posizioni degli amminoacidi che dimostrano la sensibilità funzionale alle sostituzioni vengono quindi raffinate introducendo ulteriori o altre varianti nei o per i siti di sostituzione. Pertanto, mentre il sito per introdurre una variazione di sequenza amminoacidica è predeterminato, la natura della mutazione di per sé non deve essere predeterminata. Per esempio, per analizzare le prestazioni di una mutazione in un determinato sito, la mutagenesi con scansione di ala o casuale è condotta nel codone o regione bersaglio e le varianti di anticorpi espresse vengono sottoposte a screening per l'attività desiderata.

Le inserzioni di sequenze di amminoacidi includono fusioni ammino- e/o carbossi-terminali che spaziano in lunghezza da un residuo a polipeptidi contenenti cento o più residui, nonché inserzioni intrasequenza di residui singoli o multipli di amminoacidi. Esempi di inserzioni terminali includono un anticorpo con un residuo metionilico N-terminale o l'anticorpo fuso a un polipeptide citotossico. Altre varianti di inserzione della molecola anticorpale includono la fusione al terminale amminico o carbossilico dell'anticorpo ad un enzima (per esempio per ADEPT) o un polipeptide che aumenta l'emivita nel siero dell'anticorpo.

Un altro tipo di variante è una variante di sostituzione di amminoacidi. Queste varianti hanno almeno un residuo amminoacidico nella molecola dell'anticorpo sostituito da un residuo differente. I siti di maggior interesse per la mutagenesi sostitutiva includono le regioni ipervariabili, ma sono anche contemplate alterazioni di FR. Le sostituzioni conservative sono mostrate nella tabella A sotto riportata alla voce "sostituzioni preferite". Se tali sostituzioni comportano un cambiamento nell'attività biologica, possono allora essere introdotti cambiamenti più sostanziali, denominati "sostituzioni esemplificative" nella tabella A, o come descritto più avanti in riferimento alle classi di amminoacidi, e i prodotti possono essere sottoposti a screening.

Tabella A

Sostituzioni di amminoacidi

Residuo originale	Sostituzioni esemplificative	Sostituzioni preferite
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	Lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	Leu; val; met; ala; phe; norleucine	Leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	Leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	Leu

Le modificazioni sostanziali nelle proprietà biologiche dell'anticorpo sono realizzate selezionando sostituzioni che differiscono significativamente nel loro effetto sul mantenimento (a) della struttura dello scheletro del polipeptide nella zona della sostituzione, per esempio come conformazione a foglietto o a elica, (b) la carica o l'idrofobia della molecola nel sito bersaglio, o (c) l'ingombro della catena laterale. I residui naturali sono suddivisi in gruppi basati sulle proprietà comuni della catena laterale:

(1) idrofobo: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) neutro idrofilo: cys, ser, thr;

(3) acido: asp, glu;

(4) basico: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residui che influenzano l'orientamento della catena: gly, pro; e

(6) aromatico: trp, tyr, phe.

Sostituzioni non conservative comporteranno lo scambio di un membro di una di queste classi con un altro.

Eventuali residui di cisteina non coinvolti nel mantenere la conformazione appropriata dell'anticorpo possono anche essere sostituiti, generalmente con la serina, per migliorare la stabilità ossidativa della molecola e impedire una reticolazione aberrante. Al contrario, legami di cisteina possono essere aggiunti all'anticorpo per migliorare la sua stabilità (in particolare quando l'anticorpo è un frammento anticorpale come un frammento Fv).

Un tipo particolarmente preferito di variante sostitutiva comporta la sostituzione di uno o più residui di regione ipervariabile di un anticorpo d'origine (per esempio un anticorpo umanizzato o umano). In generale, la variante risultante selezionata per ulteriore sviluppo avrà migliori proprietà biologiche rispetto all'anticorpo d'origine da cui vengono generati. Un modo conveniente per generare tali varianti sostitutive comporta la maturazione per affinità usando l'esposizione su fago. In breve, diversi siti di regione ipervariabile (per esempio 6-7 siti) vengono mutati per generare tutte le possibili ammino sostituzioni in ogni sito. Le varianti anticorpali così generate vengono esposte in maniera monovalente da particelle di fago filamentoso come fusioni al prodotto genico III di M13 confezionato in ciascuna particella. Le varianti esposte su fago vengono quindi sottoposte a screening per la loro attività biologica (per esempio affinità di legame) come descritto qui. Al fine di identificare i siti di regione ipervariabile candidati per la modifica, la mutagenesi con scansione di alanina può essere eseguita per identificare residui della regione ipervariabile che contribuiscono in modo significativo al legame dell'antigene. In alternativa, o in aggiunta, può essere utile analizzare una struttura cristallina del complesso antigene-anticorpo per identificare i punti di contatto tra l'anticorpo e il suo bersaglio (per esempio, PD-L1, B7.1). Tali residui di contatto e residui vicini sono candidati alla sostituzione secondo le tecniche qui elaborate. Una volta che tali varianti vengono generate, il pannello delle varianti viene sottoposto a screening come descritto qui e gli anticorpi con proprietà superiori in uno o più saggi pertinenti possono essere selezionati per ulteriori sviluppi.

Un altro tipo di variante amminoacidica dell'anticorpo altera il modello di glicosilazione originale dell'anticorpo. Alterare significa eliminare uno o più porzioni di carboidrati presenti nell'anticorpo, e/o aggiungere uno o più siti di glicosilazione che non sono presenti nell'anticorpo.

La glicosilazione degli anticorpi è tipicamente N-legata od O-legata. N-legata si riferisce all'attacco della porzione di carboidrati alla catena laterale di un residuo di asparagine. Le sequenze tripeptidiche asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, in cui X è qualsiasi amminoacido tranne la prolina, sono le sequenze di riconoscimento per l'attacco enzimatico della parte di carboidrato alla catena laterale di asparagina. Così, la presenza di una di queste sequenze tripeptidiche in un polipeptide crea un potenziale sito di glicosilazione. La glicosilazione O-legata si riferisce all'attacco di uno degli zuccheri N-aceilgalattosammina, galattosio o xilosio ad un idrossiamminoacido, più comunemente la serina o la treonina, anche se 5-idrossiprolina o 5-idrossilisina possono anche essere utilizzate.

L'aggiunta di siti di glicosilazione all'anticorpo è convenientemente realizzata alterando la sequenza amminoacidica in modo che contenga una o più delle sequenze di tripeptidi sopra descritte (per i siti di glicosilazione N-legati). L'alterazione può anche essere effettuata mediante l'aggiunta di, o la sostituzione, di uno o più residui di serina o treonina alla sequenza dell'anticorpo originale (per i siti di glicosilazione O-legati).

Le molecole di acido nucleico che codificano varianti di sequenze di amminoacidi agli anticorpi dell'invenzione vengono preparate con una varietà di procedimenti noti nella tecnica. Questi procedimenti includono, ma non sono limitati a, l'isolamento da una fonte naturale (nel caso di varianti di sequenze amminoacidiche naturali) o preparazione mediante una mutagenesi mediata da oligonucleotidi (o sito-diretta), mutagenesi PCR, e mutagenesi a cassette di una variante precedentemente preparata o di versioni non varianti.

12) Altre modifiche dell'anticorpo

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere ulteriormente modificati per contenere ulteriori porzioni non proteiche che sono note nella tecnica e sono prontamente disponibili. Preferibilmente, le porzioni adatte alla derivatizzazione dell'anticorpo sono polimeri idrosolubili. Esempi non limitativi di polimeri solubili in acqua comprendono, ma non sono limitati, polietilenglicole (PEG), copolimeri di etilene glicole/propilenglicole, carbossimetilcellulosa, destrosio, alcool polivinilico, polivinilpirrolidone, poli-1,3 diossolano, poli -1,3,6-triossano, copolimero etilene/anidride maleica, poliamminoacidi (omopolimeri o copolimeri casuali) e polietilenglicole di destrano o di poli(n-vinilpirrolidone), omopolimeri di polipropilene glicole, copolimeri polipropilene ossido/etilenossido, polioli poliossietilati (per esempio, glicerolo), alcool polivinilico e loro miscele. La propionaldeide di polietilenglicole può avere vantaggi nella produzione a causa della sua stabilità nell'acqua. Il polimero può essere di qualsiasi peso molecolare, e può essere ramificato o non ramificato. Il numero di polimeri attaccati all'anticorpo può variare, e se più di un polimero è attaccato, possono essere le stesse o diverse molecole. In generale, il numero e/o il tipo di polimeri utilizzati per la derivatizzazione possono essere determinati in base a considerazioni che includono, a titolo non limitativo, le proprietà o le funzioni particolari

dell'anticorpo da migliorare, se il derivato anticorpale verrà utilizzato in una terapia in condizioni definite, eccetera. Tali tecniche e altre appropriate formulazioni sono descritte in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

D. Formulazioni farmaceutiche

Le formulazioni terapeutiche vengono preparate per l'immagazzinamento mescolando il principio attivo avente il grado di purezza desiderato con i carrier, gli eccipienti o gli stabilizzatori facoltativi farmaceuticamente accettabili (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, PA 2000). I carrier, gli eccipienti o gli stabilizzatori accettabili non sono tossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati, e includono tamponi, antiossidanti tra cui acido ascorbico, metionina, vitamina E, metabisolfito di sodio; conservanti, isotonicizzanti, stabilizzatori, complessi metallici (per esempio complessi Zn-proteina); agenti chelanti quali EDTA e/o tensioattivi non ionici.

Quando l'agente terapeutico è un frammento anticorpale, è preferibile il più piccolo frammento inibitore che si lega specificamente al dominio di legame della proteina bersaglio. Per esempio, sulla base delle sequenze di regione variabile di un anticorpo, possono essere progettati frammenti anticorpali o addirittura molecole peptidiche che mantengono la capacità di legare la sequenza della proteina bersaglio. Tali peptidi possono essere sintetizzati chimicamente e/o prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante (vedere, per esempio, Marasco et al., Proc. Natl Acad Sci USA 90: 7889-7893 [1993]).

I tamponi sono usati per controllare il pH in un campo di variazione che ottimizza l'efficacia terapeutica, soprattutto se la stabilità è dipendente dal pH. I tamponi sono preferibilmente presenti in concentrazioni che spaziano da circa 50 mM a circa 250 mM. Adatti agenti tamponanti per l'uso con la presente invenzione comprendono sia gli acidi organici sia inorganici sia i loro sali. Per esempio, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, ossalato, lattato, acetato. Inoltre, i tamponi possono essere costituiti da sali di istidina e trimetilammina come Tris.

Sono stati aggiunti conservanti per ritardare la crescita microbica, e sono tipicamente presenti in un campo di variazione da 0,2% a 1,0% (p/v). I conservanti adatti per l'impiego con la presente invenzione includono l'ottadecildimetilbenzil ammonio cloruro; cloruro di esametonio; alogenuri di benzalconio (per esempio, cloruro, bromuro, ioduro), cloruro di benzetonio; timerosal, fenolo, butile o alcool benzilico; alchil parabeni come metil o propil parabene; latercolo; resorcinolo; Cicloesanololo, 3-pentanololo e m-cresolo.

Agenti di tonicità, talvolta noti come "stabilizzatori", sono presenti per regolare o mantenere la tonicità del liquido in una

composizione. Quando vengono utilizzati con grandi biomolecole cariche come le proteine e gli anticorpi, sono spesso definiti "stabilizzatori" perché possono interagire con i gruppi carichi delle catene laterali degli amminoacidi, riducendo in tal modo il potenziale di interazioni inter- e intra-molecolari. Gli agenti di tonicità possono essere presenti in qualsiasi quantità compreso tra 0,1% e 25% in peso, preferibilmente da 1 a 5%, tenendo conto delle quantità relative degli altri ingredienti. Gli agenti di tonicità preferiti comprendono alcoli di zuccheri poliidrici, preferibilmente alcoli di zuccheri triidrici o superiori, come glicerina, eritritolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo e mannitolo.

Gli eccipienti aggiuntivi comprendono agenti che possono servire come uno o più dei seguenti: (1) agenti che conferiscono massa, (2) potenziatori di solubilità, (3) stabilizzatori e (4) agenti che impediscono la denaturazione o l'aderenza alla parete del contenitore. Tali eccipienti comprendono: alcoli di zuccheri poliidrici (elencati sopra); amminoacidi come alanina, glicina, glutammina, asparagina, istidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, acido glutammico, treonina, eccetera; zuccheri organici o alcoli di zucchero quali saccarosio, lattosio, lattitolo, trealosio, stachioso, mannosio, sorbosio, xilosio, ribosio, ribitolo, mioinositolo, mioinositolo, galattosio, galattitolo, glicerolo, ciclitoli (ad esempio inositol), polietilene glicole; agenti riducenti contenenti zolfo, come urea, glutatione, acido tiotico, tioglicolato di sodio, tioglicerolo, α -monotioglicerolo e sodio tio solfato; proteine a basso peso molecolare come siero albumina umana, siero albumina bovina, gelatina o altre immunoglobuline; polimeri idrofilici come il polivinilpirrolidone; monosaccaridi (ad esempio, xilosio, mannosio, fruttosio, glucosio, disaccaridi (ad esempio, lattosio, maltosio, saccarosio), trisaccaridi come raffinosa e polisaccaridi come destrina o destrano.

Tensioattivi o detergenti non ionici (noti anche come "agenti bagnanti") sono presenti per aiutare a solubilizzare l'agente terapeutico, nonché a proteggere la proteina terapeutica dall'aggregazione indotta dall'agitazione, che consente anche alla formulazione di essere esposta a stress di superficie da taglio senza causare la denaturazione della proteina terapeutica attiva o dell'anticorpo. Tensioattivi non ionici sono presenti in un campo di variazione da circa 0,05 mg/ml a circa 1,0 mg/ml, preferibilmente da circa 0,07 mg/ml a circa 0,2 mg/ml.

Tensioattivi non ionici adatti includono polisorbati (20, 40, 60, 65, 80, eccetera), poliossameri (184, 188, eccetera), Polioili PLURONIC®, TRITON®, poliossietilene sorbitano monoeteri (TWEEN®-20, TWEEN® -80, eccetera), lauramacrogolo 400, poliossido 40 stearato, olio di ricino idrogenato poliossietilene 10, 50 e 60, glicerolo monostearato, estere di acido grasso di saccarosio, metilcellulosa e carbossimetilcellulosa. Detergenti anionici che possono essere utilizzati includono lauril solfato di sodio, diottile di sodio solfosuccinato e diottile di sodio solfonato. I detergenti cationici includono benzalconio cloruro o cloruro di benzetonio.

Affinché le formulazioni siano usate per la somministrazione *in vivo*, devono essere sterili. La formulazione può essere resa sterile per filtrazione mediante membrane di filtrazione sterili. Le composizioni terapeutiche qui in genere vengono collocate in un contenitore avente una

porta di accesso sterile, ad esempio una borsa per soluzione endovenosa o flaconcino avente un tappo perforabile mediante un ago per iniezione ipodermica.

La via di somministrazione è in conformità con procedimenti noti e accettati, come mediante bolo singolo o multiplo o infusione per un lungo periodo di tempo in modo appropriato, ad esempio iniezione o infusione per le vie sottocutanea, endovenosa, intraperitoneale, intramuscolare, intraarteriale, intralesionale o intraarticolare, somministrazione topica, inalazione o mediante mezzi a rilascio prolungato o a rilascio esteso.

La formulazione in questo caso può anche contenere più composti attivi necessari per la particolare indicazione trattata, preferibilmente quelli con attività complementari che non influenzano negativamente l'altra. In alternativa o in aggiunta, la composizione può comprendere un agente citotossico, citochina o agente inibitore della crescita. Tali molecole sono opportunamente presenti in combinazione in quantità che sono efficaci per lo scopo previsto.

Gli ingredienti attivi possono anche essere intrappolati in microcapsule preparate, ad esempio, mediante tecniche di coacervazione o mediante polimerizzazione interfacciale, ad esempio microcapsule di idrossimetilcellulosa o gelatina e microcapsule di poli-(metilmetacrilato), rispettivamente, in sistemi di distribuzione di farmaci colloidali (ad esempio, liposomi, microsfele di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule) o in macroemulsioni. Tali tecniche sono descritte in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edizione, supra.

La stabilità delle proteine e degli anticorpi qui descritti può essere potenziata attraverso l'uso di "sali metallici polivalenti idro-solubili" non tossici. Esempi includono Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} e Al^{3+} . Anioni di esempio che possono formare sali solubili in acqua con i suddetti cationi polivalenti metallici includono quelli formati da acidi inorganici e/o acidi organici. Tali sali solubili in acqua hanno una solubilità in acqua (a 20° C) di almeno circa 20 mg/ml, alternativamente almeno di circa 100 mg/ml, alternativamente almeno di circa 200 mg/ml.

Acidi inorganici adatti che possono essere utilizzati per formare "sali metallici polivalenti solubili in acqua" includono acido cloridrico, acetico, solforico, nitrico, tiocianico e fosforico. Acidi organici adatti che possono essere usati includono acido carbossilico alifatico e acidi aromatici. Gli acidi alifatici in questa definizione possono essere definiti come acidi carbossilici C_{2-9} saturi o insaturi (ad esempio, acidi alifatici mono-, di- e tri-carbossilici). Ad esempio, gli acidi monocarbossilici esemplificativi di questa definizione comprendono gli acidi monocarbossilici saturi C_{2-9} acetico, propionico, butirrico, valerico, caproico, enantico, caprilico pelargonico e caprionico, e gli acidi monocarbossilici C_{2-9} insaturi acrilico, propriolico metacrilico, crotonico ed isocrotonico. Gli acidi dicarbossilici esemplificativi comprendono gli acidi dicarbossilici saturi C_{2-9} malonico, succinico, glutarico, adipico e pimelico, mentre gli acidi dicarbossilici C_{2-9} insaturi includono acidi maleico, fumarico, citraconico e mesaconico. Gli acidi tricarbossilici esemplificativi includono gli acidi tricarbossilici saturi C_{2-9} tricarballylico e 1,2,3-butantricarbossilico. Inoltre,

gli acidi carbossilici di questa definizione possono anche contenere uno o due gruppi idrossilici per formare acidi idrossicarbossilici. Gli acidi idrossicarbossilici esemplificativi includono acido glicolico, lattico, glicerico, tartronico, malico, tartarico e citrico. Gli acidi aromatici in questa definizione includono l'acido benzoico e l'acido salicilico.

Sali metallici polivalenti solubili in acqua comunemente impiegati che possono essere utilizzati per aiutare a stabilizzare i polipeptidi incapsulati di questa invenzione includono, ad esempio: (1) sali metallici di acido inorganico di alogenuri (ad esempio, cloruro di zinco, cloruro di calcio), solfati, nitrati, fosfati e tiocianati; (2) i sali metallici di acido carbossilico alifatico (ad esempio acetato di calcio, acetato di zinco, propionato di calcio, glicolato di zinco, lattato di calcio, lattato di zinco e tartrato di zinco); e (3) i sali metallici di acido carbossilico aromatico di benzoati (ad esempio, zinco benzoato) e salicilati.

E. Procedimenti di trattamento:

Per la prevenzione o il trattamento della malattia, il dosaggio appropriato di un agente attivo dipenderà dal tipo di malattia da trattare, come sopra definito, dalla gravità e dal decorso della malattia, se l'agente viene somministrato per scopi preventivi o terapeutici, la precedente terapia, la storia clinica del paziente e la risposta all'agente, e la discrezione del medico curante. L'agente è appropriatamente somministrato al paziente in una sola volta o in una serie di trattamenti.

L'invenzione riguarda anche la costimolazione risultante dall'attenuazione del segnale attraverso PD-1, specificamente mediante l'applicazione di anticorpi PD-L1 che impediscono il legame con PD-1 e/o B7.1, nonché il trattamento terapeutico di disturbi disfunzionali dei linfociti T.

1. Infezioni

PD-1 e i suoi ligandi ("PD-1:PD-L") ha un ruolo importante nella regolazione delle difese immunitarie contro patogeni che provocano infezioni acute e croniche. La segnalazione PD-1:PD-L ha un ruolo chiave nella regolazione dell'equilibrio tra una difesa immunitaria antimicrobica efficace e un danno tissutale mediato dal sistema immunitario. Ad esempio, mentre i topi knock-out PD-1 cancellano l'infezione da adenovirus più rapidamente rispetto alle loro controparti wild-type, sviluppano lesioni epatocellulari più gravi. Iwai et al., J. Exp. Med. 198: 39-50 (2003). In un modello di topo della cheratite stromale dell'herpes, il bloccaggio dell'anticorpo anti-PD-L1 ha aumentato la cheratite, aumentando l'espansione delle cellule CD4 T effettrici specifiche per HSV-1 e la produzione di IFN- γ e la sopravvivenza. Jun et al., FEBS Lett. 579: 6259-64 (2005).

I microrganismi che causano infezione cronica hanno sfruttato il percorso di segnalazione PD-1:PD-L per eludere le risposte immunitarie dell'ospite che provocano infezioni croniche. I virus che causano infezioni croniche possono rendere i linfociti T virus-specifici non

funzionali e quindi silenziano la risposta antivirale dei linfociti T. Barber et al., *Nature* 439: 682-87 (2006); Wherry et al., *J. Virol.* 78: 5535-45 (2004). L'esaurimento dei linfociti T o dell'anergia, dei linfociti T CD8⁺ è un motivo importante per un controllo virale inefficace durante le infezioni croniche ed è caratteristico delle infezioni croniche LCMV nei topi e dell'infezione da HIV, HBV, HCV e HTLV negli esseri umani e dell'infezione SIV nei primati. Sembra che ci sia una perdita gerarchica e progressiva della funzione all'interno del fenotipo di linfociti T CD8⁺ virus-specifiche esauste, con la citotossicità e la produzione di IL-2 perse per prime, seguite dalla produzione di citochine effettrici.

PD-1 è sovraregolato al momento dell'attivazione, e l'espressione è mantenuta ad un livello elevato dai linfociti T CD8⁺ esauriti nei topi con infezione cronica LCMV. Barber et al., *Supra*. La somministrazione di anticorpi che hanno bloccato il legame PD-1: PD-L1 ha determinato una potenziata risposta dei linfociti T e una sostanziale riduzione del carico virale. Nei topi infatti in maniera persistente con inefficace risposta di T_H CD4⁺, il blocco di PD-1: PD-L1 ha ripristinato le cellule CD8⁺ T da uno stato disfunzionale determinando proliferazione, secrezione di citochine, uccisione di cellule infette e ridotto carico virale, suggerendo fortemente un approccio terapeutico per il trattamento delle infezioni virali croniche.

Come risultato del ruolo di PD-1:PD-L in LCMV, è stato dimostrato un forte interesse nell'indirizzare questo percorso verso il trattamento dell'infezione cronica negli esseri umani. L'espressione PD-1 è alta sugli specifici dell'HIV (Petrovas et al., *J. Exp. Med.* 203: 2281-92 (2006); Day et al., *Nature* 443: 350-54 (2006); Traumann et al., *Nat. Med.* 12: 1198-202 (2006)), HBV specifici [Boettler et al., *J. Virol.* 80: 3532-40 (2006); Boni et al., *J. Virol.* 81: 4215-25 (2007)] e linfociti T specifici di HCV (Urbani et al., *J. Virol.* 80: 11398-403 (2006)). PD-L1 è anche sovraregolata su monociti CD14⁺ del sangue periferico e DC mieloidi in pazienti con infezione cronica da HBV [Chen et al., *J. Immunol.* 178: 6634-41 (2007); Geng et al., *J. Viral Hepat.* 13: 725-33 (2006)] e sulle cellule CD14⁺ e i linfociti T nei pazienti HIV (Trabattoni et al., *Blood* 101: 2514-20 (2003)). Bloccare le interazioni di PD-1:PD-L1 in vitro inverte l'esaurimento dei linfociti T CD8⁺ e CD4⁺ HIV-specifici, HBV-specifici, HCV-specifici e SIV-specifici e ripristina la proliferazione e la produzione di citochine. Petrovas et al., *J. Exp. Med.* 203: 2281-92 (2006); Day et al., *Supra*; Trautmann et al., *Supra*; Boni et al., *Supra*; Urbani et al., *Supra*; Velu et al., *J. Virol.* 81: 5819-28 (2007).

Il grado dell'espressione di PD-1 può anche essere un utile marcatore diagnostico sui linfociti T CD8⁺ virus-specifici per indicare il grado di esaurimento dei linfociti T e la gravità della malattia. Il livello di espressione di PD-1 sui linfociti T CD8⁺ HIV-specifici è correlato con il carico virale, i conteggi in diminuzione di CD4⁺, e la diminuita capacità dei linfociti T CD8⁺ di proliferare in risposta all'antigene HIV *in vitro*. Corrispondente alle osservazioni *in vivo*, esiste una correlazione diretta tra l'espressione di PD-1 sui linfociti T CD4⁺ e il carico virale. D'Souza et al., *J. Immunol.* 179: 1979-87 (2007). I non-progressori a lungo termine dispongono di linfociti T CD8⁺ di memoria HIV-specifici con espressione

di PD-1 notevolmente più bassa, in contrasto con i tipici progressori che esprimono PD-1 significativamente sovraregolato, che si correla al numero ridotto di linfociti T CD4+, al numero diminuito di linfociti T CD4+, alla diminuita funzione dei linfociti T CD8+ di memoria effettrice HIV-specifici, e all'elevato carico virale nel plasma. Zhang et al., *Blood* 109: 4671-78 (2007).

Il percorso PD-1: PD-L è stato implicato anche nella cronicità delle infezioni batteriche. *Helicobacter pylori* provoca gastrite cronica e ulcere gastroduodenali ed è un fattore di rischio per lo sviluppo del cancro gastrico. Durante un'infezione da *H. pylori*, le risposte dei linfociti T sono insufficienti a eliminare l'infezione, portando ad infezioni persistenti. Dopo l'esposizione a *H. pylori in vitro* o *in vivo*, PD-L1 è sovraregolato su cellule epiteliali gastriche. Le cellule epiteliali gastriche esprimono molecole di classe II di MHC e si pensa che abbiano un'importante funzione di APC durante l'infezione da *H. pylori*. Gli anticorpi anti-PD-L1 che bloccano l'interazione da PD-1 a PD-L1 potenziano la proliferazione dei linfociti T e la produzione di IL-2 in colture di cellule epiteliali gastriche esposte a *H. pylori* e ai linfociti T CD4. Il blocco di PD-L1 con entrambi gli anticorpi o siRNA ha impedito la generazione dei linfociti T regolatori, suggerendo che PD-L1 possa promuovere la soppressione dei linfociti T e persistere nelle infezioni controllando la dinamica tra i linfociti T regolatori ed effettori durante l'infezione da *H. pylori*. Beswick et al., *Infect. Immun.* 75: 4334-41 (2007).

I vermi parassiti hanno anche sfruttato il percorso PD-1: PD-L1 per indurre i macrofagi che sopprimono la risposta immunitaria. Durante le infezioni da *Taenia crassiceps* (vale a dire, tenia) nei topi, PD-1 e PD-L2 sono sovraregolati su macrofagi attivati, e i linfociti T CD4+ esprimono PD-1. Il blocco di PD-1, PD-L1 o PD-L2 ha significativamente diminuito la soppressione della proliferazione cellulare in vitro da macrofagi da topi infetti con tenia. Terrazas et al., *Int. J. Parasitol.* 35: 1349-58 (2005). Durante l'infezione da *Schistosoma mansoni* nei topi, i macrofagi esprimono livelli elevati di PD-L1 e livelli più modesti di PD-L2. L'anti-PD-L1 ha rimosso la capacità di questi macrofagi di sopprimere la proliferazione dei linfociti T in vitro, mentre l'anti-PD-L2 non ha avuto alcun effetto. L'espressione di PD-L1 sui macrofagi da topi infetti declina dopo 12 settimane di infezione, correlandosi con una rottura nell'anergia cellulare T. Smith et al., *J. Immunol.* 173: 1240-48 (2004).

2. Immunità tumorale

L'evidenza empirica per l'immunità tumorale include (i) l'osservazione di remissione spontanea, (ii) la presenza di risposta immunitaria dell'ospite al tumore rivelabile ma inefficace, (iii) l'aumentata prevalenza di malignità primarie e secondarie in pazienti immunodeficienti, (iv) la rivelazione di aumentati livelli di anticorpi e linfociti T in pazienti con tumore, e (v) l'osservazione che gli animali in esame possono essere immunizzati contro vari tipi di tumore.

Gli studi hanno dimostrato che la maggior parte dei tumori umani esprimono antigeni associati a tumori (TAA) che possono essere

riconosciuti dai linfociti T e quindi sono potenzialmente in grado di indurre una risposta immunitaria. Boon et al., Immunol. Oggi 16: 334-336 (1995). Le sperimentazioni cliniche in fase iniziale sono state avviate tramite la vaccinazione di pazienti affetti da tumore con TAA o cellule che presentano l'antigene professionali pulsate con TAA. Dudley et al., Science 298: 850-854 (2002); Gajewski et al., Clin. Cancer Res. 7: 895s-901s (2001); Marincola et al., Adv. Immunol. 74, 181-273 (2000); Peterson et al., J. Clin. Oncol. 21: 2342-2348 (2003). In molti di questi studi è stata ottenuta l'induzione di linfociti T CD8+ specifici di antigeni tumorali. Mackensen et al., Eur. Cytokine Netw 10: 329-336 (1999); Peterson et al., Supra. È stato perseguito anche il trasferimento adottivo di linfociti T specifici di antigeni tumorali nei pazienti e ha rivelato l'individuazione dei linfociti T citotossici espansi (CTL) nei siti tumorali. Meidenbauer et al., J. Immunol. 170, 2161-2169 (2003). Tuttavia, nonostante l'infiltrazione tumorale di cellule effettrici immunitarie, la crescita tumorale è stata raramente controllata.

È ben accertato che il microambiente del tumore può proteggere le cellule tumorali dalla distruzione immunitaria. Ganss et al., Cancer Res. 58: 4673-4681 (1998); Singh et al., J. Exp. Med. 175: 139-146 (1992). È risultato che i fattori solubili, così come le molecole legate alla membrana tra cui il fattore di crescita trasformante β (TGF- β), l'interleuchina (IL) -10, prostaglandina E₂, FASL, i ligandi CTLA-4, il ligando che induce apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale (TRAIL), e il ligando 1 del recettore della morte programmata (PD-L1, anche detto B7-H1) sono espressi da tumori e si crede che medino l'evasione immunitaria. Pertanto, il blocco di questi segnali di immunoregolazione negativa sulle cellule tumorali è un approccio promettente per potenziare l'immunità tumorale-specifica dei linfociti T CD8+ *in vivo*.

L'espressione di PD-L1 su molti tumori è un componente di questa soppressione e può agire in concerto con altri segnali immunosoppressivi. PD-L1 regola negativamente la segnalazione del recettore dei linfociti T. L'espressione di PD-L1 è stata dimostrata in situ su un'ampia varietà di tumori solidi, compresi tumori mammari, polmonari, al colon, ovarici, melanoma, vescica, fegato, salivare, stomaco, gliomi, tiroide, timico, epiteliale, della testa e del collo. Brown et al., J. Immunol. 170: 1257-66 (2003); Dong et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Hamanishi et al., PNAS 104: 3360-65 (2007); Strome et al., Cancer Res. 63, 6501-5 (2003); Inman et al., Cancer 109: 1499-505 (2007); Konishi et al., Clin. Cancer Res. 10: 5094-100 (2004); Nakanishi et al., Cancer Immunol. Immunother. 56, 1173-82 (2007); Nomi et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-57 (2004); Thompson et al., PNAS 101: 17174-79 (2004); Wu et al., Acta Histochem. 108: 19-24 (2006).

La colorazione immunologica rivela anche l'espressione dell'espressione di PD-1: PD-L su vari cancri.

È interessante notare che il cancro è stato anche caratterizzato come una malattia infiammatoria cronica. Coussens et al., Nature 420: 860-867 (2002). Mentre fino al 15% dei tumori in tutto il mondo hanno una origine infettiva diretta [Kuper et al., J. Intern. Med. 248: 171-183 (2000)], molti tumori umani sono correlati all'irritazione cronica e all'infiammazione. Zou et al., Ntu. Rev. Cancer 5: 263-274 (2005).

Gli studi relativi all'espressione di PD-L1 sui tumori all'esito della malattia mostrano che l'espressione di PD-L1 è fortemente correlata con la prognosi sfavorevole nei tumori renali, ovarici, vescicali, del seno, gastrico e pancreatico, ma forse non del cancro polmonare a piccole cellule. Hamanishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3360-65 (2007), Inman et al., Cancer 109: 1499-505 (2007), Konishi et al., Clin. Cancer Res. 10: 5094-100 (2004); Nakanishi ed altri, Cancer Immunol. Immunother. 56, 1173-82 (2007); Nomi et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-57 (2007); Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 17174-79 (2004); Wu ed altri, Acta Histochem. 108: 19-24 (2006). Inoltre, questi studi suggeriscono che livelli più elevati di espressione di PD-L1 sui tumori possono facilitare l'avanzamento dello stadio tumorale e l'invasione in strutture tissutali più profonde.

Il percorso PD-1:PD-L può anche svolgere un ruolo nelle malattie ematologiche maligne. PD-1 o PD-L1 sono raramente espresse in malignità delle cellule B, ma PD-L2 è sovraespresso nelle malignità delle cellule del mantello. Brown ed altri, supra; Rosenwald ed altri, J. Exp. Med. 198: 851-62 (2003). PD-L1 è espresso in cellule multiple del mieloma, ma non sulle cellule normali del plasma. L'espansione dei linfociti T in risposta alle cellule del mieloma è potenziata in vitro dal blocco di PD-L1. Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007). PD-L1 è espresso su alcuni linfomi primari di linfociti T, in particolare linfomi a linfociti T a grandi cellule anaplastiche, e PD-L1 viene espresso sulla rete di cellule dendritiche follicolari associata. Dorfman ed altri, Am. J. Surg. Pathol. 30: 802-10 (2006). L'analisi di microarray suggerisce inoltre che i linfociti T associati a tumori rispondono ai segnali di PD-1 *in situ* nel linfoma Hodgkin. Chemnitz ed altri, Blood 110: 3226-33 (2007). PD-1 e PD-L1 sono espressi su linfociti T CD4⁺ in leucemia e linfoma dei linfociti T adulti mediati da HTLV-1. Shimauchi et al., Int. J. Cancer 121: 2585-90 (2007). Queste cellule tumorali sono iporesponsive ai segnali TCR, e il blocco di PD-1 aumenta la loro espressione di TNF- α , ma non IFN- γ . Gli studi su modelli animali dimostrano che l'espressione di PD-L1 sui tumori inibisce l'attivazione dei linfociti T e la lisi delle cellule tumorali e in alcuni casi porta ad una aumentata morte dei linfociti T specifica del tumore. Dong et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2006); Hirano ed altri, Cancer Res. 65: 1089-96 (2005).

Così, la soppressione della segnalazione tramite PD-L1 con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione, in modo da potenziare la funzionalità dei linfociti T, mostra la promessa di attenuare l'immunità tumorale, e di conseguenza, può essere un trattamento efficace per il cancro.

F. Terapie di combinazione

Il procedimento descritto qui può essere combinato con procedimenti noti di trattamento di infezioni croniche o del cancro, o come fasi di trattamento combinate o addizionali o come componenti addizionali di una formulazione terapeutica.

1. Cancro:Potenziare la funzione immunitaria dell'ospite per combattere i tumori è oggetto di un crescente interesse. Metodiche

convenzionali includono (i) potenziamento di APC, come (a) l'iniezione nel tumore di DNA che codifica gli alloantigeni MHC estranei, o (b) la trasfezione delle cellule tumorali da biopsie con geni che aumentano la probabilità di riconoscimento dell'antigene immunitario (per esempio citochine immunostimolanti, GM-CSF, molecole co-stimolanti B7.1, B7.2) del tumore, (iii) immunoterapia cellulare adottiva, o trattamento con linfociti T attivati tumore-specifici. L'immunoterapia cellulare adottiva comprende l'isolamento dei linfociti T dell'ospite che infiltrano il tumore, espandendo la popolazione in vitro, come tramite la stimolazione mediante IL-2 o il tumore o entrambi. Inoltre, i linfociti T isolati che sono disfunzionali possono essere attivate anche mediante applicazione *in vitro* degli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione. I linfociti T che sono così attivati possono essere quindi risomministrati all'ospite.

Le terapie tradizionali per il cancro includono le seguenti: (i) *la terapia con radiazioni* (per esempio radioterapia, terapia con raggi X, irradiazione) o l'utilizzo di radiazioni ionizzanti per uccidere le cellule tumorali e ridurre i tumori. La radioterapia può essere somministrata esternamente tramite radioterapia a raggi esterni (EBRT) o internamente tramite brachiterapia; (ii) *la chemioterapia*, o l'applicazione di un farmaco citotossico che generalmente influenza rapidamente le cellule che si dividono; (iii) *terapie mirate*, o agenti che specificamente colpiscono le proteine deregolate delle cellule tumorali (ad esempio, inibitori della tirosina-chinasi imatinib, gefitinib, anticorpi monoclonali, terapia fotodinamica); (iv) *immunoterapia*, o potenziamento della risposta immunitaria dell'ospite (per esempio vaccino); (v) *terapia ormonale*, o blocco dell'ormone (per esempio quando il tumore è sensibile all'ormone), (vi) *inibitore dell'angiogenesi*, o blocco della formazione e della crescita dei vasi sanguigni, e (vii) *cure palliative*, o trattamento diretto a migliorare la qualità di cura per ridurre il dolore, la nausea, il vomito, la diarrea e l'emorragia. Medicinali per il dolore come la morfina e l'ossicodone, antiemetici come ondansetron e aprepitant, possono consentire regimi di trattamento più aggressivi.

Nel trattamento del cancro, qualsiasi dei trattamenti convenzionali precedentemente descritti per il trattamento dell'immunità del cancro può essere condotto prima, successivamente o simultaneamente con la somministrazione degli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione. Inoltre, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere somministrati prima, successivamente o simultaneamente con i trattamenti per il cancro convenzionali, come la somministrazione di anticorpi leganti il tumore (ad esempio, anticorpi monoclonali, anticorpi monoclonali coniugati a tossine) e/o la somministrazione di agenti chemioterapici.

2. Infezione:

Nel trattamento dell'infezione (ad esempio, acuta e/o cronica), la somministrazione degli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione può essere combinata con trattamenti convenzionali in aggiunta o in sostituzione di stimolazioni della difesa immunitaria dell'ospite naturale per

l'infezione. Le difese immunitarie naturali dell'ospite per l'infezione includono, ma non sono limitate a infiammazione, febbre, difesa dell'ospite mediata da anticorpi, difesa dell'ospite mediate da linfociti T, incluse la secrezione di linfocine e i linfociti T citotossici (in particolare durante l'infezione virale), lisi e opsonizzazione mediate dal complemento (fagocitosi facilitata), e fagocitosi. La capacità degli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione di riattivare i linfociti T disfunzionali sarebbe particolarmente utile per il trattamento di infezioni croniche, in particolare quelle in cui l'immunità mediata da cellule è critica per il recupero completo.

a. batteri

Per le infezioni derivanti da un'infezione batterica, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati mediante somministrazione simultanea con precedenti o successive terapie standard per il trattamento dell'infezione batterica. Le infezioni batteriche sono oggi più comunemente trattate con antibiotici antibatterici, ma anche il siero contenente anticorpi specifici per i patogeni da ospiti immunizzati può essere efficace.

I batteri patogeni a seguito della secrezione di tossine (batteri toxogenici), la vaccinazione con tossina inattiva e/o la somministrazione di agenti terapeutici che bloccano la tossicità delle tossine sono solitamente efficaci (ad esempio, siero policlonale, anticorpi, antibiotici, eccetera). Questi organismi includono *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* I batteri Gram negativi che inoltre tipicamente rispondono a tali terapie tradizionali includono Enterobatteri (per esempio *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia*), *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*. I batteri incapsulati, che sono resistenti alla fagocitosi e all'opsonizzazione, e quindi spesso impediscono una stimolazione più significativa per la clearance immunitaria includono: *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Neisseria spp.*, *Klebsiella spp.* e *Bacterioides fragillis*.

I batteri che evadono le difese dell'ospite invadendo le cellule in modo da eludere l'anticorpo e il complemento serico rappresentano una sfida particolare. La clearance di queste infezioni è quasi interamente dipendente dall'immunità mediata dai linfociti T, e sono particolarmente inclini a diventare infezioni croniche. Esempi specifici includono *Salmonella* (*S. typhi*, *S. coleraesuis*, *S. enteritidis*), *Legionella spp.*, *Listeria spp.*, *Brucella spp.* e *Mycobacterium*, tra cui *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. leprae*.

Le spirochete, tra cui *Treponema spp.*, *Borrelia spp.* e *Leptospira spp.* sono batteri che causano infezioni persistenti e latenti. *Treponema palladium*, il patogeno causante la malattia sifilide è una malattia sessualmente trasmessa che può avere gravi conseguenze patologiche se non trattata. La malattia progredisce attraverso fasi distinte. Lo stadio clinico iniziale è un'ulcera o una lesione nel sito di inoculazione treponemale. A seguito di questo c'è un periodo di spirochetemia e distribuzione metastatica di microrganismi che continua, inclusi cicli ripetuti di

infezione e risoluzione in una condizione nota come sifilide secondaria. A seguito della risoluzione della sifilide secondaria, la malattia entra in un periodo di latenza asintomatico che può concludersi nella sifilide terziaria, che è una condizione grave e spesso fatale. La sifilide terziaria può manifestarsi in (i) cuore come aortite con formazione di aneurismi e insufficienza aortica secondaria, (ii) sistema nervoso centrale (tabes dorsalis, paresi generale), (iii) occhi (cheratite interstiziale) o (iv) orecchie (sordità nervosa). Le forme non veneree assomigliano alle manifestazioni cliniche delle forme veneree, ma vengono trasmesse principalmente per contatto diretto e scarsa igiene. Esse comprendono yaws (*T. pallidum* subsp. *Pertenue*), pinta (*T. carateum*) e bejel (*T. pallidum* subsp. *Endemicum*).

I trattamenti per la sifilide includono penicillina (ad esempio, penicillina G.), tetraciclina, doxiciclina, ceftriaxone e azitromicina. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione sarebbero somministrati assai vantaggiosamente per trattare il periodo di infezione latente.

La malattia di Lyme, causata da *Borrelia burgdorferi*, viene trasmessa nell'uomo attraverso punture di zecca. La malattia si manifesta inizialmente come eruzione localizzata, seguita da sintomi simil-influenzali, tra cui malessere, febbre, mal di testa, collo rigido e artralgie. Le manifestazioni successive possono includere artriti migratorie e poliarticolari, coinvolgimento neurologico e cardiaco con paralisi dei nervi cranici e radiculopatie, miocardite e aritmie. Alcuni casi di malattia di Lyme diventano persistenti, causando danni irreversibili analoghi alla sifilide terziaria.

La terapia attuale per la malattia di Lyme comprende principalmente la somministrazione di antibiotici. I ceppi resistenti agli antibiotici possono essere trattati con idrossiclorochina o metotrexato. I pazienti refrattari agli antibiotici con dolore neuropatico possono essere trattati con gabapentin. Minociclina può essere utile nella malattia Lyme tardiva/cronica con manifestazioni neurologiche o altre infiammatorie. Gli anticorpi anti-PD-L1 sarebbero somministrati nel modo più vantaggioso per trattare il periodo di infezione latente.

Altre forme di borreliosi, come quelle derivate da *B. recurrentis*, *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parikeri*, *B. hispanica*, *B. duttonii* e *B. persica*, nonché la leptospirosi (Es, *L. Interrogans*), in genere si risolvono spontaneamente a meno che i titoli ematici non raggiungano concentrazioni che causino ostruzione intraepatica.

b. virus

Per le infezioni derivanti da cause virali, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati mediante applicazione simultanea con, prima di o successivamente a applicazione di terapie standard per il trattamento delle infezioni virali. Tali terapie standard variano a seconda del tipo di virus, anche se in quasi tutti i casi, può essere efficace la somministrazione di siero umano contenente anticorpi (per esempio IgA, IgG) specifici per il virus.

1) *Influenza*

L'infezione da influenza provoca febbre, tosse, mialgia, mal di testa e malessere, che spesso si verificano in epidemie stagionali. L'influenza è associata anche ad una serie di disturbi postinfettivi, come l'encefalite, la miopericardite, la sindrome di Goodpasture, e la sindrome di Reye. L'infezione da influenza inoltre sopprime le normali difese antibatteriche polmonari, in modo che il recupero del paziente dall'influenza ha un rischio aumentato di sviluppare la polmonite batterica.

Le proteine della superficie virale dell'influenza mostrano una marcata alterazione antigenica, risultante dalla mutazione e dalla ricombinazione. Così, i linfociti T citolitici sono il veicolo primario dell'ospite per l'eliminazione del virus dopo l'infezione. L'influenza è classificata in tre tipi primari: A, B e C. L'influenza A è unica in quanto infesta sia gli esseri umani che molti altri animali (ad esempio, suini, cavalli, uccelli e foche) ed è la principale causa di influenza pandemica. Inoltre, quando una cellula è infetta da due diversi ceppi di influenza A, i genomi a RNA segmentati di due tipi di virus parentali si mescolano durante la replicazione per creare un replicante ibrido, con conseguenti nuovi ceppi epidemici. L'influenza B non si replica negli animali e quindi ha meno variazioni genetiche e l'influenza C ha solo un singolo sierotipo.

La maggior parte delle terapie convenzionali sono palliativi dei sintomi derivanti dall'infezione, mentre la risposta immunitaria dell'ospite effettivamente elimina la malattia. Tuttavia, alcuni ceppi (ad esempio, l'influenza A) possono causare malattie più gravi e morte. L'influenza A può essere trattata sia clinicamente che profilatticamente tramite la somministrazione di inibitori di ammine cicliche amantadina e rimantadina, che inibiscono la replicazione virale. Tuttavia, l'utilità clinica di questi farmaci è limitata a causa dell'incidenza relativamente elevata di reazioni avverse, del loro stretto spettro antivirale (solo l'influenza A) e della propensione del virus a diventare resistente. La somministrazione di anticorpi IgG del siero alle principali proteine della superficie dell'influenza, emoagglutinina e neuraminidasi possono prevenire l'infezione polmonare, mentre IgA mucosale è necessaria per prevenire l'infezione del tratto respiratorio superiore e della trachea. Il più efficace trattamento attuale per l'influenza è la vaccinazione con la somministrazione di virus inattivati con formalina o β -propiolattone.

2) *Virus del morbillo*

Dopo un'incubazione di 9-11 giorni, gli ospiti infettati dal virus del morbillo sviluppano febbre, tosse, corizza e congiuntivite. Entro 1-2 giorni, si sviluppa un'eruzione cutanea eritematosa, maculopapulare, che si diffonde rapidamente su tutto il corpo. Poiché l'infezione sopprime anche l'immunità cellulare, l'ospite ha maggiori rischi di sviluppo di superinfezioni batteriche, tra cui l'otite media, la polmonite e l'encefalomelite postinfettiva. L'infezione acuta è associata a una significativa morbilità e mortalità, in particolare negli adolescenti malnutriti.

Il trattamento per il morbillo comprende la somministrazione passiva di IgG umano aggregato, che può prevenire l'infezione nei soggetti non immuni, anche se somministrata fino a una settimana dopo l'esposizione. Tuttavia, la prima immunizzazione con virus vivo, attenuato

è il trattamento più efficace e previene la malattia in più del 95% di quelli immunizzati. Poiché c'è un sierotipo di questo virus, una sola immunizzazione o infezione tipicamente porta a protezione per la vita da una successiva infezione.

In una piccola percentuale di ospiti infetti, il morbillo può svilupparsi in SSPE, che è un disordine neurologico progressivo cronico causato da un'infezione persistente del sistema nervoso centrale. SSPE è causato da varianti clonali del virus del morbillo con difetti che interferiscono con l'assemblaggio e la gemmazione dei virioni. Per questi pazienti, la riattivazione dei linfociti T con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione in modo da facilitare la clearance virale sarebbe desiderabile.

3) *virus dell'epatite B*

Il virus dell'epatite B (HB-V) è il più noto patogeno infettivo trasmesso dal sangue. È una delle principali cause di epatite acuta e cronica e carcinoma epatico, nonché infezione cronica, per tutta la vita. Dopo l'infezione, il virus si replica negli epatociti, che anche allora diffondono l'antigene di superficie HBsAg. La rivelazione di livelli eccessivi di HBsAg nel siero viene utilizzata come procedimento standard per la diagnosi di una infezione da epatite B. Un'infezione acuta può risolversi o può svilupparsi in un'infezione persistente cronica.

I trattamenti correnti per l'HBV cronico includono l' α -interferone, che aumenta l'espressione dell'antigene dei leucociti umani di classe I (HLA) sulla superficie degli epatociti, agevolando così il loro riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici. Inoltre, gli analoghi nucleosidici ganciclovir, famciclovir e lamivudina hanno anche mostrato una certa efficacia nel trattamento dell'infezione da HBV nella sperimentazione clinica. Ulteriori trattamenti per HBV includono α -interferone pegilato, adenofovir, entecavir e telbivudina. Mentre l'immunità passiva può essere conferita attraverso la somministrazione parentale di anticorpi del siero anti-HBsAg, la vaccinazione con HBsAg inattivato o ricombinante conferisce anche resistenza all'infezione. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati con trattamenti convenzionali per le infezioni da epatite B per un vantaggio terapeutico.

4) *Virus dell'epatite C*

L'infezione da virus dell'epatite C (HC-V) può portare ad una forma cronica di epatite, con conseguente cirrosi. Mentre i sintomi sono simili a quelli causati da epatite B, in chiaro contrasto con HB-V, gli ospiti infetti possono essere asintomatici per 10-20 anni. Il trattamento per l'infezione da HCV comprende la somministrazione di una combinazione di α -interferone e ribavirina. Una potenziale terapia promettente per l'infezione da HC-V è l'inibitore della proteasi telaprevir (VX-960). Trattamenti aggiuntivi includono: anticorpi anti-PD-1 (MDX-1106, Medarex), bavituximab (un anticorpo che lega il fosfolipide anionico fosfatidilserina in modo dipendente da B2-glicoproteina, Peregrine Pharmaceuticals), anticorpi anti-proteina E2 dell'involucro virale HPV) (per esempio ATL 6865 - Ab68 + Ab65, XTL Pharmaceuticals) e Civacir® (immunoglobulina

umana anti-HCV policlonale). Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati con uno o più di questi trattamenti per le infezioni da epatite C per un vantaggio terapeutico.

Gli inibitori di proteasi, polimerasi e NS5A che possono essere utilizzati in combinazione con gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione per trattare specificamente l'infezione da epatite C includono quanto segue identificato nella Tabella B.

Tabella B

Inibitori di proteasi e polimerasi di Epatite C

Tipo di inibitore	Nome dell'inibitore	Produttore(i)
Proteasi	R7227/ITMN 191	Roche/InterMune
	CTS-1027	Roche Biosciences
	VX500, VX813, VX985	Vertex
	Telaprevir (VX950)	Vertex/Tibotec
	TMC435350/TMC 435	Medivir/Tibotec
	Boceprevir (SCH503034), Narlaprevir (SCH900518/SP900518)	Schering-Plough
	BI201335, BILN 2061	Boehringer Ingelheim
	MK7009	Merck
	IDX-136, IDX-316	Idenix
	BMS-790052, BMS-791325	Bristol Myers Squibb
	PHX-1766	Phenomix
	ACH-806	Achillion/Gilead
	ACH-1625	Achillion
	ABT-450	Abbott Labs
	VBY 376	Virobay
Inibitori di Polimerasi	R1626	Roche
	R7128	Roche/Pharmasset
	NM283	Idenix
	HCV796	Wyeth
	BILB 1941, BI-207127	Boehringer Ingelheim
	GL60667, GS9190	Gilead
	PF-00868554	Pfizer
	VCH757, VCH916	Virochem
	VX222, VX759	Vertex
	MK-3281	Merck
	ANA598	Anadys
	IDX184, IDX375	Idenix
	PSI-7851	Pharmasset
	ABT-072, ABT-333	Abbott Labs
	BMS650032	Bristol Myers Squibb
Inibitori di NS5A	BMS790052, BMX824393	Bristol Myers Squibb
	AZD 2836, AZD 7295	Arrow Therapeutics
	GSK 625433	Glaxo Smith Kline

5) *Virus immunodeficienza umana (HIV)*

L'HIV attacca le cellule CD4+, inclusi linfociti T, monociti-macrofagi, cellule follicolari dendritiche e cellule di Langerhan's, e le cellule CD4+ helper/induttori vengono impoverite. Di conseguenza, l'ospite acquista un grave difetto nell'immunità cellulo-mediata. L'infezione con

HIV provoca l'AIDS in almeno il 50% degli individui, e viene trasmessa tramite contatto sessuale, somministrazione di sangue o prodotti sanguigni infetti, inseminazione artificiale con sperma infetto, esposizione ad aghi o siringhe contenenti sangue e trasmissione da madre infetta a neonato durante il parto.

Un ospite infettato da HIV può essere asintomatico o può sviluppare una malattia acuta che somiglia a mononucleosi: febbre, mal di testa, mal di gola, malessere e eruzione cutanea. I sintomi possono progredire nella disfunzione immunitaria progressiva, inclusa la febbre persistente, la sudorazione notturna, la perdita di peso, la diarrea non spiegata, l'eczema, la psoriasi, la dermatite seborroica, l'herpes zoster, la candidiasi orale e leucoplachia pelosa orale. Infezioni opportunistiche da parte di parassiti sono comuni nei pazienti le cui infezioni si sviluppano in AIDS.

Trattamenti per l'HIV comprendono terapie antivirali che includono analoghi nucleosidici, zidovudina (AZT), da soli o in combinazione con didanosina o zalcitabina, didesossinosina, didesossicitidina, lamivudina, stavudina; inibitori della trascrizione inversa come delavirdina, nevirapina, loviride, e inibitori della proteasi come saquinavir, ritonavir, indinavir e nelfinavir. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati con trattamenti convenzionali per le infezioni da HIV per vantaggi terapeutici.

6) *citomegalovirus*

L'infezione da citomegalovirus (CMV) è spesso associata a infezioni persistenti, latenti e ricorrenti. CMV infetta e rimane latente nei monociti e nelle cellule progenitrici di granulociti-monociti. I sintomi clinici di CMV includono sintomi simili a mononucleosi (vale a dire febbre, ghiandole gonfie, malessere) e una tendenza a sviluppare eruzioni cutanee allergiche agli antibiotici. Il virus viene diffuso dal contatto diretto. Il virus viene versato nell'urina, nella saliva, nel seme e, in misura minore, in altri liquidi corporei. La trasmissione può anche avvenire da una madre infetta al feto o al neonato e mediante trasfusioni di sangue e trapianti di organi. L'infezione da CMV determina una disfunzione generale dell'immunità cellulare, caratterizzata da insufficienti reazioni blastogene a mitogeni non specifici e antigeni di CMV specifici, diminuita capacità citotossica ed elevazione del numero dei linfociti CD8 dei linfociti CD4+.

I trattamenti dell'infezione da CMV includono gli antivirali ganciclovir, foscarnet e cidovir, ma questi farmaci sono tipicamente prescritti solo in pazienti immunocompromessi. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati con trattamenti convenzionali per le infezioni da citomegalovirus per un vantaggio terapeutico.

7) *Virus Epstein-Barr*

Il virus di Epstein-Barr (EBV) può stabilire infezioni persistenti e latenti e soprattutto attacca le cellule B. L'infezione con EBV

comporta la condizione clinica della mononucleosi infettiva, che comprende febbre, mal di gola, spesso con essudato, linfadenopatia generalizzata e splenomegalia. È presente anche l'epatite, che può svilupparsi in ittero.

Mentre i trattamenti tipici per le infezioni da EBV sono palliativi dei sintomi, EBV è associato allo sviluppo di alcuni tumori quali il linfoma di Burkitt e il cancro nasofaringeo. Così, la clearance dell'infezione virale prima di queste complicanze risulterebbe di grande beneficio. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'infezione possono essere combinati con trattamenti convenzionali per le infezioni da virus Epstein-Barr per un vantaggio terapeutico.

8) *Virus Herpes*

Il virus Herpes simplex (HSV) viene trasmesso per contatto diretto con un ospite infetto. Un'infezione diretta può essere asintomatica, ma in genere provoca vesciche contenenti particelle infettive. La malattia si manifesta come cicli di periodi attivi di malattia, in cui le lesioni appaiono e scompaiono quando il virus latente infetta il ganglio nervoso per i successivi focolai. Lesioni possono essere sul viso, genitali, occhi e/o mani. In alcuni casi, un'infezione può anche causare encefalite.

I trattamenti per le infezioni da herpes sono principalmente diretti a risolvere i focolai sintomatici, e comprendono farmaci antivirali sistemici quali: aciclovir (per esempio Zovirax®), valaciclovir, famciclovir, penciclovir e farmaci topici come docosanol (Abreva®), tromantadina e zilactina. La clearance delle infezioni latenti di herpes sarebbe di grande beneficio clinico. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'infezione possono essere combinati con trattamenti convenzionali per le infezioni da herpes virus per vantaggio terapeutico.

9) *HTLV*

Il virus umano T-linfotropico (HTLV-1, HTLV-2) viene trasmesso tramite contatto sessuale, allattamento al seno o esposizione a sangue contaminato. Il virus attiva un sottogruppo di cellule T_H chiamate le cellule Th1, con conseguente sovrapproliferazione e sovrapproduzione di citochine correlate a Th1 (ad esempio, IFN- γ e TNF- α). Ciò a sua volta comporta una soppressione dei linfociti Th2 e riduzione della produzione di citochine Th2 (per esempio IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), causando una riduzione della capacità di un ospite infetto di montare un'adeguata risposta immunitaria verso organismi invasivi che richiedono una risposta dipendente da Th2 per la clearance (per esempio infezioni parassitarie, produzione di anticorpi mucosali e umorali).

Le infezioni da HTLV causano infezioni opportunistiche causando bronchiectasie, dermatiti e superinfezioni con *Staphylococcus spp.* e *Strongyloides spp.* causando la morte per sepsi polimicrobica. L'infezione da HTLV può anche portare direttamente alla leucemia/linfoma dei linfociti T adulti e alla malattia dei neuroni motori superiore demielinante progressiva, nota come HAM/TSP. La clearance delle infezioni latenti da

HTLV sarebbe di grande beneficio clinico. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati con trattamenti tradizionali per le infezioni da HTLV per un vantaggio terapeutico.

10) HPV

Il virus del papilloma umano (HPV) interessa prevalentemente i cheratinociti e si verifica in due forme: cutanee e genitali. La trasmissione si crede che si verifichi attraverso un contatto diretto e/o attività sessuale. L'infezione da HPV cutanea e genitale può causare verruche e infezioni latenti e talvolta infezioni ricorrenti controllate dall'immunità dell'ospite che controlla i sintomi e blocca la comparsa delle verruche, ma lascia l'ospite in grado di trasmettere l'infezione agli altri.

L'infezione con HPV può anche portare a determinati tumori, quali il cancro cervicale, anale, vulvare, penile e orofaringeo. Non ci sono cure conosciute per l'infezione da HPV, ma il trattamento attuale è l'applicazione topica di Imiquimod, che stimola il sistema immunitario ad attaccare l'area interessata. La clearance delle infezioni latenti da HPV sarebbe di grande beneficio clinico. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati con trattamenti convenzionali per le infezioni da HPV per un vantaggio terapeutico.

c. funghi

Le infezioni fungine, o micosi, possono risultare come un'infezione primaria o come colonizzazione opportunistica di ospiti con sistemi immunitari compromessi dalla flora endogena. L'immunità alle micosi è principalmente cellulare, coinvolgendo neutrofili, macrofagi, linfociti e probabilmente cellule natural killer (NK). Le micosi non sono tipicamente suscettibili all'uccisione diretta da parte di anticorpi e complementi. Micosi invasive sistemiche derivanti da infezione primaria includono blastomicosi, coccidioiodomicosi, istoplamosi e paracoccidioiodomicosi. Per le infezioni croniche derivanti da infezioni da funghi, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere somministrati prima di contemporaneamente con o successivamente a uno qualsiasi dei trattamenti convenzionali conosciuti per queste micosi.

La blastomicosi, causata da *Blastomyces dermatitis* è acquisita in seguito a inalazione e produce un'infezione polmonare primaria o malattia ematogenicamente diffusa che coinvolge prevalentemente la pelle, le ossa e il tratto genitourinale maschile. L'esposizione primaria può essere asintomatica o può produrre una sindrome simile all'influenza. Questa malattia può manifestarsi in una forma cronica indolente. La malattia è associata anche a un immunitario compromesso come ad esempio nei pazienti con AIDS. La terapia convenzionale per l'infezione da *B. dermatitis* comprende itraconazolo, ketoconazolo o iniezione endovenosa di amfotericina B.

La coccidioiodomicosi, causata da *Coccidioides immitis*, è acquisita in seguito a inalazione e può causare infezione polmonare primaria, malattia polmonare progressiva o malattia ematogenicamente disseminata che coinvolge prevalentemente la pelle, i tessuti sottocutanei, le ossa, le

articolazioni e le meningi. L'esposizione primaria può essere asintomatica (60%) o associata a una sindrome simile all'influenza. Possono verificarsi polmonite, pleurite e cavitazione polmonare. Manifestazioni metastatiche comprendono lesioni cutanee, tra cui noduli, ulcere, tratti sinusali provenienti da siti profondi e granulomi verrucosi, ossa, giunture, guaina tendinee e meningi, tra cui meningite. La malattia è associata anche all'immunità compromessa come nei pazienti con AIDS. Il trattamento per coccidioomicosi comprende ketoconazolo, itraconazolo e fluconazolo, in particolare per la terapia di mantenimento a lungo termine della malattia nonmeningiale. Le forme meningiali vengono trattate di solito con somministrazione intratecale di Amfotericina B.

L'istoplasmosi, causata da *Histoplasma capsulatum*, è una malattia acquisita in seguito a inalazione nel sistema reticuloendoteliale in cui i lieviti microscopici risiedono nei macrofagi. Può produrre infezione polmonare primaria, malattia polmonare progressiva o malattia ematogenicamente disseminata coinvolgendo prevalentemente il sistema reticuloendoteliale, le superfici della mucosa e le ghiandole surrenali. La riattivazione delle infezioni latenti si verifica spesso nei pazienti con compromissione dell'immunità, come nei pazienti con AIDS. L'esposizione primaria può essere asintomatica o associata a una sindrome tipo influenza, compresa la polmonite, la pleurite, la cavitazione polmonare e l'adenopatia mediastinale. I siti metastatici includono il sistema reticuloendoteliale (epatosplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia e trombocitopenia), membrane mucose (ulcerazioni oronasofaringee), tratto gastrointestinale (malassorbimento) e insufficienza surrenale. Mentre la maggior parte delle infezioni primarie si risolve spontaneamente, quando è associata a un'immunità compromessa come nei pazienti con AIDS, la recidiva è in corso e spesso è associata a polmonite ematogena, ARDS, coagulazione intravascolare disseminata (DIC), papulopustoli ematogenicamente distribuiti e meningite. L'istoplasmosi è trattata con Amfotericina B (in particolare nei pazienti immunocompromessi malati da diffusione ematogena), itraconazolo e ketoconazolo.

Paracoccidioomicosi, causata da *Paracoccidioides brasiliensis*, è una micosi acquisita per inalazione che può produrre infezione polmonare primaria o malattia ematogenicamente diffusa che coinvolge prevalentemente la pelle, le membrane delle mucose, il sistema reticolendoteliale e le ghiandole surrenali. L'infezione può essere inizialmente asintomatica, ma dormiente, e quindi riattivarsi. Il trattamento di questa infezione usa ketoconazolo, itraconazolo e solfonammidi.

Le micosi invasive sistemiche derivanti da patogeni opportunisti, che si verificano in ospiti immunocompromessi, includono candidosi, criptococcosi, aspergillosi, mucomicosi e pneumocistosi. Aumentando la risposta immunitaria in un sistema immunitario compromesso, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono avere un valore terapeutico anche nel trattamento di queste condizioni, in particolare quando combinati con terapie convenzionali.

Trattamenti per candidosi (causata da *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*), criptococchi (causata da *Cryptococcus neoformans*), aspergillosi (causata da *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. Tere* e *A. niger*) e mucomicosi (causate da *Rhizopus arrhizus*, *Rhizomuco*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Saksenaea spp.*) possono essere trattati con uno o più dei seguenti imidazolo, ketoconazolo, intraconazolo, fluconazolo, amfotericina B con e senza flucitosina. La pneumocisti (causata da *pneumocystis carinii*) recentemente riclassificata da protozoi ai funghi è trattata con trimetoprim-sulfametoxolo (TMP-SMZ) e isetionato pentamidina per endovenosa, nonché dapsone, TMP-dapson, trimetrexato, clindamicina-primachina e atovagone.

Microsporidiosi causata da parassiti microsporidi, è stata recentemente riclassificata da protozoi a funghi. Si tratta di organismi unicellulari che hanno mitosomi invece di mitocondri. Organismi che possono causare malattie negli esseri umani includono: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Pleistophora spp*, *Trachipleistophora hominis*, *Trachipleistophora anthropophthera*, *Nosema connori*, *Nosema ocularum*, *Brachiola vesicularum*, *Vittaforma corneale*, *Microsporidium ceylonensis*, *Microsporidium africanum*, *Brachiola algerae*.

Si ritiene che le infezioni siano trasmesse all'uomo da un contatto diretto con animali, acqua contaminata o un altro ospite infetto. Dopo l'infezione delle cellule ospite, lo sporoplasma cresce, si divide o forma un plasmodio multinucleato che può avere cicli di vita complessi, compresa sia la riproduzione asessuale che sessuale. Autoinfezione da generazioni successive e malattie croniche e debilitanti spesso caratterizzano le infezioni microsporidiali.

Le manifestazioni cliniche della malattia possono variare a seconda della specie e dello stato immunitario dell'ospite e includono la congiuntivite (per esempio, *V. corneae*), la diarrea cronica, il malassorbimento e il deperimento (per esempio *E. bieneusi*, *E. intestinalis*).

Trattamenti per microsporosi oculare, intestinale e disseminata comprendono la somministrazione di albendazolo. L'applicazione topica di fumagillina può anche essere usata in modo efficace per curare la cheratocongiuntivite microsporidiale. Altri farmaci includono antielmintici (per esempio Albendazolo), antibiotici (ad esempio fumagillina), immunomodulatori (ad esempio talidomide), antiprotozoi (ad esempio, metronidazolo).

d. protozoi

Le malattie provocate da disturbi parassitari quali malaria, schistosomiasi e leishmaniosi sono tra i più prevalenti e importanti problemi sanitari nei paesi in via di sviluppo. Queste malattie presentano delle sfide particolari perché possono eludere l'immunità dell'ospite attraverso vari mezzi, tra cui: 1) vivere all'interno delle cellule ospite (ad esempio, Leishmania); 2) modificare rapidamente gli antigeni di superficie (per esempio,

i e 3) "travestirsi" mostrando antigeni dell'ospite (per esempio Schistosomiasi). L'uso di farmaci immunosoppressori nel trattamento del cancro e in congiunzione con i trapianti di organi, nonché la prevalenza globale dell'AIDS possono riattivare infezioni latenti o subcliniche da *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma spp.*, *Leishmania spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Trypanosoma spp.* ed elminti.

Per le infezioni croniche derivanti da infezioni con parassiti protozoi, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere combinati mediante somministrazione in combinazione con, prima o successivamente, terapie standard anti-protozoi.

La *malaria*, causata da parassiti di genere *Plasmodium* (per esempio, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. vivax*), inizia il ciclo infettivo come uno sporozoite che si sviluppa nell'intestino della zanzara anofele femmina. Dopo la trasmissione nell'uomo, questi sporozoiti invadono e si moltiplicano all'interno delle cellule epatiche senza indurre una reazione infiammatoria. La progenie di questi organismi, chiamati merozoiti, invade le cellule eritrocitiche e inizia la fase clinica della malattia, tipicamente caratterizzata da febbre e brividi. Nelle aree del mondo in cui l'infezione è endemica, quasi tutti i residenti ospitano infezioni croniche continue a basso livello di patogenicità da bassa a moderata, con livelli crescenti di anticorpi IgG che proteggono l'ingresso da merozoite negli eritrociti.

I farmaci antimalarici attualmente disponibili per il trattamento della malattia clinica e per la profilassi includono: Artemether-lumefantrine (terapia, ad esempio, Coartem® e Riamet®), artesunato-amodiaquina (terapia), artesunato-mefloquina (terapia), artesunato-sulfadoxina/pirimetamina terapia e profilassi), doxiciclina (terapia e profilassi), meflochina, (terapia e profilassi), atopinidone (terapia), atoviquone-proguanil (terapia e profilassi, per esempio Malarone®), chinino (terapia), cloroquina (terapia e profilassi) (terapia e profilassi), paraquina (terapia in *P. vivax* e *P. ovale* solo, non per profilassi), proguanil (profilassi), sulfadoxina-pirimetamina (terapia e profilassi), idrossicloroquina (terapia e profilassi), esempio, Plaquenil®).

Attraverso la riattivazione dei linfociti T anergici, gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere particolarmente terapeutici per aiutare la clearance dei parassiti malarici.

La *toxoplasmosi*, causata da parassiti del genere *Toxoplasma*, è spesso asintomatica, ma una piccola frazione può sviluppare una malattia clinica, che può spaziare da linfadenopatia benigna acuta a infezioni fatali del sistema nervoso centrale. Le fonti di infezione comprendono cisti in carne di maiale cruda o parzialmente cotta o oocisti passati nelle feci di gatti infetti. L'infezione si verifica negli esseri umani di solito attraverso il tratto gastrointestinale, e il protozoo può penetrare e proliferare (come tachizoiti) in praticamente ogni cellula del corpo. Questi tachizoiti possono produrre cisti piene di piccoli corpi infettivi a crescita lenta (bradizoiti) che rimangono vitali per lunghi periodi di tempo, con conseguente infezione cronica latente. Gli ospiti con sistemi immunitari compromessi, come quelli che assumono farmaci immunosoppressivi o che

soffrono di HIV sono particolarmente inclini a soffrire di toxoplasmosi.

I medicinali usati per trattare la toxoplasmosi primaria includono i seguenti: pirimetamina, sia con e senza antibiotici che accompagnano (ad esempio, sulfadiazina, clindamicina, spiramicina e minociclina). La toxoplasmosi latente può essere trattata con gli antibiotici atovaquone, sia con e senza clindamicina.

La *leishmaniosi*, causata da parassiti del genere *Leishmania*, infetta i macrofagi della pelle e dei visceri e viene trasmessa negli esseri umani dai pappataci. Poiché c'è poco o nessun anticorpo specifico del siero, l'immunità di mediazione cellulare attraverso i linfociti T attivati sembra essere un percorso critico attraverso il quale l'infezione viene eliminata. La Leishmaniosi del Vecchio Mondo, noto anche come mal tropicale, è causata da diverse specie di *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. Leishmaniosi del Nuovo Mondo è causata da diverse sottospecie di *L. Mexicana* e *L. braziliensis*. Questi parassiti inducono una forte risposta immunitaria mediata da cellule, ma l'esito della malattia clinica deriva anche in parte dalla risposta dell'ospite. Se l'ospite monta una risposta soppressa o inadeguata, il risultato è la leishmaniosi cutanea cronica diffusa, con scarsa speranza per la cura spontanea (per esempio *L. aethiopica*, *L. Mexicana*). Se l'ospite monta una eccessiva risposta cellulo-mediata, la risposta è una leishmaniosi lupoida o recidiva, con noduli linfoidi persistenti non ulcerati che appaiono al bordo delle lesioni primarie (ad esempio, *L. tropica*). La leishmaniosi recidiva può apparire da 1 a 10 anni dopo la lesione iniziale. Ci sono due forme della malattia, cutanea e viscerale, con la forma cutanea che si manifesta in lesioni cutanee con l'immunità mediata da cellule, critica per la clearance. Nella forma viscerale, l'immunità mediata da cellule è insufficiente o inesistente, e la malattia si manifesta clinicamente come ipergammaglobulinemia policlonale delle cellule B, leucopenia, splenomegalia e elevata produzione di TNF- α .

Miltefosine (ad esempio, Impavido®) e paramiocina sono trattamenti attualmente disponibili per la leishmaniosi sia cutanea sia viscerale.

La critosporidiosi è causata da infezioni da protozoi del genere *Cryptosporidia* e risulta dal contatto diretto umano con escrementi fecali di ospiti infetti. L'infezione del tessuto mucoso intestinale può causare diarrea. La malattia si manifesta tipicamente come un'infezione acuta, ma può diventare cronica, soprattutto in individui immunocompromessi. I trattamenti sono tipicamente palliativi, in particolare l'idratazione, ma la paromomicina, l'azitromicina e l'Ig del siero (ad esempio, Lactobin-R®) hanno avuto successo nel rimuovere l'infezione.

La *trypanosomiasi*, causata dal parassita *Trypanosoma* (ad esempio, *T. Brucei*, subsp. *gambiense*, *rodesiense* infetta l'uomo e il bestiame attraverso i morsi della mosca Tsetse. La sfida che questo patogeno pone deriva da generazioni successive di popolazioni che espongono differenti antigeni di superficie. Le infezioni sono caratterizzate da livelli elevati di siero immunoglobuline non specifiche e non protettive.

I trattamenti per la *Tripanosomiasi* comprendono la somministrazione endovenosa di quanto segue: pentamidina (per *T.b. gambiense*), suramina endovenosa (per *T.b. rhodesiense*), eflomitina, melarsoprol sia con sia senza nifurtimox.

Le infezioni da elminti, risultanti da trematodi (per esempio *Schistosoma spp.*), cestodi e nematodi condividono le comuni risposte immunitarie di eosinofilia e anticorpo reaginico, risposte che dipendono dai linfociti T.

La Schistosomiasi (anche detta bilharzia), è causata da *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mekongi* iniziano il loro ciclo vitale come uova in acqua, che si schiudono in miracidi, che penetrano le lumache e creano più generazioni di sporocisti. Queste a loro volta producono cercarie con la coda a forchetta che possono infettare il flusso sanguigno di un ospite umano come schistosomula, che migrano inizialmente nei polmoni, e poi nel fegato. Questi trematodi infine si accoppiano, si riproducono, e depongono uova nelle venule mesenteriche. Mentre molte di queste uova viaggiano verso l'intestino e vengono escluse, alcune sono intrappolate nella submucosa, nelle venule portali del fegato e in altri organi del corpo. L'infiammazione granulomatosa associata alle uova intrappolate è il sintomo definitivo della schistosomiasi cronica.

I trattamenti per la schistosomiasi includono la somministrazione di Praziquantel®, antimonio, Oxamniquine (*S. mansoni*) e Mirazid®.

Le infezioni da cestode possono essere classificate in due gruppi: uno è il verme piatto adulto con dimora intestinale come *Diphyllobothrium latum* e *Taenia saginata*, che hanno un effetto immunitario ridotto, non umorale. Il secondo gruppo descrive i vermi piatti larvali migratori che si incistano nei tessuti quali *Hymenolepis nana*, *Echinococcus granulosus* e *Taenia solium*, che inducono forti risposte parenterali dell'ospite e siero anticorpi protettivi. La più grave infezione da cestode nell'uomo è l'Echinococcosi, che quando si impianta nel fegato, nei polmoni, nel cervello, nei reni o in altre parti del corpo può provocare la formazione di cisti idatidee.

Trattamenti per Echinococcosi includono la somministrazione di metronidazolo, albendazolo e intervento chirurgico, come rimozione, aspirazione, marsupializzazione od omentopessia.

I nematodi sono gli elminti più diffusi e ampiamente distribuiti che infettano gli esseri umani, causato disordini come la trichinosi, l'ascariasi, la filariosi e la strongilodiosi. La trichinosi, causata da *Trichinella spiralis*, può derivare dall'ingestione delle larve di *T. spiralis* in carne cruda o carne parzialmente cotta come il maiale. Nell'uomo, le infezioni suscitano una forte risposta umorale con elevate IgM, seguita dalla produzione di IgG, seguita da una rapida espulsione dei vermi danneggiati dagli anticorpi tramite i linfociti T.

L'unico trattamento noto per uccidere i vermi adulti nell'intestino è il tiabendazolo, mentre non esiste alcun trattamento noto per uccidere le larve.

L'*ascaris*, noto anche come verme cilindrico gigante (*Ascaris lumbricoides*), è un parassita comune negli esseri umani derivante

dall'ingestione di sostanze contaminate da feci. Mentre i pazienti possono rimanere asintomatici per lunghi periodi di tempo, mentre le fasi larvali viaggiano attraverso il corpo, possono causare danno viscerale, peritonite e infiammazione, ingrossamento del fegato o della milza, tossicità e polmonite.

I trattamenti per l'ascariasi comprendono la somministrazione di mebendazolo (per esempio Vermox®), piperazina, pirantel pamoato (per esempio Antiminth®, Pin-Rid®, Pin-X®), albendazolo, tiabendazolo con o senza piperazina, esilresorcinolo, santonina e olio di *Chenopodium*. Gli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione possono essere somministrati in combinazione con, prima della o successivamente alla somministrazione di queste terapie per il trattamento dell'*ascariasi*.

La filariosi, causata da nematodi filaridi, che vengono introdotti nell'uomo da insetti vettori. *Onchocerca volvulus*, che ha causato l'oncocercosi o cecità fluviale, è trasmesso da morsi di simulidi. Le larve infettive si collocano sottocute e si sviluppano in adulti, inducono una risposta fibrogenica nell'ospite, e diffondono una gran quantità di microfilarie, che si disperdono sottocutaneamente e attraverso gli occhi, inducendo inoltre una cheratosi o una retinite che porta la cornea a divenire opaca. La filariosi linfatica deriva da infezione da *Brugia spp.* e *Wuchereria spp.* Nel tempo, la cicatrizzazione del tessuto linfatico, specialmente nell'inguine, può impedire il drenaggio, con la conseguente condizione deturpante dell'elefantiasi.

Il trattamento primario per la filariosi è la somministrazione degli antibiotici ivermectina, abendazolo e dietilcarbamazina citrato (DEC, Hetrazan®) con o senza ivermectina o albendazolo. Altre prospettive di trattamento includono la doxiciclina, che uccide un batterio simbiotico, wolbachia.

La strongilodiosi, causata da parassiti del genere *Strongyloides* (per esempio *S. stercoralis*, *S. fülleborni*), è una malattia che viene trasmessa all'uomo attraverso il terreno contaminati con feci. Possono esistere sia in un ciclo a vita libera (larve rabaditiformi che maturano in vermi adulti) sia in un ciclo parassitico (larve filariformi che maturano in vermi adulti) che penetrano nella pelle, raggiungono i polmoni, quindi la faringe e in ultimo si sistemano nell'intestino. È noto anche il verificarsi di autoinfezione con *Strongyloides*, che è essenzialmente un'infezione ripetuta da generazioni successive di larve filariformi.

Le infezioni possono essere asintomatiche, o possono essere caratterizzate da dolori e diarrea nel tratto gastrointestinale, nella sindrome di Löffler nei polmoni (vale a dire eosinofilia) e orticaria. Anche l'eosinofilia ematica può essere presente. Poiché un'infezione persistente di *Strongyloides* può imitare l'ulcera peptica, la malattia della cistifellea e il morbo di Crohn, la diagnosi errata è comune. È un problema particolare negli ospiti immunocompromessi.

Trattamenti noti per la *Strongyloidiosi* sono l'ivermectina, l'albenazolo o il tiabendazolo ma poiché questa mediazione uccide solo vermi adulti, è necessaria una somministrazione ripetuta.

e. vaccinazione

La vaccinazione o la somministrazione di materiale antigenico per indurre l'immunità alla malattia viene usata abitualmente per prevenire o attenuare gli effetti dell'infezione da parte di un agente patogeno. Il potenziamento dell'immunità dell'ospite può essere utilizzato su antigeni indesiderati trovati non solo su agenti patogeni infettivi, ma anche su tessuto ospite che è diventato malato (ad esempio, canceroso). Tradizionalmente, i vaccini sono derivati da patogeni interi indeboliti o morti, ma possono anche essere peptidi che rappresentano epitopi sul patogeno intatto che sono riconosciuti in modo specifico dalle molecole del complesso di istocompatibilità (MHC) di classe I o di classe II umano. Gli antigeni peptidici di particolare interesse sono quelli riconosciuti specificamente dai linfociti T.

Recentemente, è stato dimostrato che la combinazione di una vaccinazione terapeutica con la somministrazione di PD-L1 bloccato sui linfociti T CD8+ esausti ha determinato una funzionalità potenziata e il controllo virale in un modello di topo con infezione cronica. Ha et al., J.Exp.Med. 205 (3): 543-555 (2008). Di conseguenza, gli anticorpi anti-PD-L1 qui descritti possono anche essere combinati con la vaccinazione antigenica (ad esempio, somministrata prima, in simultanea o dopo) per il trattamento dell'infezione (per esempio acuta e cronica) derivante da invasione virale, batterica, fungina o protozoica così come l'immunità tumorale.

G. Dosaggi farmaceutici:

I dosaggi e la concentrazione desiderata di farmaco delle composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono variare a seconda del particolare impiego previsto. La determinazione del dosaggio appropriato o della via di somministrazione è ben nelle capacità di un operatore ordinario. Gli esperimenti con animali forniscono una guida affidabile per la determinazione di dosi efficaci per la terapia umana. La riduzione in scala interspecifica delle dosi efficaci può essere eseguita seguendo i principi stabiliti da Mordenti, J. e Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Ed., Pergamon Press, New York 1989, pagg. 42-46.

Quando si usa la somministrazione *in vivo* dei polipeptidi o degli anticorpi qui descritti, le quantità normali di dosaggio possono variare da circa 10 ng/kg fino a circa 100 mg/kg di peso corporeo di mammifero o più al giorno, preferibilmente circa 1 mg/kg/giorno a 10 mg/kg/giorno, a seconda della via di somministrazione. La guida per i particolari dosaggi e procedimenti di distribuzione è fornita in letteratura; vedere, ad esempio, i Brevetti U.S. N. 4,657,760; 5,206,344; o 5,225,212. Rientra nell'ambito dell'invenzione il fatto che diverse formulazioni siano efficaci per diversi

trattamenti e disturbi diversi, e che la somministrazione destinata a trattare un organo o un tessuto specifico può richiedere un rilascio diverso da quello a un altro organo o tessuto. Inoltre, i dosaggi possono essere somministrati mediante una o più somministrazioni separate, o mediante infusione continua. Per somministrazioni ripetute per diversi giorni o più lunghe, a seconda della condizione, il trattamento viene prolungato fino a quando si verifica una soppressione desiderata dei sintomi della malattia. Tuttavia, altri regimi di dosaggio possono essere utili. Il progresso di questa terapia è facilmente monitorato mediante tecniche e saggi convenzionali.

H. Somministrazione della formulazione

Le formulazioni, incluse ma non limitate a formulazioni ricostituite e liquide, vengono somministrate a un mammifero che necessita di trattamento con gli anticorpi anti-PD-L1, preferibilmente un essere umano, in accordo con procedimenti noti, come somministrazione endovenosa come bolo o mediante infusione continua per un periodo di tempo, tramite vie intramuscolari, intraperitoneali, intracerebrospinali, sottocutanee, intraarticolari, intrasinovali, intratecali, orali, topiche o di inalazione.

Le formulazioni possono essere somministrate al mammifero mediante somministrazione sottocutanea (vale a dire sotto la pelle). Per tali scopi, la formulazione può essere iniettata usando una siringa. Tuttavia, sono disponibili altri dispositivi per la somministrazione della formulazione, come dispositivi per iniezione (ad esempio i dispositivi INJECT-EASE™ e GENJECT™); penne iniettori (come il GENPEN™); dispositivi auto-iniettori, dispositivi senza ago (ad esempio MEDIJECTOR™ e BIOJECTOR™); e sistemi di distribuzione tramite cerotti sottocutanei.

Nella presente sono anche descritti kit per unità di somministrazione a singola dose. Tali kit possono comprendere un contenitore di una formulazione acquosa di proteina o anticorpo terapeutico, comprendente siringhe preriempite sia singole sia multi-camera. Siringhe preriempite esemplificative sono disponibili presso Vetter GmbH, Ravensburg, Germania.

Il dosaggio appropriato ("quantità terapeuticamente efficace") della proteina dipenderà, ad esempio, dalla condizione da trattare, dalla gravità e dal decorso della condizione, se la proteina viene somministrata per scopi preventivi o terapeutici, la terapia precedente, la storia clinica del paziente e la risposta all'anticorpo anti-PD-L1, il formato della formulazione usata, e la discrezione del medico curante. L'anticorpo anti-PD-L1 è opportunamente somministrato al paziente in una sola volta o in una serie di trattamenti e può essere somministrato al paziente in qualsiasi momento dalla diagnosi in avanti. L'anticorpo anti-PD-L1 può essere somministrato come unico trattamento o in combinazione con altri farmaci o terapie utili per trattare la condizione in questione.

Per gli anticorpi anti-PD-L1, un dosaggio iniziale candidato può spaziare da circa 0,1-20 mg/kg per la somministrazione al paziente,

che può assumere la forma di una o più somministrazioni separate. Tuttavia, altri regimi di dosaggio possono essere utili. Il progresso di tale terapia è facilmente monitorato mediante tecniche convenzionali.

I. Articoli di Manifattura

La presente descrizione riguarda anche un articolo di manifattura che è fornito e contiene la formulazione e fornisce preferibilmente istruzioni per il suo utilizzo. L'articolo di manifattura comprende un contenitore. I contenitori adatti comprendono, ad esempio, bottiglie, flaconi (per esempio flaconi a doppia camera), siringhe (come siringhe singole o a camera doppia) e provette. Il contenitore può essere formato da una varietà di materiali come vetro o plastica. Il contenitore contiene la formulazione. L'etichetta, che è sopra, o associata al contenitore può indicare le istruzioni per la ricostituzione e/o l'uso. L'etichetta può inoltre indicare che la formulazione è utile o destinata ad una somministrazione sottocutanea e/o per il trattamento di un disturbo disfunzionale dei linfociti T. Il contenitore contenente la formulazione può essere una fiala multiuso, che consente di ripetere le somministrazioni (per esempio, da 2-6 somministrazioni) della formulazione ricostituita. L'articolo di manifattura può inoltre comprendere un secondo contenitore comprendente un opportuno diluente (ad esempio BWFI). Dopo la miscelazione del diluente e della formulazione liofilizzata, la concentrazione finale della proteina nella formulazione ricostituita sarà generalmente almeno 50 mg/ml. L'articolo di manifattura può inoltre includere altri materiali desiderabili da un punto di vista commerciale e dell'utente, compresi altri tamponi, diluenti, filtri, aghi, siringhe e foglietti illustrativi con istruzioni per l'uso.

L'invenzione sarà intesa più completamente facendo riferimento agli esempi seguenti. Tuttavia, essi non dovrebbero essere interpretati come limitanti l'ambito dell'invenzione.

La descrizione riguarda anche un articolo di manifattura comprendente le formulazioni qui descritte per la somministrazione in un dispositivo auto-iniettore. Un auto-iniettore può essere descritto come un dispositivo per iniezione che, al momento dell'attivazione, distribuirà il suo contenuto senza ulteriori azioni necessarie dal paziente o dal somministratore. Sono particolarmente adatti per l'auto-medicazione di formulazioni terapeutiche quando il tasso di distribuzione deve essere costante e il tempo di distribuzione è maggiore di pochi istanti.

ESEMPIO 1

Identificazione degli anticorpi anti-PD-L1 in Librerie Fagiche

Ordinamento e Screening della Libreria per Identificare Anticorpi anti-PD-L1

Fusioni PD-L1-Fc umane (R & D Systems, cat # 156-B7) e murine (R & D Systems, cat # 1019-B7) sono state usate come antigeni per l'ordinamento alternato di librerie. In particolare, le librerie su fago sono state ordinate prima rispetto all'antigene umano, seguito da antigene

murino, umano e murino nei successivi tre tumi. Immunoplastre Maxisorp® a 96 pozzetti Nunc sono state rivestite per tutta la notte a 4° C con antigene bersaglio (10 µg/ml) e sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente con tampone di blocco per fago PBST (tampone fosfato isotonic (PBS) e siero albumina bovina (BSA) 1% (p/v) e tween-20 0,05% (v/v)). Le librerie su fago di anticorpi VH (vedere, per esempio, Lee et al., J. Immunol. Meth., 284: 119-132, 2004) e VH/VL (vedere Liang et al., J. Mol.Biol 366: 815-829, 2007) sono state aggiunte separatamente alle piastre con antigene e sono state incubate per tutta la notte a temperatura ambiente. Il giorno seguente le piastre rivestite con antigene sono state lavate dieci volte con PBT (PBS con 0,05% di Tween-20) e i fagi legati sono stati eluiti con 50 mM HCl e 500 mM NaCl per 30 minuti e neutralizzati con un volume uguale di 1 M Tris (PH 7,5). I fagi recuperati sono stati amplificati in cellule di *E. coli* XL-1 Blue. Durante i successivi cicli di selezione, l'incubazione del fago con l'anticorpo con le piastre rivestite con l'antigene è stata ridotta a 2-3 ore e la stringenza del lavaggio delle piastre è stata gradualmente aumentata.

Dopo 4 tumi di spostamento, è stato osservato un arricchimento significativo. 96 cloni sono stati presi ognuno dalla separazione delle librerie di VH e VH/VL per determinare se si legassero in maniera specifica a entrambi PD-L1-Fc umano e murino. Le regioni variabili di questi cloni sono state sequenziate con PCR per identificare i cloni con sequenze uniche.

I cloni d'origine di interesse sono stati riformattati in IgG clonando le regioni V_L e V_H di cloni individuali nel vettore LPG3 e LPG4 (Lee et al., supra) rispettivamente, esprimendo transitoriamente nelle cellule CHO di mammifero, e purificando con una colonna di proteina A. I 13 anticorpi dal Fago sono stati valutati per la loro capacità di bloccare l'interazione tra la proteina di fusione PD-1-Fc solubile e PD-L1 umano o di topo espresso in cellule 293 (i valori di IC₅₀ sono indicati nella Tabella 1 - nella metà superiore). YW243.55, l'anticorpo con IC₅₀ più bassa per bloccare il legame di PD-L1 umano a PD-1 è stato selezionato per la successiva maturazione di affinità per migliorare la sua affinità sia per PD-L1 umano sia di topo. (Tabella 1). Un anticorpo con reattività crociata confrontabile sia contro la specie primate sia murina (oltre a mantenere l'affinità all'uomo) fomirà un valore terapeutico di potenziato valore, in quanto lo stesso anticorpo che è stato ben caratterizzato nei modelli sperimentali può essere utilizzato negli studi clinici umani. Ciò evita l'incertezza derivante dall'utilizzo di un surrogato specifico del modello.

Costruire Librerie per Miglioramento dell'Affinità dei Cloni Derivati dalla Libreria V_H

Il fagemide pW0703 (derivato dal fagemide pV0350-2b (Lee et al., J. Mol. Biol 340: 1073-1093 (2004)) contenente il codone di arresto (TAA) in tutte le posizioni CDR-L3 ed esponente Fab monovalente sulla superficie del batteriofago M13) serviva come templat della libreria per innestare domini variabili di catena pesante (V_H) di cloni di interesse dalla libreria V_H per la maturazione di affinità. Le strategie di randomizzazione sia dure sia morbide sono state utilizzate per la maturazione di affinità. Per la randomizzazione dura, una libreria di catene leggere

con posizioni selezionate delle tre CDR di catena leggera è stata randomizzata usando amminoacidi progettati per imitare gli anticorpi umani naturali e la degenerazione del DNA progettata è stata descritta in Lee et al. (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004)). Per la randomizzazione morbida, residui nelle posizioni 91-94 e 96 di CDR-L3, 28-31 e 34-35 di CDR-H1, 50, 52 e 53-58 di CDR-H2, 95-99 e 100A di CDR -H3, sono stati presi come bersagli; e due diverse combinazioni di anse di CDR, L3/H1/H2 e L3/H3, sono state selezionate per la randomizzazione. Per ottenere le condizioni di randomizzazione morbida, che hanno introdotto il tasso di mutazione di circa il 50% nelle posizioni selezionate, il DNA mutagenico è stato sintetizzato con miscele 70-10-10-10 di basi favorendo i nucleotidi wild-type (Gallop et al., Journal of Chimica Medicinale 37: 1233-1251 (1994)).

Selezione di Fagi per Generare un Miglioramento di Affinità

I cloni da fago precedentemente identificati sono stati sottoposti a selezione su piastre per il primo turno, seguito da cinque o sei turni di selezione in soluzione. Le librerie sono state selezionate rispetto a PD-L1-Fc umano e murino separatamente (R & D Systems, cat. # 156-B7, cat. # 1019-B7, rispettivamente). Per il bersaglio PD-L1-Fc umano, al primo turno di selezione delle piastre, tre librerie sono state selezionate rispetto a una piastra rivestita con il bersaglio (piastra NUNC Maxisorp[®]) separatamente con immissione di fago di circa 3 O.D./ml in 1% BSA e 0,05% Tween 20 per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo il primo turno di selezione delle piastre, è stata eseguita la selezione in soluzione per aumentare la stringenza della selezione. Per la selezione in soluzione, 1 O.D./ml di fago propagato dal primo turno di selezione delle piastre è stato incubato con 20 nM di proteina bersaglio biotinilata (la concentrazione è basata sul valore di IC₅₀ del fago del clone d'origine) in 100 µl di tampone contenente 1% Superblock (Pierce Biotechnology) e 0,05% Tween-20 per 30 minuti a temperatura ambiente. La miscela è stata ulteriormente diluita 10X con Superblock 1% e 100 µl/pozzetto sono stati applicati a pozzetti rivestiti con neutravidina (5 µg/ml) per 15 minuti a temperatura ambiente con agitazione gentile affinché il fago si legasse al bersaglio biotinilato. I pozzetti sono stati lavati 10X con PBS-0,05% Tween-20. Per determinare il legame di sfondo, pozzetti di controllo contenenti fago con bersagli che non erano stati biotinilati sono stati catturati su piastre rivestite con neutravidina. Il fago legato è stato eluito con 0,1 N HCl per 20 minuti, neutralizzato da volume 1/10 di 1 M Tris pH 11, titolato, e propagato per il prossimo turno. Successivamente, sono stati effettuati altri cinque turni di selezione in soluzione insieme a due procedimenti per aumentare la stringenza della selezione. Il primo dei due è per la selezione on-rate diminuendo la concentrazione di proteina bersaglio biotinilata da 4 nM a 0,5 nM, e il secondo per la selezione off-rate aggiungendo quantità in eccesso di proteine bersaglio non biotinilata (100-2000 volte in più) per escludere i leganti più deboli o a temperatura ambiente o a 37°C. Inoltre, l'immissione di fago è stata diminuita (0,1-0,5 OD/ml) per abbassare il legame del fago di sfondo. Per il bersaglio PD-L1-Fc murino, il procedimento di selezione dei fagi è simile a quello sopra descritto per l'antigene

PD-L1 Fc umano, con poche modifiche. In particolare, PD-L1-Fc murino biotinilato 100 nM è stato utilizzato per lo spostamento della soluzione immediatamente dopo il primo turno di spostamento delle piastre. Nei quattro successivi turni di spostamento della soluzione, il bersaglio biotinilato è stato ridotto da 10 nM a 1 nM, e un eccesso di 200-500 volte di bersaglio non biotinilato è stato aggiunto a temperatura ambiente.

I cloni maturati di affinità sono stati poi ulteriormente sottoposti a screening con la procedura ELISA di Screening per Affinità ad Alta Produzione descritto nel seguente esempio.

Screening per Affinità ad Alta Produzione ELISA (Competizione in Singolo Punto)

Le colonie sono state raccolte dal settimo e sesto turno di screening per il bersaglio PD-L1 umano e murino, rispettivamente. Le colonie sono state fatte crescere per tutta la notte a 37° C in 150 µl/pozzetto di terreno 2YT con 50 µg/ml di carbenicillina e 1E10/ml KO7 in piastra a 96 pozzetti (Falcon). Dalla stessa piastra, una colonia di fago d'origine infettato da XL-1 è stata selezionata come controllo. Le piastre Nunc Maxisorp® a 96 pozzetti sono state rivestite con 100 µl/pozzetto di proteina umana e murina PD-L1-Fc (2 µg/ml) separatamente in PBS a 4° C per tutta la notte o a temperatura ambiente per 2 ore. Le piastre sono state bloccate con 65 µl di 1% BSA per 30 minuti e 40 µl di 1% Tween 20 per altri 30 minuti.

Il sumatante del fago è stato diluito 1:10 in tampone per ELISA (saggio immunoassorbente con enzima collegato) (PBS con 0,5% BSA, 0,05% Tween-20) con o senza proteina bersaglio 10 nM in 100 µl di volume totale e incubato per almeno 1 ora a temperatura ambiente in una piastra F (NUNC). 75 µl di miscela con o senza proteina bersaglio sono stati trasferiti fianco a fianco alle piastre rivestite con la proteina bersaglio. La piastra è stata agitata dolcemente per 15 minuti per consentire la cattura di fagi non legati alla piastra rivestita con la proteina bersaglio. La piastra è stata lavata almeno cinque volte con PBS-0,05% Tween-20. Il legame è stato quantificato aggiungendo un anticorpo anti-M13 coniugato con perossidasi di rafano (HRP) in tampone per ELISA (1: 5000) e incubato per 30 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate con PBS-0,05% Tween 20 almeno cinque volte. Successivamente, 100 µl/pozzetto di un rapporto 1:1 di substrato per perossidasi di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e soluzione di perossidasi B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) sono stati aggiunti al pozzetto e incubati per 5 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata arrestata aggiungendo 100 µl di 1 M acido fosforico (H₃PO₄) a ciascun pozzetto e lasciata incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. La OD (densità ottica) del colore giallo in ciascun pozzetto è stata determinata usando un lettore standard di piastre ELISA a 450 nm. La riduzione di OD (%) è stata calcolata mediante la seguente equazione.

Riduzione (%) di OD_{450nm} = [(OD_{450nm} dei pozzetti con concorrente)/(OD_{450nm} del pozzetto senza concorrente)]x100

In confronto alla riduzione di OD_{450nm} (%) del pozzetto del fago d'origine (100%), i cloni che avevano una riduzione di OD_{450nm} (%) inferiore al 50% per il bersaglio sia umano sia murino sono stati raccolti per l'analisi delle sequenze. Sono stati selezionati cloni unici per la preparazione del fago per determinare l'affinità di legame (IC₅₀ del fago) rispetto a PD-L-Fc sia umano sia murino in confronto ai cloni d'origine.

Materiale

hPD-1-Fc, hPD-L1-Fc, hB7.1-Fc, mPD-1-Fc, mPD-L1-Fc e mB7.1 sono stati acquistati da R & D Systems. Le cellule 293 esperimenti HPD-L1 state generate alla Genentech usando tecniche convenzionali. F(ab')₂ di capra anti-Fc di IgG umana è stato acquistato da Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Coniugazione delle proteine

Le proteine PD-1-Fc e B7.1-Fc sono state biotilate con EZ-Link solfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) per 30 minuti a temperatura ambiente come descritto dal produttore. L'eccesso di biotina che non ha reagito è stato rimosso con colonne ad alta capacità Quick Spin, G50-Sephadex (Roche) come descritto dal produttore.

F(ab')₂ di capra anti-Fc di IgG umana è stato etichettato con Rutenio con MSD Solfo-Tag NHS-Estere (Meso Scale Discovery) come descritto dal produttore e l'eccesso di Solfo-Tag che non ha reagito è stato rimosso con una colonna ad alta capacità Quick Spin, G50-Sephadex.

Saggio di legame a cellule ECL per testare gli anticorpi dei fagi

Le concentrazioni di anticorpi che determinano l'inibizione del 50% (IC₅₀) del legame di hPD-1-Fc a cellule 293 esperimenti hPD-L1 sono state misurate con il saggio di legame a cellule elettrochemiluminescenti (ECL). Le cellule 293 con espressione di hPD-L1 sono state lavate con tampone fosfato isotonic (PBS) e seminate a 25.000 cellule per pozzetto in 25 µl di PBS su piastra High Bind a 96 pozzetti (Meso Scale Discovery). Incubare la piastra a temperatura ambiente per consentire alle cellule di attaccarsi alla superficie in carbonio della piastra. Aggiungere 25 µl di 30% FBS a ciascun pozzetto e incubare la piastra per 30 minuti con agitazione leggera per bloccare i siti di legame non specifici. Lavare la piastra tre volte con PBS su una micropiastra per lavaggio ELISA (ELx405 Select, Bio-Tek Instruments) in condizioni di gentile erogazione e aspirazione. Rimuovere l'eccesso di PBS nei pozzetti tamponando la piastra su tovaglioli di carta. Aggiungere 12,5 µl di concentrazione 2X di anticorpi a ciascun pozzetto in 3% di FBS in PBS (Tampone per Saggio) e seguito da 12,5 µl di 4 µg/ml (concentrazione 2X) di hPD-1-biotina in Tampone per Saggio e incubare la piastra per un'ora con agitazione leggera. Lavare la piastra 3X con PBS su una micropiastra per lavaggio e tamponare la piastra su tovaglioli di carta. Aggiungere 25 µl di 2 µg/ml di Streptavidina-Rutenio (Meso Scale Discovery) e incubare in tampone per

saggio a temperatura ambiente per 30 minuti con agitazione leggera. Lavare 3X con PBS su micropiastra per lavaggio e tamponare la piastra su tovaglioli di carta. Aggiungere 150 µl di 1X Tampone di Lettura MSD Read Buffer senza tensioattivo (Meso Scale Discovery). Leggere la luce di luminescenza emessa a 620 nm sul lettore Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). I valori di ECL sono stati analizzati con le concentrazioni degli anticorpi in esame utilizzati nel saggio, utilizzando una misura dei minimi quadrati non lineari a quattro parametri, per ottenere i valori IC₅₀ di ciascun concorrente nel saggio.

Risultati e Disamina:

Quindici anticorpi unici da fagi derivati da YW243.55 che hanno legato PD-L1 sia umano che murino sono stati scelti e riformattati ad anticorpi IgG1 a lunghezza intera per un'ulteriore valutazione. Le sequenze della regione variabile di catena leggera e pesante di questi anticorpi sono riportate nelle figure 11A e B.

I quindici anticorpi riformattati sono stati testati per la loro capacità di bloccare il legame di PD-1 a cellule 293 che esprimono PD-L1 umano o di topo tramite un saggio di legame a cellule elettrochemiluminescenti (ECL). (Tabella 1 - metà inferiore: Nella Tabella 1 "Formato 1" descrive il legame di PD-1-Fc umano solubile con cellule 293 trasfettate con PD-L1 umano; "Formato 2" descrive il legame di PD-1-Fc murino a cellule 293 trasfettate con PD-L1 murino, e "Formato 3" descrive il legame di PD-1 umano a cellule 293 trasfettate con PD-L1 murino. Mentre tutti i quindici anticorpi a migliorata affinità avevano acquisito significativa reattività crociata a PD-L1 di topo, YW243.55S70 è stato selezionato come candidato primario da ricercare sulla base della sua capacità di bloccare il legame di PD-L1 sia umano sia di topo a PD-1 (Tabella 1: valori IC₅₀ rispettivamente di 49 pM e 22 pM).

Tabella 1

Clone	Format 1	Format 2	Format 3
	hPD1-Fc- biotin/ hPDL1-293 IC ₅₀ in nM	mPD1-Fc- biotin/ mPDL1-293 IC ₅₀ in nM	hPD1-Fc- biotin/ mPDL1-293 IC ₅₀ in nM
YW251.11	8.6		
YW 243.1	0.234		
YW243.55	0.099		>100
YW254.1	>100	0.795	
YW254.2	>100	3.76	
YW254.3	>100	>100	
YW254.4	1.73	15.6	
YW254.9	>100	0.224	
YW254.33	2.2	>100	
YW262.4	50	1.42	
YW262.5	90	25	
YW262.16	7.5	0.626	
YW262.64	0.256	100	
YW243.55.5	0.104		0.141
YW243.55.8	0.061		0.063
YW243.55.30	0.108		0.100
YW243.55.34	0.084		0.049
YW243.55.49	0.08		0.032
YW243.55.51	0.078		0.031
YW243.55.62	0.096		0.066
YW243.55.84	0.124		0.051
YW243.55.89	0.066		0.13
YW243.55.H12	0.103		0.156
YW243.55.H37	0.109		0.163
YW243.55.H70	0.084		0.042
YW243.55.S1	0.114		0.074
YW243.55.S37	0.100		0.024
YW243.55.S70	0.049		0.022

[“Format” = Formato;
“biotin” = biotina.]

ESEMPIO 2

Caratterizzazione di anticorpi anti-PD-L1 (BIAcore)

Le affinità di legame degli anticorpi da fago anti-PD-L1 YW243.55 e YW243.55S70 contro PD-L1 ricombinante umano e di topo sono state misurate mediante risonanza plasmonica di superficie (SRP) utilizzando uno strumento BIAcore™-3000. PD-L1-Fc umano ricombinante (R & D Systems cat.# 156-B7) e PD-L1-Fc di topo ricombinante (R & D Systems, cat # 1019-B7) sono stati rivestiti direttamente sui chip di biosensori CM5 per ottenere circa 500 unità di risposta (RU). Per le misurazioni cinetiche, sono state iniettate diluizioni seriali di due volte (3.9 nM a 500 nM)

in tampone PBT (PBS con 0.05% Tween-20) a 25°C con una velocità di flusso di 30 µl/min. I tassi d'associazione (k_{on}) e il tasso di dissociazione (k_{off}) sono stati calcolati usando un semplice modello di legame Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software versione 3.2). La costante di dissociazione all'equilibrio (KD) è stata calcolata come il rapporto k_{off}/k_{on} .

Le affinità di legame dei cloni degli anticorpi da fago anti-PD-L1 YW243.55 e YW243.55.S70 misurate sono riportate sotto nella Tabella 2.

Tabella 2
Affinità di legame BIAcore

Clone	Immobilized rhPD-L1 Fc			Immobilized rmPD-L1 Fc		
	$k_{on}/(1/MS)$	$k_{off}/(1/s)$	KD(M)	$k_{on}/(1/MS)$	$k_{off}/(1/s)$	KD(M)
YW243.55 (Fab)	5.80×10^5	7.30×10^{-3}	1.26×10^{-8}	--	--	$> 1 \times 10^{-6}$
YW243.55 (IgG)	2.70×10^5	2.60×10^{-4}	9.63×10^{-10}	5.80×10^4	9.20×10^{-3}	1.59×10^{-7}
YW243.55.S70 (Fab)	5.30×10^5	1.00×10^{-4}	1.89×10^{-10}	4.80×10^5	1.40×10^{-3}	2.92×10^{-9}
YW243.55.S70 (IgG)	3.90×10^5	6.30×10^{-5}	1.62×10^{-10}	2.80×10^5	1.80×10^{-4}	6.43×10^{-10}

[“Immobilized rhPD-L1-Fc” = rhPD-L1-Fc immobilizzato;
“Immobilized rmPD-L1-Fc” = rmPD-L1-Fc immobilizzato]

ESEMPIO 3A

Specificità di anticorpi anti-PD-L1 per PD-L1 umano, di rhesus e di topo - FACS e saggio di legame a cellule con radioligando

Questo esempio mostra la specificità per l'anticorpo anti-PD-L1 dell'invenzione per PD-L1 umano, di rhesus e di topo. In aggiunta, mostra l'affinità dell'anticorpo per PD-L1 di topo e umano espresso nella membrana cellulare su cellule 293 trasfettate.

PD-L1 umano e di topo sono stati trasfettati in modo stabile in cellule 293. Le cellule sono state raccolte e piastrate a 150.000 cellule per pozzetto in una piastra a 96 pozzetti per studi di legame.

Il sangue di rhesus è stato ottenuto dalla Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio, Texas). Il sangue è stato diluito con un uguale volume di PBS e sovrapposto su 96% Ficoll-Paque (GE Healthcare) per la separazione delle cellule mononucleate. Le cellule mononucleate sono state lisate dei globuli rossi utilizzando il tampone per lisi di eritrociti (Qiagen) e coltivate per tutta la notte a $1,5 \times 10^6$ cellule/ml con 5 ng/ml PMA più 1 µM ionomicina in piastre a 6 pozzetti. Il terreno di coltura era RPMI 1640 con 10% di siero fetale bovino, 20 µM HEPES e diluizioni 1:100 dei seguenti integratori da Gibco: Gluta-MAX, piruvato di sodio, penicillina/streptomicina e amminoacidi non essenziali.

Le cellule sono state raccolte il giorno successivo e suddivise in aliquote in una piastra a 96 pozzetti per studi di legame (circa 120.000 cellule per pozzetto).

L'anticorpo per PD-L1 YW243.55.S70 o l'anticorpo di controllo Herceptin® sono stati titolati a partire da 10 µg/ml, in diluizioni seriali di tre volte e legati a cellule in volumi di 50 µl per 25 minuti su ghiaccio. Le cellule sono state lavate e quindi legate con PE anti-IgG umana (Caltag) a 20 µg/ml per 25 minuti su ghiaccio. Le cellule rhesus sono state inoltre co-colorate con CD3 FITC e CD4 APC (BD Biosciences) per distinguere i linfociti T CD4+.

Tutti i campioni sono stati fatti andare su un Beckman Dickinson FACSCalibur e l'intensità media di fluorescenza dei dati di legame di PD-L1 in funzione della concentrazione degli anticorpi anti-PD-L1 è stata analizzata usando il software FlowJo® di Tree Star, Inc.; i valori di EC₅₀ (concentrazione dell'anticorpo associata al legame semi-massimale) sono stati calcolati usando Kaleidagraph. In aggiunta, studi su legame all'equilibrio sono stati eseguiti per definire le affinità accurate (Kds) per il legame di YW24355S70 legame a PD-L1 umano e di topo espresso su cellule 293 (Esempio 3B). Questi valori sono riepilogati sotto nella Tabella 3:

Tabella 3
Riepilogo di EC₅₀

Species	EC ₅₀ (nm) FACS	Kd (nM) Equilibrium radioligand binding
Human	0.4	0.4
Rhesus	0.3	
Mouse	0.3	0.13
Rat	0.8	

[“Species” = Specie;
 “Equilibrium radioligand binding” = Legame del radioligando all'equilibrio;
 “Human” = Essere umano;
 “Rhesus” = Macaco rhesus;
 “Mouse” = Topo;
 “Rat” = Ratto.]

ESEMPIO 3B

Misurazione dell'affinità di anticorpi anti-PD-L1 a PD-L1 umano e di topo - Legame all'Equilibrio Saggio di Legame di Cellule

Radioligandi

Cellule 293 trasfettate con PD-L1 umano o di topo sono state coltivate in terreno di crescita, che consisteva di terreno RPMI 1640 integrato con 10% di siero bovino fetale (FBS), 2 mM L-glutamina, 1X penicillina-streptomicina, a 37° C in 5% CO₂. Le cellule sono state lavate con tampone di legame (50:50 DMEM/F12 con 2% FBS e 50 mM Hepes, pH 7,2) e sono state poste in piastre a 96 pozzetti a circa 230.000 cellule in 0,2 ml di tampone di legame. L'anticorpo anti-PD-L1, YW243.55.S70.hIgG, è stato iodato utilizzando il procedimento iodogeno. Gli anticorpi anti-PD-L1 radioetichettati sono stati purificati da ¹²⁵I-NA libero mediante gel filtrazione usando una colonna NAP-5; l'anticorpo purificato aveva un'attività specifica di 17,41 µCi/µg. Le miscele di reazione di competizione di volume di 50 µl contenenti una concentrazione fissa di anticorpo iodato e concentrazioni decrescenti di anticorpo non etichettato diluito in modo seriale sono state poste in piastre a 96 pozzetti. Linee cellulari 293 trasfettanti stabili che esprimono PD-L1 umano e PD-L1 murino sono state coltivate in terreno di crescita, che consisteva di terreno 50:50 DMEM/F12 integrato con 10% di siero bovino fetale (FBS), 2 mM L-glutamina, 1X penicillina -streptomicina, a 37° C in 5% di CO₂. Le cellule sono state lavate con tampone di legame (50:50 DMEM/F12 con 2% FBS, 50 mM HEPES, pH 7,2 e 2 mM sodio azide) e sono state aggiunte ad una densità approssimativa di 200.000 cellule in 0,2 ml di tampone di legame ai 50 µl delle miscele di reazione di competizione. La concentrazione finale dell'anticorpo iodato in ogni reazione di competizione con cellule era ~ 150 pM (~ 120.000 cpms per 0,25 ml) e la concentrazione finale dell'anticorpo non etichettato nella reazione di competizione con cellule variava, a partire da 500 nM e poi diminuendo di 2 volte per 10 concentrazioni. Le reazioni di competizione con cellule sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente. La reazione di competizione con cellule per ogni concentrazione di anticorpo non etichettato è stata saggiata in triplicato. Dopo l'incubazione di 2 ore, le reazioni di competizione sono state trasferite a una piastra filtro Millipore Multiscreen e lavate 4X con tampone di legame per separare l'anticorpo iodato libero dal legato. I filtri sono stati contati su un contatore gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc. Wellesley, MA). I dati di legame sono stati valutati utilizzando il software NewLigand (Genentech), che utilizza l'algoritmo di adattamento di Munson e Robard per determinare l'affinità di legame dell'anticorpo. Musson et al., Anal. Biochem. 107: 220-39 (1980).

I valori di K_d come determinati dall'analisi di Scatchard corroborano i valori EC₅₀ del legame dell'anticorpo anti-PD-L1 a PD-L1 umano e di topo come mostrato nella Tabella 3.

ESEMPIO 4

Selettività e affinità degli anticorpi anti-PD-L1 (IC₅₀)

Questo esempio mostra il saggio di selettività e affinità di legame (IC₅₀) utilizzato per valutare gli anticorpi anti-PD-L1 a lunghezza intera della presente invenzione per la loro capacità di bloccare il legame di PD-L1 sia a PD-1 sia a B7.1.

Procedimenti:

hB7.1-Fc-biotina e hPD-1-Fc-biotina si legano a hPD-L1-Fc ELISA (Formato 4):

La piastra a 384 pozzetti Nunc Maxisorp è stata rivestita con 25 µl di 250 ng/ml hPD-L1-Fc in PBS per tutta la notte. Lavare i pozzetti tre volte con 0,05% Tween in PBS (Tampone di Lavaggio) su una micropiastra di lavaggio e bloccare i pozzetti con 0,5% BSA in PBS. Aggiungere 12,5 µl di concentrazione 2X di anticorpi a ciascun pozzetto in 0,05% di Tween, 0,5% di BSA in PBS (Diluyente del Saggio) e seguito da 12,5 µl di 250 ng/ml (concentrazione 2X) di hB7.1-Fc-biotina nel Diluyente del Saggio e incubare la piastra per un'ora e mezza con agitazione. Lavare i pozzetti sei volte con il tampone di lavaggio e aggiungere 25 µl di Streptavidina-HRP (1:40.000 in Diluyente del Saggio, GE Healthcare). Incubare la piastra per 30 minuti con agitazione e lavare i pozzetti sei volte con il tampone di lavaggio. Aggiungere 25 µl di substrato TMB (Kirkegaard e Perry Laboratories) per un'ora e arrestare la reazione con 25 µl di 1 M acido fosforico. Leggere l'assorbanza a 450 nm e analizzare i valori IC₅₀ come descritto nel saggio di legame a cellule ECL per il legame cellulare nell'esempio 1.

Formati 5, 6, 7:

Per il legame di hPD-1-Fc-biotina a hPD-L1-Fc (Formato 5), il formato è simile al saggio precedente, eccetto che hPD-1-Fc-biotina è stato usato al posto di hB7.1-Fc-biotina per il legame. Il tempo di reazione del substrato TMB è stato di 17 minuti.

Per il legame di mB7.1-Fc-biotina a mPD-L1-Fc (Formato 6), il formato è simile al Formato 5, eccetto che mPD-L1-Fc è stato utilizzato per rivestire le piastre invece di hPD-L1-Fc e mB7.1-Fc-biotina è stata utilizzata per il legame anziché l'hB7.1-Fc-biotina. Il tempo di reazione del substrato TMB è stato di 7 minuti.

Per il legame di mPD-1-Fc-biotina a mPD-L1-Fc (Formato 7), il formato è simile all'ELISA di topo menzionato in precedenza eccetto che mPD-1-Fc-biotina è stata usata per il legame anziché mB7.1-Fc-biotina. Il tempo di reazione del substrato TMB è stato di 5 minuti.

Risultati:

La valutazione della IC₅₀ dell'anticorpo anti-PD-L1 da fago maturato per affinità YW243.55.S70 per bloccare le interazioni tra le coppie di legame designate è riportata nella Tabella 4. YW243.55S70 è stato in grado di bloccare il legame di PD-L1 umano a hB7.1 Fc con una concentrazione inibitoria semi-massimale di 38 pM, una concentrazione relativamente paragonabile al suo valore IC₅₀ per bloccare l'interazione PD-L1/PD-1 (42 pM). Gli studi di Biacore che misurano la capacità di YW243.55S70 di bloccare entrambe le interazioni di PD-L1 con PD-1 e B7.1 erano compatibili con questi risultati ELISA (dati non mostrati).

Tabella 4

Anticorpo	Formato 4 hB7.1-biotina/hPD-L1 IC ₅₀ in pM	Formato 5 hPD-1-biotina/hPD-L1 IC ₅₀ in pM	Formato 6 mB7.1-biotina/mPD-L1 IC ₅₀ in pM	Formato 7 mPD-1-biotina/mPD-L1 IC ₅₀ in pM
YW243.55.S70	38	42	29	48

ESEMPIO 5Miglioramento dell'attività dei linfociti T CD4+ e CD8+ in vitro mediante anticorpo anti-PD-L1 anticorpo YW243.55.S70saggio in vitro PMEL/B16

Questo esempio mostra l'effetto degli anticorpi anti-PD-L1 dell'invenzione sull'attivazione di linfociti T CD8⁺ transgenici dei recettori di linfociti T PMEL, misurata dal potenziamento della produzione di γ -IFN in risposta al peptide melanocitico, gp100. In questa procedura, i linfociti T CD8⁺ sono ottenuti da topi transgenici PMEL TCR i cui linfociti T CD8⁺ esprimono un TCR specifico per il peptide gp100. A seguito della purificazione dei linfociti T CD8⁺, sono stati eseguiti diversi tumi di stimolazione per generare ed espandere i linfociti T CD8⁺ attivati, che poi a loro volta sovraregolano l'espressione di PD-1. Parallelamente, le cellule di melanoma B16 vengono trattate con IFN- γ per sovraregolare l'espressione del loro PD-L1. Quindi, le cellule vengono co-coltivate in presenza di anticorpi anti-PD-L1, e viene valutato l'effetto sulla produzione di IFN- γ . Le cellule B16 sono state scelte per la stimolazione terziaria poiché esprimono in maniera endogena bassi livelli di peptide gp100 (al contrario dell'applicazione esogena del peptide). Inoltre, poiché anche queste cellule non esprimono PD-L2, B7.1 o B7.2, l'effetto di segnalazione aggiuntiva non correlata a PD-L1 (per esempio segnalazione tramite CD28 o CTLA-4 o PD-L2 induceva la segnalazione tramite PD-1) viene minimizzato.

Saggio PMEL:

Come mostrato nella figura 3, gli anticorpi anti-PD-L1 potenziano sia la percentuale di linfociti T CD8⁺ PMEL che producono IFN- γ sia i livelli medi di IFN- γ prodotti in risposta alle quantità designate di peptide gp100.

Saggio in vitro D.011.10:

Un test simile che utilizza i linfociti T CD4⁺ Tg TCR Ova-specifici dimostra la potenziata proliferazione dei linfociti T in presenza di anticorpo anti-PD-L1 dopo la stimolazione precedente con Ova peptide per indurre l'espressione di PD-1 (Figura 4). Nella stimolazione finale, le cellule A20 B irradiate che esprimono PD-L1 sono state utilizzate per presentare le concentrazioni designate di Ova peptide ai linfociti T DO.11.10. In particolare, il contributo dell'asse PD-1/PD-L1 è più pronunciato a gradi più bassi di stimolazione del recettore dell'antigene, livelli che più

strettamente riflettono la grandezza fisiologicamente rilevante della stimolazione.

Materiali e metodi:

Il saggio PMEL

Stimolazione primaria (giorno 0-4)

Milza e linfonodi mesenterici sono stati raccolti da topi PMEL transgenici per i recettori dei linfociti T. Gli organi sono stati schiacciati in sospensioni di singole cellule e lisati di globuli rossi. I linfociti T CD8+ T sono stati isolati utilizzando il kit di isolamento dei linfociti T CD8+ e il separatore di cellule AutoMACS (Miltenyi Biotec) secondo le istruzioni del produttore.

La milza è stata isolata da un topo non-transgenico a sesso appaiato e schiacciata in una sospensione di cellule singole e i globuli rossi del sangue lisati. Le cellule sono state pulsate con 0,1 µg/ml di gp100-peptide per due ore a 37° C e lavate.

Le cellule sono state co-coltivate in una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti con 200.000 linfociti T PMEL CD8+ e 75.000 splenociti pulsati con gp100 per 4 giorni. Il terreno di coltura era il terreno di Dulbecco Modificato di Iscove + 10% di siero bovino fetale + 20 µM di HEPES di Dove, e diluizioni 1:100 dei seguenti integratori da Gibco: Gluta-MAX, piruvato di sodio, penicillina/streptomina e amminoacidi non essenziali.

Stimolazione secondaria (giorno 4-7)

Le culture PMEL sono state centrifugate e il terreno è stato aspirato usando una pipetta multicanale. Terreno fresco è stato aggiunto e mescolato per lavare le cellule, seguito da un'altra centrifugazione. La maggior parte del terreno è stata rimossa e sono stati aggiunti anticorpi (Herceptin®, YW243.55.S70 o nessuno) per una concentrazione finale di 10 µg/ml. Le condizioni sono state create in pozzetti in duplicato in modo tale che la produzione media di IFN-γ possa essere valutata al termine.

Le cellule DC-1 sono state pulsate con 0,1 µg/ml di peptide gp100 per 2 ore a 37 ° C e lavate. Le cellule DC-1 pulsate con Gp100 sono state aggiunte alle colture PMEL lavate a 40.000 cellule/pozzetto. PMEL e l'anticorpo DC-1 + sono stati co-coltivati per 3 giorni.

Terza stimolazione (giorno 7-8)

Un giorno prima della terza stimolazione il giorno 6, cellule di melanoma B16 sono state incubate con 20 ng/ml di IFN-γ di topo (R & D Systems) per tutta la notte per sovraregolare la loro espressione di PD-L1.

Il giorno 7, le colture PMEL sono state centrifugate e il terreno è stato aspirato usando una pipetta multicanale. Terreno fresco è stato aggiunto e mescolato, seguiti da un'altra centrifugazione. La maggior parte del terreno è stata rimossa e gli anticorpi sono stati aggiunti per una

concentrazione finale di 10 µg/ml.

Dopo una stimolazione per tutta la notte con IFN-γ, le cellule B16 sono state lavate e suddivise in tre gruppi per un'incubazione di due ore con o niente gp100, o gp100 a 1 ng/ml (gp100 basso) e gp100 a 10 ng/ml (gp100 alto). Le cellule sono state lavate e successivamente aggiunte alle culture lavate PMEL + anticorpo a 40.000 cellule per pozzetto e incubate insieme per tutta la notte.

Giorno 8: colorazione intracellulare con IFN-γ

Golgi-Plug (BD Biosciences) è stato aggiunto per le ultime 5 ore di coltura secondo le istruzioni del produttore. La colorazione intracellulare con IFN-γ è stata effettuata usando il kit BD Biosciences Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution secondo le istruzioni del produttore e tutti gli anticorpi di colorazione erano anche da BD Biosciences. Le cellule sono state colorate in superficie con CD8a PE e Thy1.1 FITC e colorate all'interno con IFN-γ APC a concentrazioni saturanti.

Tutti i campioni sono stati fatti andare su un Beckman Dickinson FACSCalibur e i dati sono stati analizzati utilizzando il software Tree Star, Inc. FLOWJO™.

DO11.10 dosaggio in vitro

Milza e linfonodi mesenterici da topi transgenici DO11.10 sono stati raccolti, schiacciati in sospensioni di singole cellule, e lisati di globuli rossi. Le cellule sono state coltivate per 72 ore ad una densità di 1×10^6 cellule per ml in piastre a 6 pozzetti con Ova peptide a 0,3 µM. Il terreno di coltura era RPMI 1640 + 10% siero fetale bovino + 20 µM HEPES e diluizioni 1:100 dei seguenti integratori da Gibco: Gluta-MAX, piruvato di sodio, penicillina/streptomina e amminoacidi non essenziali.

Dopo la stimolazione primaria, le cellule sono state raccolte e purificate per i linfociti T CD4⁺ usando un kit di purificazione di linfociti T CD4 di topo secondo le istruzioni del produttore (Miltenyi Biotec). I linfociti T CD4⁺ purificati sono stati quindi lasciati riposare per tutta la notte.

Il giorno dopo, le cellule sono state raccolte, lavate e co-coltivate con cellule A20 irradiate (10.000 rad). La co-coltura è stata creata in piastre a fondo a U a 96 pozzetti in pozzetti in triplicato, con 50.000 linfociti T CD4⁺ a 40.000 cellule A20 con Ova peptide titolato e anticorpo a una concentrazione finale di 20 µg/ml. Dopo 48 ore, le colture sono state pulsate per tutta la notte con 1 µCi/pozzetto di 3H-timidina e congelate il giorno successivo. Le piastre sono state successivamente scongelate, raccolte su un raccogliore di cellule, e lette su un contatore beta.

ESEMPIO 6

Proliferazione potenziata di linfociti T CD8+ umani in una Reazione Linfocitica Mista mediante Anti-PD-L1

La Figura 5 dimostra la capacità di un anti-PD-L1 (ad esempio, YW243.55.S1) di potenziare la proliferazione dei linfociti T CD8 umani in risposta alle cellule di un donatore con MHC non corrispondente. I linfociti T CD8+ rispondenti sono stati arricchiti dal sangue intero del donatore A usando prima linfociti T CD8+ RosetteSep® (StemCell Technologies) secondo le istruzioni del produttore. Le cellule sono state quindi diluite con un uguale volume di tampone fosfato isotonic (PBS) e separate mediante centrifugazione in gradiente mediante sovrapposizione su Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Dopo la separazione, le cellule sono state colorate con CD8 APC (BD Biosciences) e si è trovato che erano al 78% linfociti T CD8+. Le cellule sono state etichettate in maniera fluorescente con 2,5 µM colorante tracciante CFSE (Molecular Probes).

Per servire come cellule presentanti l'antigene allogeniche (APC), le cellule mononucleate sono state prima isolate da sangue intero dal donatore B e quindi private dei linfociti T CD3+. Il sangue è stato diluito con un uguale volume di PBS e le cellule mononucleate sono state isolate dopo centrifugazione in gradiente su Ficoll. Le cellule sono state colorate con CD3 FITC (BD Biosciences), lavate, e poi incubate con microgranuli anti-FITC (Miltenyi Biotec). Le cellule positive a CD3 FITC sono state quindi svuotate sul separatore di cellule AutoMACS (Miltenyi Biotec). Le cellule sono state quindi irradiate a 2500 rad in un irradiatore di cesio.

Le cellule sono state co-coltivate in una piastra a fondo piatto a 96 pozzetti con 150.000 linfociti T CD8+ e 150.000 APC per 5 giorni con anticorpi a 10 µg/ml. Il terreno di coltura era RPMI 1640 + 10% siero fetale bovino + 20 µM HEPES e diluizioni 1:100 diluizioni dei seguenti integratori da Gibco: Gluta-MAX, piruvato di sodio, penicillina/streptomina e amminoacidi non essenziali.

Il giorno 5, le cellule sono state raccolte, lavate e colorate con CD8-biotina seguita da streptavidina-PerCp (BD Biosciences). I campioni sono stati fatti correre su un Beckman Dickinson FACSCalibur e i dati sono stati analizzati utilizzando il software Tree Star, Inc. FlowJo.

Un potenziamento approssimativamente del 45% nella proliferazione dei linfociti T CD8 rispondenti alle cellule da un donatore con MHC non corrispondente è stato osservato in presenza dell'anti-PD-L1.

ESEMPIO 7

Effetti del blocco di PD-L1 sul modello di LCMV in vivo

I linfociti T in condizioni di stimolazione cronica hanno dimostrato di sovraregolare e sostenere l'espressione del recettore inibitore PD-1. La ligazione di PD-1 mediante uno dei suoi due ligandi PD-L1 e PD-L2 contribuisce allo stato refrattario della cellula T cronicamente attivata, attenuando la sua risposta all'antigene affine. Nei topi infettati in modo persistente con il virus della coriomeningite linfocitica (LCMV), il blocco di PD-1 o del suo ligando PD-L1 è sufficiente a rivitalizzare i linfociti T cronicamente refrattari, potenziando la grandezza e la qualità funzionale della risposta antivirale della cellula T. Allo stesso modo, gli esseri umani cronicamente infetti da HIV o HCV presentano linfociti T refrattari alla

simulazione la cui attività può essere migliorata in vitro mediante il blocco di PD-1 o PD-L1. Pertanto, l'attività di blocco di PD-L1 nel modello LCMV suggerisce potenziale terapeutico per aumentare l'immunità antivirale e anti-tumorale.

Per gli esperimenti in vivo di LCMV nel topo, abbiamo riformattato l'anticorpo anti-PD-L1 umanizzato (YW243.55S70), clonando le sequenze di regioni variabili di catene pesanti e leggere derivate da fago a monte dei domini costanti della catena pesante di IgG2a di topo e della catena leggera cappa di topo. Per prevenire la citotossicità mediata da anticorpo delle cellule esprimenti PD-L1, inibendo il legame del recettore Fc γ , le posizioni 265 (acido aspartico) e 297 (asparagina) sono state modificate in alanina (DANA). Shields, RL et al. J. Biol Chem 2001 276 (9): 6591-6604. Per testare la capacità dell'anticorpo anti-PD-L1 di potenziare l'immunità antivirale in un'infezione cronica, i topi sono stati infettati il giorno 0 con 2×10^6 unità formanti placche (pfu) del Clone 13 di LCMV o del ceppo Armstrong di LCMV come controllo di riferimento. Lo schema del progetto sperimentale appare nella figura 6. L'infezione con il clone 13 produce un'infezione cronica, caratterizzata da linfociti T che si espandono ma non sono in grado di eliminare efficacemente il virus, mentre Armstrong LCMV viene eliminato entro 8-10 giorni dall'infezione. Il giorno 14, i topi hanno iniziato il trattamento con anti-PD-L1 o con mIgG di controllo distribuiti a dosi di 10 mg/kg 3x/settimana. Il giorno 21 e 28 sono state eseguite analisi della funzionalità dei linfociti T CD8 e dei titoli virali nel sangue e nei tessuti.

In linea con i dati pubblicati di Barber et. Al., Nature 439: 682-7 (2006), questo esempio mostra la capacità dell'anticorpo anti-PD-L1 di potenziare la risposta linfocitica citotossica a LCMV dopo un regime di trattamento di 2 settimane in un'infezione cronica di LCMV. La Figura 7A mostra la percentuale di linfociti T CD8 che esprimono CD107a sulla loro superficie cellulare in risposta al peptide gp33 LCMV-specifico. L'espressione sulla membrana plasmatica di CD107a, normalmente espresso intracellularmente, accompagna il processo di degranulazione e serve quindi come marcatore surrogato per la degranulazione. Relativamente alla risposta delle cellule dell'infezione acuta con Armstrong LCMV, le cellule dagli animali infettati con il ceppo cronico, il clone 13, sono compromesse nella degranulazione (gruppo di controllo Ig), mentre il blocco PD-L1 è stato in grado di ripristinare la degranulazione di CD8+ a livelli paragonabili a quelli osservati nell'infezione con Armstrong. Analogamente, 7B dimostra l'accresciuta percentuale di linfociti T CD8 produttori IFN- γ in risposta a LCMV gp33 nel gruppo trattato con anti-PD-L1 rispetto al controllo con Ig.

Successivamente, è stato testato l'impatto dell'anticorpo anti-PD-L1 sulla riduzione o l'eliminazione del virus LCMV nel sangue e nei tessuti. Nella figura 8A, i grafici mostrano i titoli del virus nel tessuto indicato degli animali trattati con Ig di controllo e PD-L1 il giorno 21 e 28 dopo l'infezione con il Clone 13 di LCMV. Il trattamento con l'anticorpo è stato avviato il giorno 14 dopo l'infezione. Il blocco di PD-L1 ha determinato una riduzione molto significativa dei titoli virali nel sangue, nel fegato, nel cervello, nel polmone e nel rene. In maniera

impressionante, in 3 topi su 5, l'anticorpo α -PD-L1 ha ridotto i titoli di LCMV nel sangue a livelli inferiori alla rilevazione ($<1 \times 10^{-5}$). In un successivo esperimento di progetto comparabile, l'eradicazione del virus nel sangue e nel fegato è stata osservata in 5/5 topi trattati per 2 settimane con anti-PD-L1 a dosi di 10 mg/kg o 2 mg/kg 3x/settimana (dati non mostrati). Il grafico inferiore mostra la cinetica della riduzione dei titoli virali nel sangue e dimostra una riduzione media del 96,8% nel gruppo trattato con anti-PD-L1 il giorno 28 rispetto al controllo. Questi dati sostengono l'importanza del percorso PD-1/PD-L1 nell'inibire le risposte dei linfociti T nelle infezioni croniche e sono compatibili con gli effetti del blocco PD-L1 *in vitro* sui linfociti T ottenuti da umani con infezioni croniche come l'epatite C e l'HIV.

Materiali e metodi:

Determinare la produzione % di IFN-gamma da parte dei linfociti T CD8 in risposta al peptide gp33 di LCMV

Le milze sono state isolate da topi infetti ed è stata generata una sospensione di singole cellule schiacciando gli organi in terreno completo: IMDM (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) contenente 10% di siero bovino fetale inattivato termicamente, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml di penicillina/streptomina e 10 mM di 2-mercaptoetanololo. I globuli rossi sono stati lisati usando il tampone di lisi ACK (0,15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA). Per misurare le risposte dei linfociti T CD8 antigene-specifici, gli splenociti sono stati lavati in terreno completo e sono stati ristimolati *in vitro* per 4 ore con il peptide GP33 di LCMV (KAVYNFATC, ProImmune Inc., Bradenton, FL). 1×10^6 splenociti sono stati coltivati in piastre a fondo piatto a 96 pozzetti con 100 ng/ml di peptide GP33 in presenza di 100 unità/ml di interleuchina-2 umana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 1 $\mu\text{l/ml}$ di brefeldina A e 1 $\mu\text{l/ml}$ (diluizione 1:1000) di monensina (BD pharmingen) e anti-CD107a FITC (clone ID4B, BD Biosciences, San Jose, CA). Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate una volta in PBS contenente 2% di siero fetale bovino e i marcatori di superficie cellulare sono stati colorati utilizzando anticorpi coniugati con fluorocromo: anti-CD8 APC (clone 53.67, BD Biosciences, San Jose, CA) anti-CD4 PerCp-Cy5.5 (clone RM4-5, BD Biosciences, San Jose, CA) e anti-PD-1 PE (clone J43, BD Biosciences, San Jose, CA). La colorazione per IFN- γ intracellulare è stata effettuata utilizzando il kit Cytofix Cytoperm Plus (BD Biosciences, San Jose, CA) secondo le istruzioni del produttore usando anti-IFN- γ PE-Cy7 (clone XMG1.2, eBioscience Inc. San Diego, CA). Per rilevare il numero di linfociti T di CD8 specifici per GP33, splenociti freschi sono stati colorati con pentameri di GP33 (H2-Db collegati a APC, ProImmune Inc., Bradenton, FL) secondo le istruzioni del produttore. I dati sono stati raccolti utilizzando un BD FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA) e analizzati con il software FlowJo (Tree Star Inc. Ashland OR).

Determinazione dei titoli virali di LCMV:

Cellule di fibrosarcoma MC57 sono infettate con diluizioni seriali di 10 volte di omogenato di sangue o tessuto contenente LCMV in

IMDM completo. La reazione è quindi incubata per 2-6 ore a 37°C in un incubatore per coltura tissutale, quindi sovrapposto con DMEM contenente 1% metilcellulosa. Questo è seguito da incubazione per 3-5 giorni, quindi lo strato di metilcellulosa viene rimosso mediante aspirazione. Le cellule vengono fissate con PBS/paraformaldeide 4%, quindi permeabilizzate con 0,5% di Triton-X per 20 minuti, lavate in PBS, quindi bloccate in 10% FCS per 1 ora con lieve dondolio. La colorazione per LCMV è effettuata con anticorpo VL4 (1 ora), lavate 2X, quindi sviluppate con HRP anti-ratto (1:400) in tampone bloccante. Questo seguito da lavaggio 3X, quindi aggiunta di substrato di *o*-fenilene diammina (SIGMA P8806-50TAB 3 mg/compressa) ai pozzetti per lo sviluppo.

ESEMPIO 8

Bloccaggio di PD-L1 nel cancro

È ora evidente che molti tumori sfruttano l'espressione dei ligandi di PD-1 come un mezzo per attenuare le risposte anti-tumorali dei linfociti T. Parecchi tumori umani sono stati caratterizzati per esprimere livelli elevati di PD-L1 sia sui tumori sia sui leucociti che infiltrano il tumore e questa elevata espressione di PD-L1 è spesso associata con una prognosi peggiore. I modelli di tumore del topo dimostrano aumenti simili nell'espressione di PD-L1 nei tumori e dimostrano un ruolo per il percorso PD-1/PD-L1 nell'inibire l'immunità tumorale.

Qui noi presentiamo un esperimento che dimostra l'impatto del bloccare PD-L1 sulla crescita del tumore ortotopico delle cellule di carcinoma coloretale murino MC38.Ova in topi C57B6 singenici (Figura 9A). Queste cellule esprimono ovalbumina tramite trasduzione retrovirale ed esprimono PD-L1, ma non PD-L2 sulla superficie delle loro cellule come accertato mediante Citometria a Flusso (istogramma - Figura 10A). I topi sono stati inoculati per via sottocutanea con 0,5 milioni di cellule MC38.Ova il Giorno 0. Il Giorno 1 o il Giorno 14 (quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 250 mm³) 10 topi/gruppo sono stati trattati con 10 mg/kg di anti-PD-L1 (YW243.55S70-topo IgG2a-DANA), Ig di controllo, o anticorpo anti-CTLA4 bloccante, (UC10-4F10-11) 3x/settimana per la durata dello studio. Il blocco di PD-L1 o presto o in un intervento tardivo è altamente efficace come terapia con un agente singolo nel prevenire la crescita tumorale. Al contrario, il blocco di CTLA4, un'altra molecola inibitrice espressa sui linfociti T mostrava nessuna evidenza di inibire la crescita tumorale. Questi risultati dimostrano il ruolo unico dell'asse PD-1/PD-L1 su CTLA4/B7 nella soppressione della risposta immunitaria anti-tumorale e sostiene il potenziale per il trattamento di tumori umani con anticorpi che bloccano l'interazione di PD-L1 con pD-1 e B7.1.

Modello di tumore singenico MC38.Ova: procedimenti. Il Giorno 0, 70 animali sono stati inoculati per via sottocutanea con 0,5 milioni di cellule MC38.Ova in 100 microlitri di HBSS+matrigel. Iniziando il giorno D1, 20 topi sono stati reclutati in 2 gruppi di trattamento (vedere sotto: gruppo 1 o gruppo 2). I rimanenti 40 topi sono stati lasciati crescere i tumori fino al Giorno 14. Di questi 40, 30 topi con dimensione simile del tumore sono

stati reclutati in uno di 3 gruppi di trattamento (Gruppi 3-5). I topi sono stati misurati e i topi pesati 2x/settimana. I topi non reclutati nei gruppi di trattamento sotto riportati, a causa di volume tumorale dissimile sono stati sottoposti a eutanasia:

Gruppo 1: anticorpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µL, D1, 3x/settimana

Gruppo 2: anticorpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µL, D1, 3x/settimana

Gruppo 3: anticorpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µL, D14, 3x/settimana

Gruppo 4: anticorpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µL, D14, 3x/settimana

Gruppo 5: anticorpo anti-CTLA-4, 10 mg/kg IP, 100 µL, D14, 3x/settimana

***Gruppi 1 e 2 hanno iniziato il dosaggio il giorno D1; i Gruppi 3, 4, e 5 il giorno D14.

ESEMPIO 9

Combinazioni di anti-PD-L1 con altri agenti per fornire un effetto anti-tumorale o una Terapia Immuno-Potenziante - Modello MC38.Ova

Il Giorno 0, 150 animali sono stati inoculati per via sottocutanea con 0,5 milioni di cellule MC38.Ova in 100 microlitri di HBSS+matrigel. I topi sono stati lasciati crescere il tumore. I topi sono pesati e misurati 2x/settimana fino al Giorno 11 (quando il volume del tumore è tra 100-200 mm³). Il Giorno 11, successivamente alla misurazione del tumore, i topi sono reclutati in 1 dei 12 gruppi di trattamento sotto riportati. I topi non reclutati nei gruppi di trattamento sotto riportati, a causa di volume tumorale dissimile sono sottoposti a eutanasia. Il trattamento con Gemcitabina (Gruppo 4) inizia il giorno 12, mentre il trattamento per i restanti gruppi di anticorpo inizia il giorno 14. Tutti i volumi sono 100 µl in veicolo inerte, con dettagli aggiuntivi come riportato sotto:

Gruppo 1: anticorpo anti-gp120, 10 mg/kg IP, 100 µL, 3x/settimana x 5, n=10

Gruppo 2: anticorpo anti-PD-L1, 10 mg/kg IP, 100 µL, 3x/settimana x 5, n=10

Gruppo 3: anticorpo anti-VEGF, 5 mg/kg IP, 100 µL, 2x/settimana x 5, n=10

Gruppo 4: Gemcitabine, 40 mg/kg IP, 100 µl, Giorno 12, 16, 20, n=10

Gruppo 5: anticorpo anti-PD-L1 + anticorpo anti-gp120, n=10

Gruppo 6: anticorpo anti-PD-L1 + anticorpo anti-VEGF, n=10

Gruppo 7: anticorpo anti-PD-L1 + Gemcitabina, n=10

Gruppo 8: anticorpo anti-gp120 + Gemcitabina, n=10

Gruppo 9: anticorpo anti-gp120 + anti-VEGF, n=10

Giorno 12: I topi dal gruppo 1 sono fatti sanguinare (100 microlitri) retro-orbitalmente sotto anestesia per l'analisi CBC.

Giorno 14 e Giorno 22: I topi dal gruppo 4 sono fatti sanguinare (100 microlitri) retro-orbitalmente sotto anestesia per l'analisi CBC.

Giorno 19: Tutti i topi, eccetto il gruppo 4, sono fatti sanguinare (100 microlitri) retro-orbitalmente sotto anestesia per l'analisi CBC.

Giorno 26: Tutti i topi, eccetto il gruppo 4, sono fatti sanguinare (100 microlitri) retro-orbitalmente sotto anestesia per l'analisi PK.

I tumori sono misurati e i topi pesati 2X/settimana. Gli animali che presentano una perdita di peso >15% saranno pesati quotidianamente e sottoposti a eutanasia se perdono >20% del peso corporeo. I topi saranno sottoposti a eutanasia quando i volumi dei tumori superano 3000 mm³, o dopo 3 mesi se i tumori non si formano.

Questo studio mostra (Figura 10) che il blocco di PD-L1 era più efficace di α -VEGF e di un regime induttivo di gemcitabina da sola.

ESEMPIO 10

Espressione di anticorpo anti-PD-L1 in cellule di mammifero

Questo esempio illustra la preparazione di forme potenzialmente glicosilate di anticorpo anti-PD-L1 mediante l'espressione ricombinante in cellule di mammifero.

Il vettore, pRK5 (vedere EP 307,247, pubblicato il 15 marzo 1989), è impiegato come vettore di espressione. Facoltativamente, il DNA codificante la catena leggera e/o pesante dell'anticorpo è ligata in pRK5 con enzimi di restrizione selezionati per permettere l'inserzione di tale DNA usando i procedimenti di ligazione come descritto in Sambrook et al., supra.

In una forma di realizzazione, le cellule ospite selezionate possono essere cellule 293. Cellule 293 umane (ATCC CCL 1573) sono fatte crescere fino a confluenza in piastre per coltura tissutale in terreno come integrato con siero di vitello fetale e facoltativamente, componenti nutrienti e/o antibiotici. Circa 10 μ g se il DNA codificante l'anticorpo pRK5 è mescolato con circa 1 μ g di DNA codificante il gene VA RNA [Thimmappaya et al., Cell, 31:543 (1982)] e sciolto in 500 μ L di 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl₂. A questa miscela sono aggiunti, goccia a goccia, 500 μ L di 50 mM HEPES (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO₄, e un precipitato viene lasciato formare per 10 minuti a 25°C. Il precipitato è sospeso e aggiunto alle cellule 293 e lasciato sedimentare per circa quattro ore a 37°C. Il terreno di coltura è rimosso mediante aspirazione e 2 ml di 20% glicerolo in PBS sono aggiunti per 30 secondi. Le cellule 293 sono quindi lavate con terreno privo di siero, viene aggiunto terreno fresco e le cellule sono incubate per circa 5 giorni.

Approssimativamente 24 ore dopo la trasfezione, il terreno di coltura è rimosso e sostituito con terreno di coltura (da solo) o terreno di coltura contenente 200 μ Ci/ml ³⁵S-cisteina e 200 μ Ci/ml ³⁵S-metionina. Dopo un'incubazione di 12 ore, il terreno condizionato viene raccolto,

concentrato su un filtro rotativo, e caricato su un gel SDS 15%. Il gel elaborato può essere essiccato ed esposto a una pellicola per un periodo di tempo selezionato per rivelare la presenza dell'anticorpo. Le colture contenenti cellule trasfettate possono subire ulteriore incubazione (in terreno privo di siero) e il terreno viene testato in biosaggi selezionati.

In una tecnica alternativa, l'anticorpo può essere introdotto in cellule 293 transitoriamente usando il procedimento con destrano solfato descritto da Somparyac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Le cellule 293 sono coltivate fino alla densità massima in un matraccio rotante e sono aggiunti 700 µg di DNA codificante l'anticorpo pRK5. Le cellule vengono prima concentrate dal matraccio rotante mediante centrifugazione e lavate con PBS. Il precipitato DNA-destrano è incubato sui residui cellulari per quattro ore. Le cellule sono trattate con 20% glicerolo per 90 secondi, lavate con terreno per coltura tissutale, e reintrodotte nel matraccio rotante contenente terreno per coltura tissutale, 5 µg/ml di insulina bovina e 0,1 µg/ml di transferrina bovina. Dopo circa quattro giorni, il terreno condizionato viene centrifugato e filtrato per rimuovere le cellule e i detriti. Il campione contenente l'anticorpo espresso può quindi essere concentrato e purificato mediante qualsiasi procedimento selezionato, come dialisi e/o cromatografia su colonna.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo può essere espresso in cellule CHO. Il DNA codificante l'anticorpo legato in pRK5 può essere trasfettato in cellule CHO usando reagenti noti come CaPO₄ o DEAE-destrano. Come descritto sopra, le colture cellulari possono essere incubate, e il terreno sostituito con terreno di coltura (da solo) o terreno contenente una radioetichetta come ³⁵S-metionina. Dopo avere determinato la presenza dell'anticorpo, il terreno di coltura può essere sostituito con terreno privo di siero. Preferibilmente, la colture sono incubate per circa 6 giorni, e quindi il terreno condizionato viene raccolto. Il terreno contenente l'anticorpo espresso può quindi essere concentrato e purificato mediante qualsiasi procedimento selezionato.

Le varianti dell'anticorpo etichettate con epitopi possono anche essere espresse in cellule CHO ospiti. Il DNA codificante l'anticorpo legato in pRK5 può essere subclonato dal vettore pRK5. L'insero del subclone può essere sottoposto a PCR per fondersi in griglia con un'etichetta epitopica selezionata come un'etichetta poli-his in un vettore di espressione di Baculovirus. Il DNA etichettato con poli-his codificante l'insero dell'anticorpo può quindi essere subclonato in un vettore guidato da SV40 contenente un marcatore di selezione come DHFR per la selezione di cloni stabili. Infine, le cellule CHO possono essere trasfettate (come descritto sopra) con il vettore guidato da SV40. L'etichettatura può essere eseguita, come descritto sopra, per verificare l'espressione. Il terreno di coltura contenente l'anticorpo espresso etichettato con poli-His può quindi essere concentrato e purificato mediante qualsiasi procedimento selezionato, come mediante cromatografia per affinità con Ni²⁺-chelato.

L'anticorpo può anche essere espresso in cellule CHO e/o COS mediante una procedura di espressione transitoria o in cellule CHO

mediante un'altra procedura di espressione stabile.

L'espressione stabile nelle cellule CHO è eseguita usando la procedura seguente. Le proteine sono espresse come un costrutto di IgG (immunoadesina) in cui le sequenze codificanti per le forme solubili (per esempio i domini extracellulari) delle rispettive proteine sono fuse alla sequenza di una regione costante di IgG1 contenente i domini cerniera, CH2 e CH2 e/o la sua forma etichettata con poli-His.

Successivamente all'amplificazione PCR, i rispettivi DNA vengono subclonati in un vettore di espressione di CHO usando tecniche standard come descritto in Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). I vettori di espressione di CHO sono costruiti per avere siti di restrizione compatibili 5' e 3' del DNA di interesse per permettere il comodo scorrimento dei cDNA=s. Il vettore usato per l'espressione nelle cellule CHO è descritto in Lucas et al., *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779) (1996), e usa il promotore/potenziatore precoce di SV40 per guidare l'espressione del cDNA di interesse e diidrofolato riduttasi (DHFR). L'espressione di DHFR permette la selezione per il mantenimento stabile del plasmide successivamente alla trasfezione.

Dodici microgrammi del DNA plasmidico desiderato sono introdotti in approssimativamente 10 milioni di cellule CHO usando i reagenti per trasfezione disponibili commercialmente SUPERFECT®(Quiagen), DOSPER® or FUGENE® (Boehringer Mannheim). Le cellule sono coltivate come descritto in Lucas *et al.*, *supra*. Approssimativamente 3×10^7 cellule sono congelate in una fiala per ulteriore crescita e produzione come descritto sotto.

Le fiale contenenti il DNA plasmidico sono scongelate posizionandole in un bagno d'acqua e mescolate vorticando. I contenuti sono pipettati in una provetta da centrifuga contenente 10 ml di terreno e centrifugati a 1000 giri/minuto per 5 minuti. Il supernatante viene aspirato e le cellule sono risospese in 10 ml di terreno selettivo (0,2 Φ m PS20 filtrato con 5% 0,2 Φ m siero bovino fetale diafiltrato). Le cellule sono quindi suddivise in aliquote in un agitatore rotante da 100 ml contenente 90 ml di terreno selettivo. Dopo 1-2 giorni, le cellule sono trasferite in un agitatore rotante da 250 ml riempito con 150 ml di terreno di crescita selettivo e incubate a 37°C. Dopo altri 2-3 giorni, agitatori rotanti da 250 ml, 500 ml e 2000 ml vengono seminati con 3×10^5 cellule/ml. Il terreno delle cellule viene cambiato con terreno fresco mediante centrifugazione e risospensione in terreno di produzione. Sebbene si possa impiegare qualsiasi terreno per CHO adatto, può effettivamente essere usato un terreno di produzione descritto nel Brevetto U.S. N. 5,122,469, emesso il 16 giugno 1992. Un agitatore rotante da produzione di 3L è seminato a $1,2 \times 10^6$ cellule/ml. Il giorno 0, viene determinato il numero di cellule e il pH. Il giorno 1, l'agitatore rotante viene campionato e comincia la spruzzatura con aria filtrata. Il giorno 2, l'agitatore rotante viene campionato, la temperatura spostata a 33°C, e vengono presi 30 ml di 500 g/l di glucosio e 0,6 ml di 10% antischiuma (*per esempio*, emulsione con 35% di polidimetilsilossano Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Durante tutta la

produzione, il pH viene regolato come necessario per tenerlo intorno a 7,2. Dopo 10 giorni, o finché la vitalità non cade sotto il 70%, la coltura cellulare viene raccolta mediante centrifugazione e filtrata attraverso un filtro 0,22 μ m. Il filtrato è stato o immagazzinato a 4°C o immediatamente caricato su colonne per la purificazione.

Per i costrutti etichettati con poli-His, le proteine sono purificate usando una colonna Ni-NTA (Qiagen). Prima della purificazione, imidazolo viene aggiunto al terreno condizionato a una concentrazione di 5 mM. Il terreno condizionato è pompato su una colonna Ni-NTA da 6 ml equilibrata a 4°C, in tampone 20 mM Hepes, pH 7,4, contenente 0,3 M NaCl e 5 mM imidazolo a una velocità di flusso di 4-5 ml/minuto. Dopo il caricamento, la colonna è lavata con tampone di equilibratura aggiuntivo e la proteina eluita con tampone di equilibratura contenente 0,25 M imidazolo. La proteina altamente purificata viene successivamente desalinizzata in un tampone per immagazzinamento contenente 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl e 4% mannitolo, pH 6,8, con una colonna 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) e immagazzinata a -80°C.

I costrutti di immunoadesina (contenenti Fc) sono purificati dal terreno condizionato come segue. Il terreno condizionato viene pompato su una colonna con Proteina A da 5 ml (Pharmacia) che era stata equilibrata in 20 mM tampone Na fosfato, pH 6,8. Dopo il caricamento, la colonna è lavata in maniera intensiva con tampone di equilibratura prima dell'eluizione con 100 mM acido citrico, pH 3,5. La proteina eluita viene immediatamente neutralizzata raccogliendo frazioni da 1 ml in provette contenenti 275 μ L di 1M tampone Tris, pH 9. La proteina altamente purificata viene successivamente desalinizzata in un tampone per immagazzinamento come descritto sopra per le proteine etichettate con poli-His. L'omogeneità è accertata mediante SDS gel di poliacrilammide e sequenziamento amminoacidico N-terminale mediante degradazione di Edman.

Esempio 11

Espressione di Anticorpo anti-PD-L1 in *E. coli*

Questo esempio illustra la preparazione di una forma non glicosilata di anticorpo anti-PD-L1 mediante espressione ricombinante in *E. coli*.

La sequenza di DNA codificante l'anticorpo anti-PD-L1 è inizialmente amplificata usando inneschi per PCR selezionati. Gli inneschi dovrebbero contenere siti per enzimi di restrizione che corrispondono ai siti per enzimi di restrizione sul vettore di espressione selezionato. Una varietà di vettori di espressione può essere impiegata. Un esempio di un vettore adatto è pBR322 (derivato da *E. coli*: vedere Bolivar et al., *Gene*, 2:95 (1977)) che contiene i geni per la resistenza all'ampicillina e alla tetraciclina. Il vettore è digerito con un enzima di restrizione e defosforilato. Le sequenze sono amplificate con PCR e quindi ligate nel vettore. Il vettore includerà preferibilmente sequenze che codificano per un gene di resistenza a un antibiotico, un promotore *trp*, una guida polihis (inclusi i primi sei codoni STII, sequenza polihis, e siti di clivaggio per

enterochinasi), la regione codificante NPOR, il terminatore trascrizionale lambda e un gene argU.

La miscela di ligazione è quindi usata per trasformare un ceppo di *E. coli* selezionato usando i procedimenti descritti in Sambrook et al., supra. I trasformanti sono identificati dalla loro capacità di crescere su piastre LB e le colonie resistenti all'antibiotico sono quindi selezionate. Il DNA plasmidico può essere isolato e confermato mediante analisi di restrizione e sequenziamento del DNA.

I cloni selezionati possono venire coltivati per tutta la notte in terreno di coltura liquido come brodo LB integrato con antibiotici. La coltura per tutta la notte può successivamente essere usata per inoculare una coltura su larga scala. Le cellule sono quindi coltivate fino a una densità ottica desiderata, durante la quale il promotore di espressione viene acceso.

Dopo avere coltivato le cellule per parecchie più ore, le cellule possono essere raccolte mediante centrifugazione. I residui cellulari ottenuti mediante centrifugazione possono essere solubilizzati usando vari agenti noti nella tecnica, e l'anticorpo solubilizzato può quindi essere purificato usando una colonna chelante con metallo in condizioni che permettano il legame stretto dell'anticorpo.

L'anticorpo anti-PD-L1 può anche essere espresso in *E. coli* in una forma etichettata con poli-His, usando la seguente procedura. Il DNA codificante l'anticorpo viene inizialmente amplificato usando inneschi per PCR selezionati. Gli inneschi contengono siti per enzimi di restrizione che corrispondono ai siti per gli enzimi di restrizione sul vettore di espressione selezionato, e altre sequenze utili che forniscono un efficace e affidabile inizio della traduzione, rapida purificazione su una colonna di chelazione con metallo, e la rimozione proteolitica con enterochinasi. Le sequenze amplificate con PCR, etichettate con poli-His sono quindi ligate in un vettore di espressione, che è usato per trasformare l'ospite *E. coli* basato sul ceppo 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). I trasformanti sono prima cresciuti in LB contenente 50 mg/ml carbenicillina a 30°C con agitazione finché si raggiunge una O.D.600 di 3-5. Le colture sono quindi diluite 50-100 volte in terreno CRAP (preparato mescolando 3,57 g di (NH₄)₂SO₄, 0,71 g di citrato di sodio A2H₂O, 1,07 g di KCl, 5,36 g di estratto di lievito Difco, 5,36 g di Sheffield hycase SF in 500 ml di acqua, come pure 110 mM MPOS, pH 7,3, 0,55% (p/v) glucosio e 7 mM MgSO₄) e cresciute per approssimativamente 20-30 ore a 30°C con agitazione. I campioni sono rimossi per verificare l'espressione mediante analisi SDS-PAGE, e la coltura in massa è centrifugata per far precipitare le cellule. I detriti cellulari sono congelati fino alla purificazione e al ripiegamento.

L'impasto di *E. coli* da fermentazioni da 0,5 a 1 L (6-10 g di detriti) è risospeso in 10 volumi (p/v) in tampone di 7M guanidina, 20 mM Tris, pH 8. Sodio solfito solido e sodio tetrionato è aggiunto per ottenere concentrazioni finali di 0,1 M e 0,02 M, rispettivamente, e la soluzione è agitata per tutta la notte a 4°C. Questo passaggio fornisce come risultato una proteina denaturata con tutti i residui di cisteina bloccati mediante solfitazione. La soluzione è centrifugata a 40.000 giri/minuto in una centrifuga Beckman Ultraventrifuge per 30 minuti. Il surnatante è

diluito con 3-5 volumi di tampone per colonna con chelati metallici (6 M guanidina, 20 mM Tris, pH 7,4) e filtrato attraverso filtri di 0,22 micron per chiarificare. A seconda delle condizioni, l'estratto chiarificato è caricato su una colonna con chelati metallici Ni-NTA Qiagen da 5 ml equilibrata nel tampone per colonna con chelati metallici. La colonna è lavata con tampone aggiuntivo contenente 50 mM imidazolo (Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4. La proteina è eluita con tampone contenente 250 mM imidazolo. Le frazioni contenenti la proteina desiderata sono state riunite e immagazzinate a 4°C. La concentrazione di proteina è stimata dalla sua assorbanza a 280 nm usando il coefficiente di estinzione calcolato sulla base della sua sequenza amminoacidica.

Le proteine sono ripiegate diluendo il campione lentamente in tampone di ripiegamento appena preparato che consiste di: 20 mM Tris, pH 8,6, 0,3 M NaCl, 2,5 M urea, 5 mM cisteina, 20 mM glicina e 1 mM EDTA. I volumi di ripiegamento sono scelti in modo che la concentrazione di proteina finale sia tra 50 a 100 microgrammi/ml. La soluzione di ripiegamento è agitata gentilmente a 4°C per 12-36 ore. La reazione di ripiegamento è smorzata dall'aggiunta di TFA fino a una concentrazione finale di 0,4% (pH di approssimativamente 3). Prima di un'ulteriore purificazione della proteina, la soluzione è filtrata attraverso un filtro di 0,22 micron e acetonitrile è aggiunto fino a una concentrazione finale del 2-10%. La proteina ripiegata è cromatografata su una colonna in fase inversa Poros R1/H usando un tampone mobile di 0,1% TFA con eluizione con un gradiente di acetonitrile dal 10 all'80%. Aliquote di frazioni con assorbanza A280 sono analizzate su SDS gel di poliacrilammide e le frazioni contenenti proteina ripiegata omogenea sono riunite. In generale, le specie della maggior parte di proteine appropriatamente ripiegate sono eluite alle concentrazioni più basse di acetonitrile poiché quelle specie sono le più compatte con le loro parti interne idrofobe protette dall'interazione con la resina su fase inversa. Le specie aggregate sono solitamente eluite a concentrazioni di acetonitrile più alte. In aggiunta a risolvere forme mal ripiegate di proteine dalla forma desiderata, il passaggio su fase inversa rimuove anche endotossine dai campioni.

Le frazioni contenenti gli anticorpi desiderati anti-PD-L1 ripiegati sono riunite e l'acetonitrile rimosso usando un getto gentile di azoto diretto verso la soluzione. Le proteine sono formulate in 20 mM HEPES, pH 6,8 con 0,14 M cloruro di sodio e 4% mannitolo mediante dialisi o mediante gel filtrazione usando resine G25 Superfine (Pharmacia) equilibrate nel tampone per formulazione e filtrate per sterilizzarle.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo anti-PD-L1 a lunghezza intera bloccante e isolato comprendente una sequenza di regione variabile di catena pesante e una di catena leggera, in cui:

(a) la catena pesante comprende una HVR-H1, una HVR-H2 e una HVR-H3, in cui inoltre:

(i) la sequenza di HVR-H1 è GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:1);

(ii) la sequenza di HVR-H2 è AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:2);

(iii) la sequenza di HVR-H3 è RHWPGGFDY, e (SEQ ID NO:3);

(b) la catena leggera comprende una HVR-L1, una HVR-L2 e una HVR-L3, in cui inoltre:

(iv) la sequenza di HVR-L1 è RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 8);

(v) la sequenza di HVR-L2 è SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO: 9);

(vi) la sequenza di HVR-L3 è QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 10);

in cui X₁ = D, X₂ = S e X₃ = T, X₄ = D, X₅ = V, X₆ = S, X₇ = A e X₈ = V, X₉ = F e X₁₀ = Y, X₁₁ = Y, X₁₂ = L, X₁₃ = Y, X₁₄ = H e X₁₅ = A, e comprendente inoltre:

(c) sequenze comice di catena pesante della regione variabile giustapposte tra le HVR secondo la formula: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), e

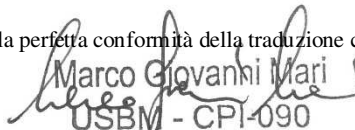
(d) sequenze comice di catena leggera della regione variabile giustapposte tra le HVR secondo la formula: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4),

in cui le sequenze comice di (c) e (d) sono derivate da sequenze comice di consenso umane, in cui la sequenza comice di consenso VH è una sequenza comice di consenso del sottogruppo III di Kabat e la sequenza comice di consenso VL è una sequenza comice di consenso kappa I di Kabat.

2. Composizione comprendente l'anticorpo anti-PD-L1 isolato e bloccante e almeno un carrier farmaceuticamente accettabile.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/12

FIGURA 1

“Figure” = Figura

“B7 family costimulation” = Costimolazione della famiglia B7

“Antigen-presenting cell” = Cellula presentante l’antigene

“Activation” = Attivazione

“Inhibition” = Inibizione

“T Cell” = Linfocita T

TAVOLA 2/12

FIGURA 2

“Figure” = Figura

“PMEL/B16 *in vitro* assay” = Saggio *in vitro* PMEL/B16

“Purified PMEL CD8+T” = PMEL CD8+T purificati

“3-day primary stim.” = Stimolazione primaria il giorno 3

“gp100-pulsed BL6 splenocytes” = Splenociti BL6 pulsati con gp100

“4-day restim.” = Ristimolazione il giorno 4

“gp100 pulsed DC-1” = DC-1 pulsate con gp100

“Activated gp100-specific CD8+T” = CD8+T specifici per gp100 attivati

“B16 melanoma cells” = cellule di melanoma B16

“Overnight incubation” = Incubazione per tutta la notte

“Upregulation of” = Sovraregolazione di

“3rd stim. with” = 3a stimolazione con

“gp100 pulse” = Impulso con gp100

“Enhancement of IFN- γ production” = Potenziamento della produzione di IFN- γ

TAVOLA 3/12

FIGURA 3

“Figure” = Figura

“Effect of Anti-PDL1 Antibody on IFN- γ production by PMEL CD8+T cells” = Effetto dell’anticorpo anti-PDL1 sulla produzione di IFN- γ da parte di linfociti T PMEL CD8+

“Fold increasi over isotype” = Aumento in volte rispetto all’isotipo

“Only” = da solo

“None” = Nessuno

“gp100 Peptide” = Peptide gp100

“of” = di

“Average MFI of IFN- γ ⁺ Cells” = MFI media di cellule IFN- γ ⁺

TAVOLA 4/12

FIGURA 4

“Figure” = Figura

“Effect of Anti-PD-L1 Antibody on CD4-T cell proliferation undergoing secondary stimulation” = Effetto dell’anticorpo anti-PD-L1 sulla proliferazione dei linfociti T CD4 in fase di stimolazione secondaria

“Proliferation” = Proliferazione

TAVOLA 5/12

FIGURA 5

“Figure” = Figura

“Effect of Anti-PD-L1 Ab on proliferation of human CD8 T cells in Mixed Lymphocyte Reaction” = Effetto di Ab anti-PD-L1 sulla proliferazione dei linfociti T CD8 in una reazione linfocitaria mista

“whole CD8+T ” = T CD8+ interi

“Day 5 human MLR” = Giorno 5 di MLR umana

“T cells only” = Solo linfociti T

“No treatment” = Nessun trattamento

“hIgG1 control Ab” = Anticorpo di controllo hIgG1

“Phage candidate” = Candidato fagico

“Non-blocking phage Ab” = Ab fagico non bloccante

TAVOLA 6/12

FIGURA 6

“Figure” = Figura

“Anti-PDL1 in Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) infection (Clone 13)” = Anti-PDL1 nell’infezione da virus della coriomeningite linfocitaria cronica (LCMV) (clone 13)

“Groups” = Gruppi

“Clone 13 LCMV chronic strain” = Ceppo cronico di LCMV clone 13

“mouse” = topo

“IgG1 control” = Controllo con IgG1

“mice” = topi

“Armstrong acute strain” = Ceppo acuto di Armstrong

“Uninfected” = Non infetto

“Day” = Giorno

“LCMV injection” = Iniezione di LCMV

“Analysis of CD8+T cells and viral titers in blood and tissues” = Analisi dei linfociti T CD8+ e dei titoli virali nel sangue e nei tessuti

TAVOLA 7/12

FIGURA 7A

“Figure” = Figura

“Effect of Anti-PD-L1 Ab on CD8 effector function in anti-PDL1 treated mice” = Effetto di Ab anti-PD-L1 sulla funzione di effettori CD8 in topi trattati con anti-PDL1

“Day” = Giorno

“ave CD107” = CD107 in media

“Uninfected” = Non infetti

FIGURA 7B

“Figure” = Figura

“IFN γ Assay” = Saggio con IFN γ

“Day” = Giorno

“ave IFN γ ” = IFN γ in media

“Pentamer” = Pentamero

TAVOLA 8/12

FIGURA 8

“Figure” = Figura

“Reduction of viral titers in serum and tissues in α -PD-L1 treated mice” = Riduzione dei titoli virali nel siero e nei tessuti in topi trattati con α -PD-

L1

“organ” = organo

“Blood” = Sangue

“Liver” = Fegato

“Brain” = Cervello

“Lung” = Polmone

“Kidney” = Rene

“Control Ig” = Ig di controllo

“Blood titers (longitudinal)” = Titoli ematici (longitudinali)

“Day” = Giorno

“% reduction compared to day matched control Ig” = % di riduzione rispetto alla Ig di controllo del medesimo giorno

“IgG1 control” = Controllo con IgG1

TAVOLA 9/12

FIGURA 9A

“Figure” = Figura

“Effect of late intervention with anti-PDL1 treatment in MC38.Ova colorectal model” = Effetto dell’intervento tardivo con trattamento anti-PDL1 nel modello MC38.Ova coloretale

“Mean tumor volume” = Volume medio del tumore

“Day” = Giorno

“Abs dosed 3x/wk at” = Ab dosati 3 volte alla settimana a

FIGURA 9B

“Figure” = Figura

“MC38-Ova cells express PD-L1” = Le cellule MC38-Ova esprimono PD-L1

“% of max” = % del massimo

“in culture” = In Coltura

TAVOLA 10/12

FIGURA 10

“Figure” = Figura

“Effect of treatment from PD-L1 Blockade alone and in combination with anti-VEGF or gemcitabine” = Effetto del trattamento da blocco di PD-L1 da solo e in combinazione con anti-VEGF o gemcitabina

“Mean tumor volume” = Volume medio del tumore

“Gemcitabine” = Gemcitabina

“Treatment day” = Giorno di trattamento

“12 days of experiment” = 12 giorni di esperimento

“Ab treatment” = Trattamento con Ab

TAVOLA 11/12

FIGURA 11A

“Figure” = Figura

“Heavy Chains” = Catene pesanti

“Contact” = Contatto

“consensus” = consenso

TAVOLA 12/12

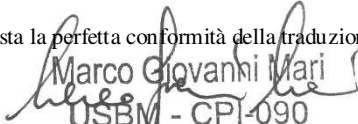
FIGURA 11B

“Figure” = Figura

“Light Chains” = Catene Leggere

“Contact” = Contatto

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede

Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

B7 Family Costimulation

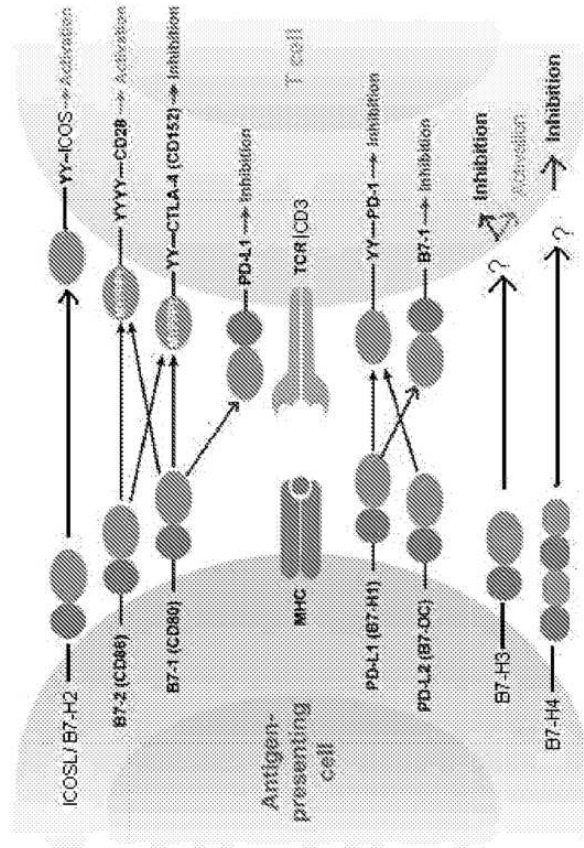


Figure 1

PMEL/B16 *in vitro* assay

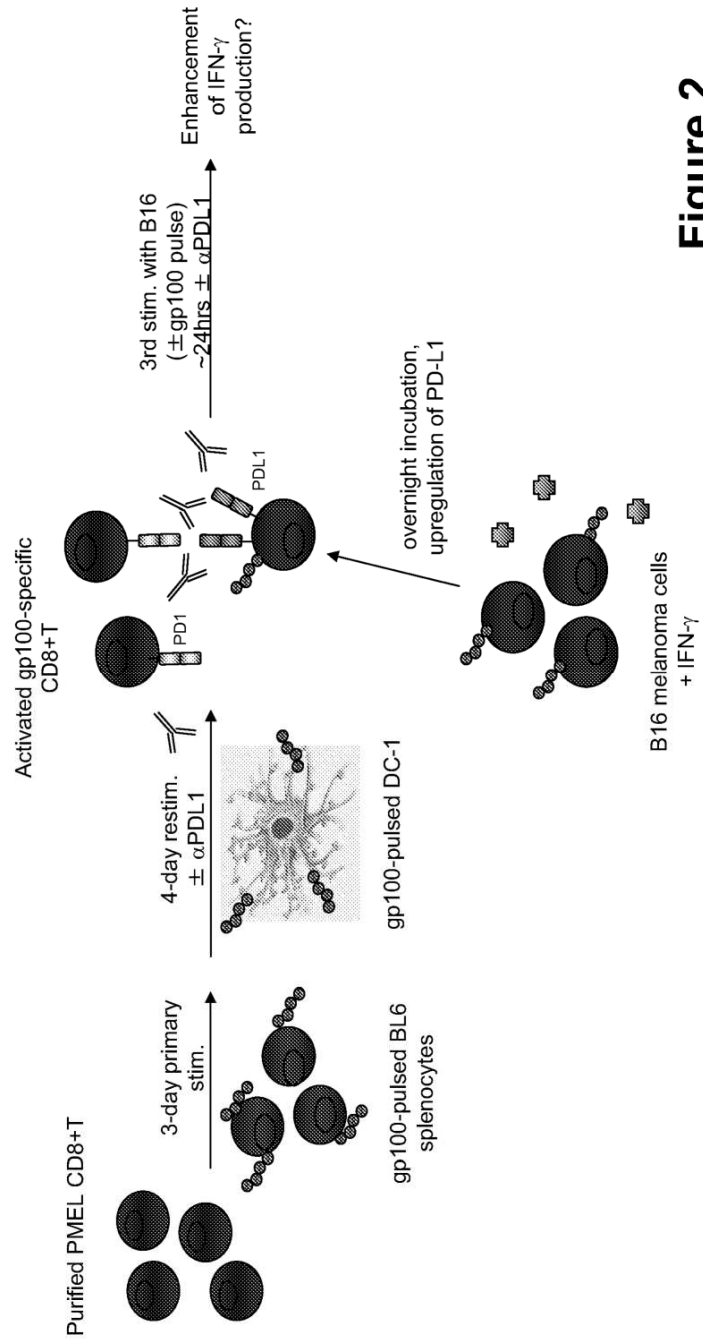


Figure 2

Effect of Anti-PDL1 Antibody on IFN- γ Production by PMEL CD8+T cells

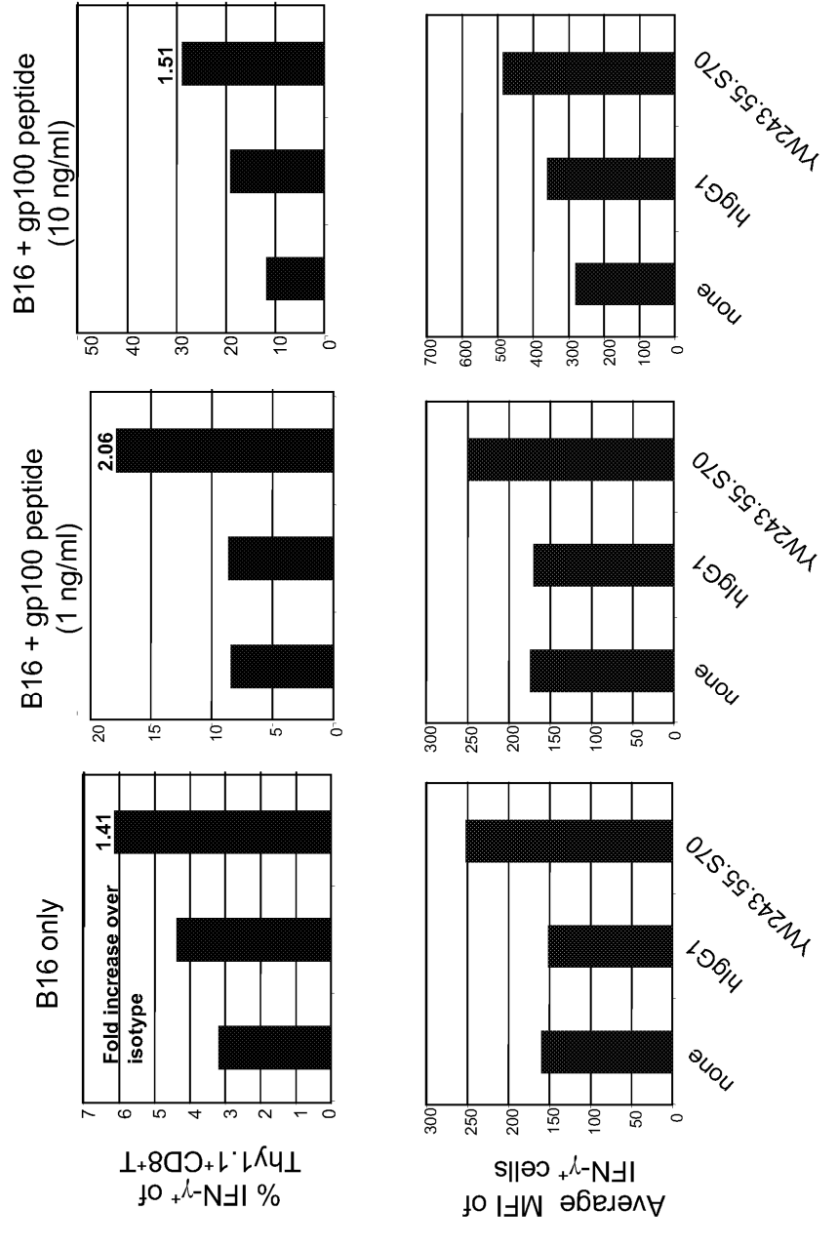


Figure 3

Effect of Anti-PD-L1 antibody on CD4-T Cell proliferation undergoing secondary stimulation

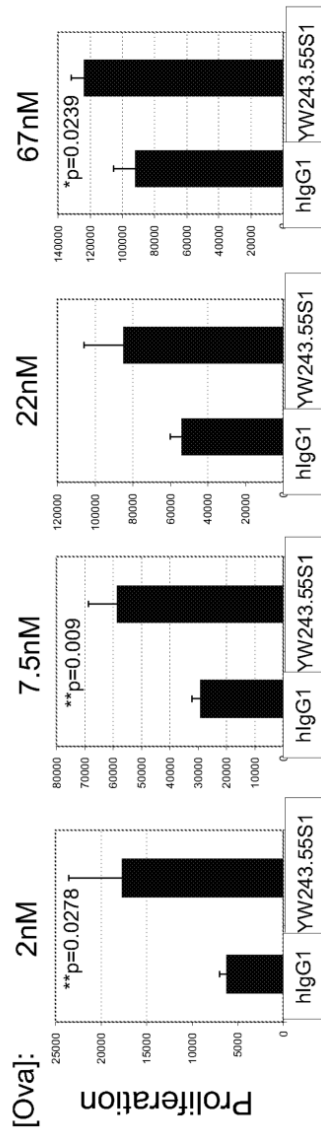


Figure 4

Effect of Anti-PD-L1 Ab on proliferation of human CD8 T cells in Mixed Lymphocyte Reaction

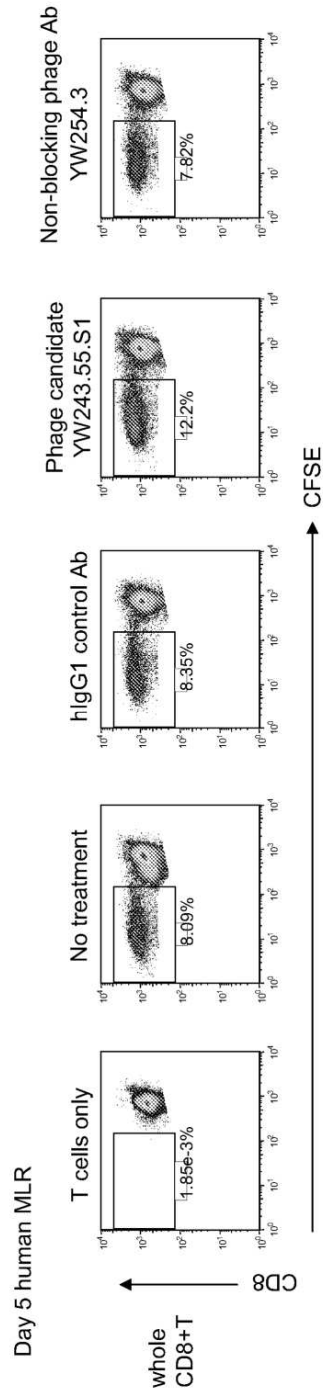


Figure 5

Anti-PDL1 in Chronic Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) infection (Clone 13)

- Groups:
- Clone 13 LCMV Chronic strain (2E6/mouse)
 1. IgG1 control: n=5 mice
 2. anti-PD-L1 YW243.55.S70 H/m: n=5 mice
 - Armstrong acute strain LCMV (2E6/mouse)
 - Uninfected

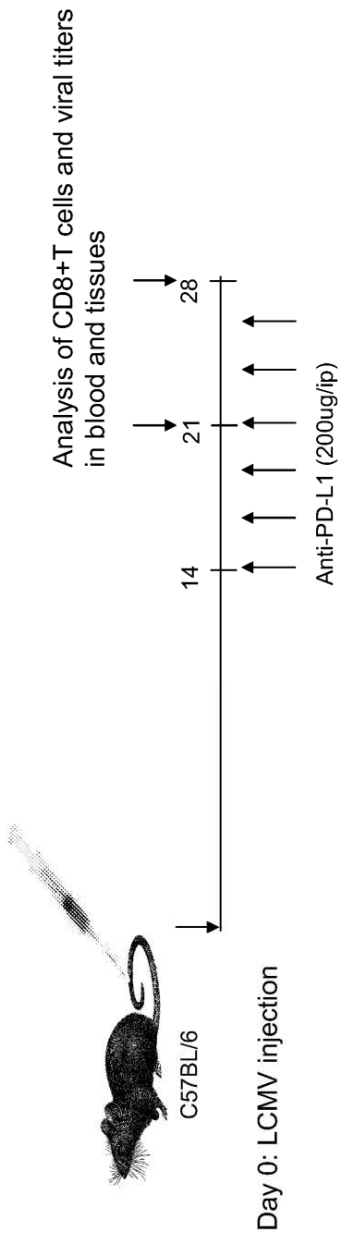


Figure 6

Reduction of viral titers in serum and tissues in α -PD-L1 treated mice

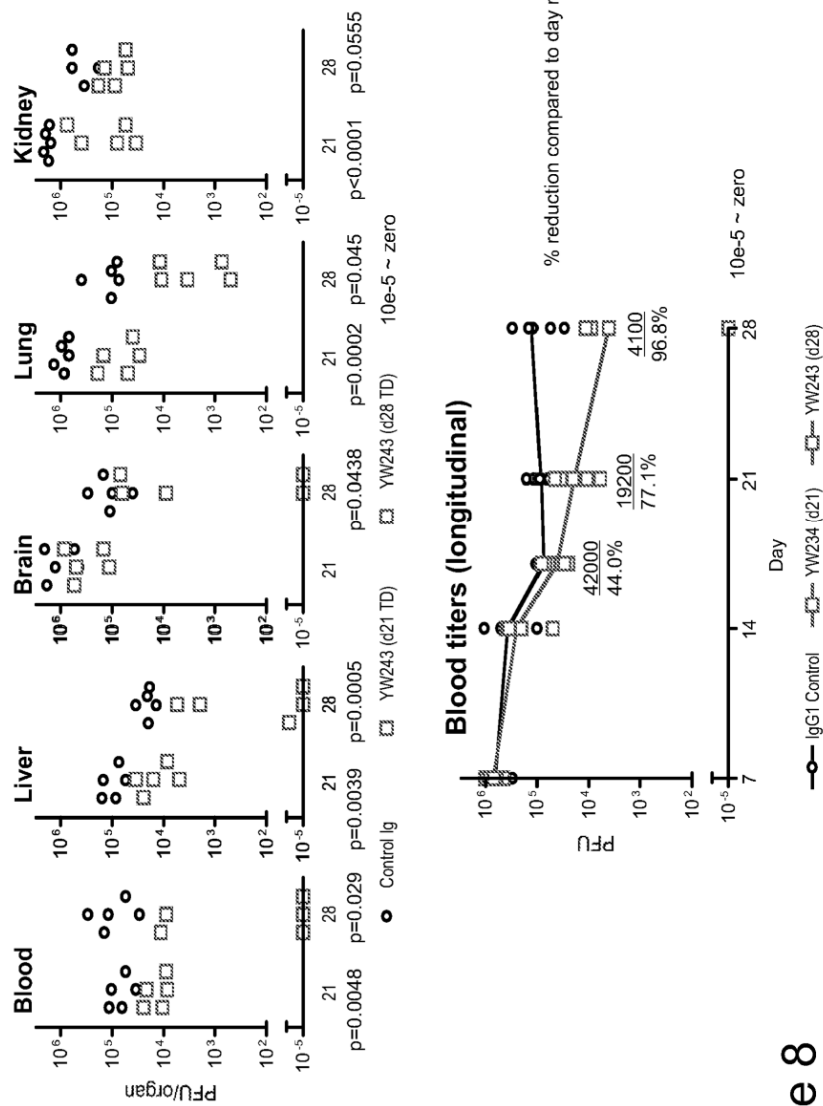


Figure 8

Effect of late intervention with anti-PDL1 treatment in MC38.Ova colorectal model

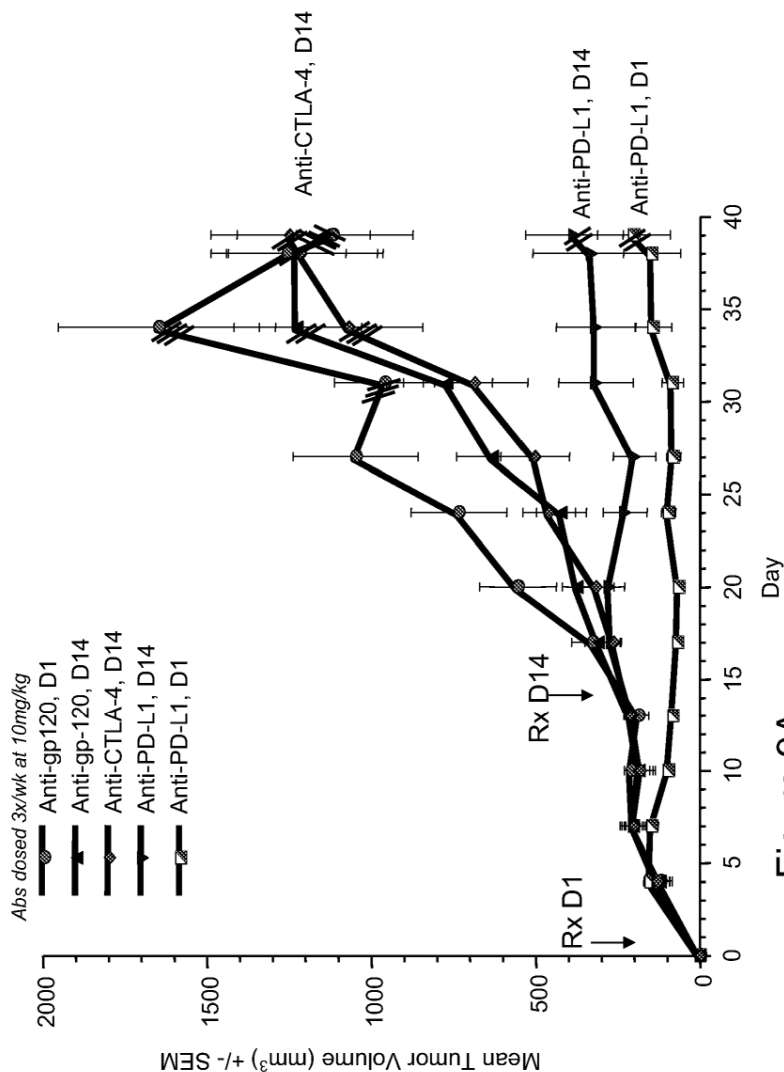


Figure 9A

MC38-Ova cells express PD-L1

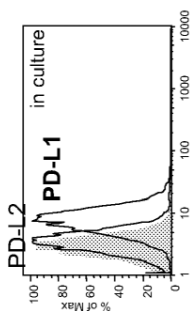


Figure 9B

Effect of treatment from PD-L1 blockade alone and in combination with anti-VEGF or Gemcitabine

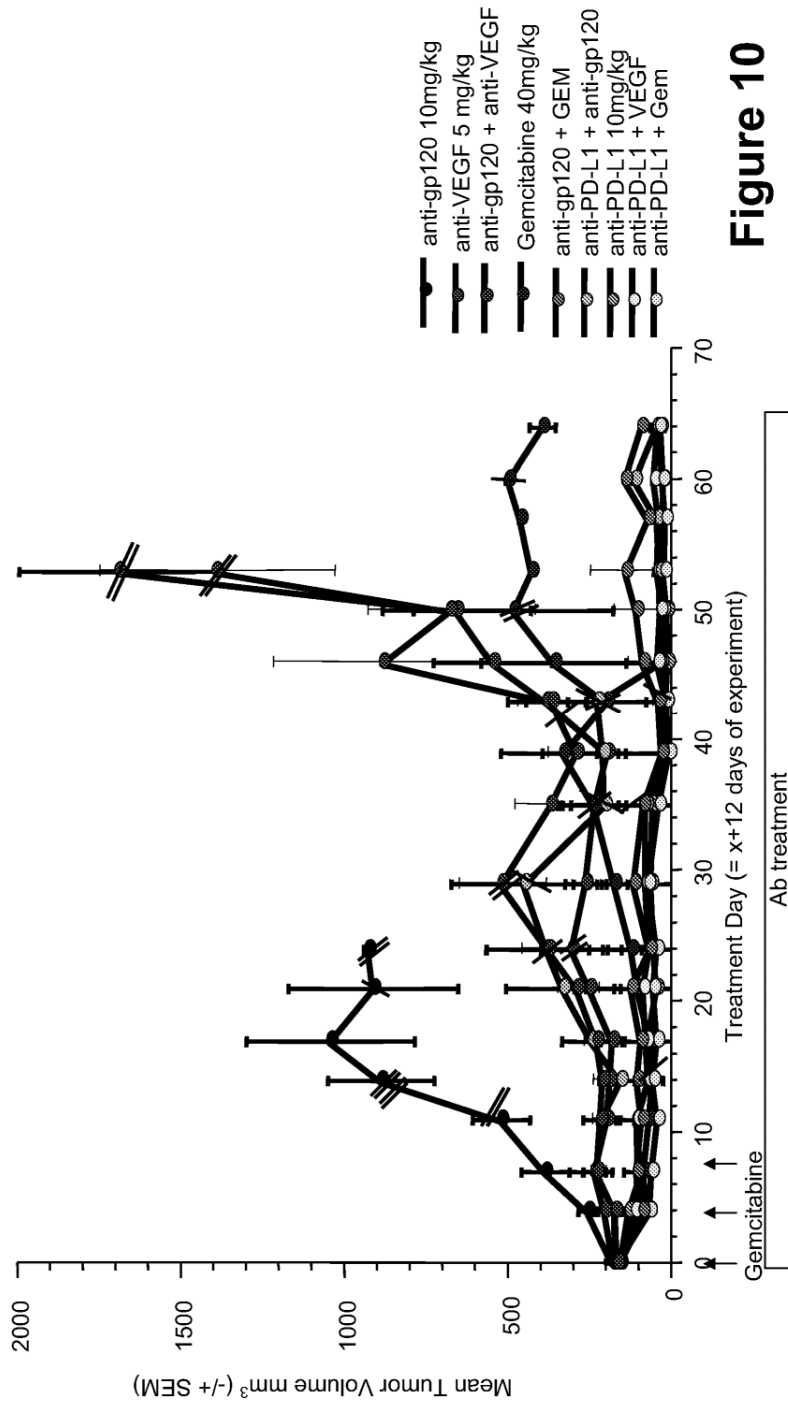


Figure 10

Heavy Chains

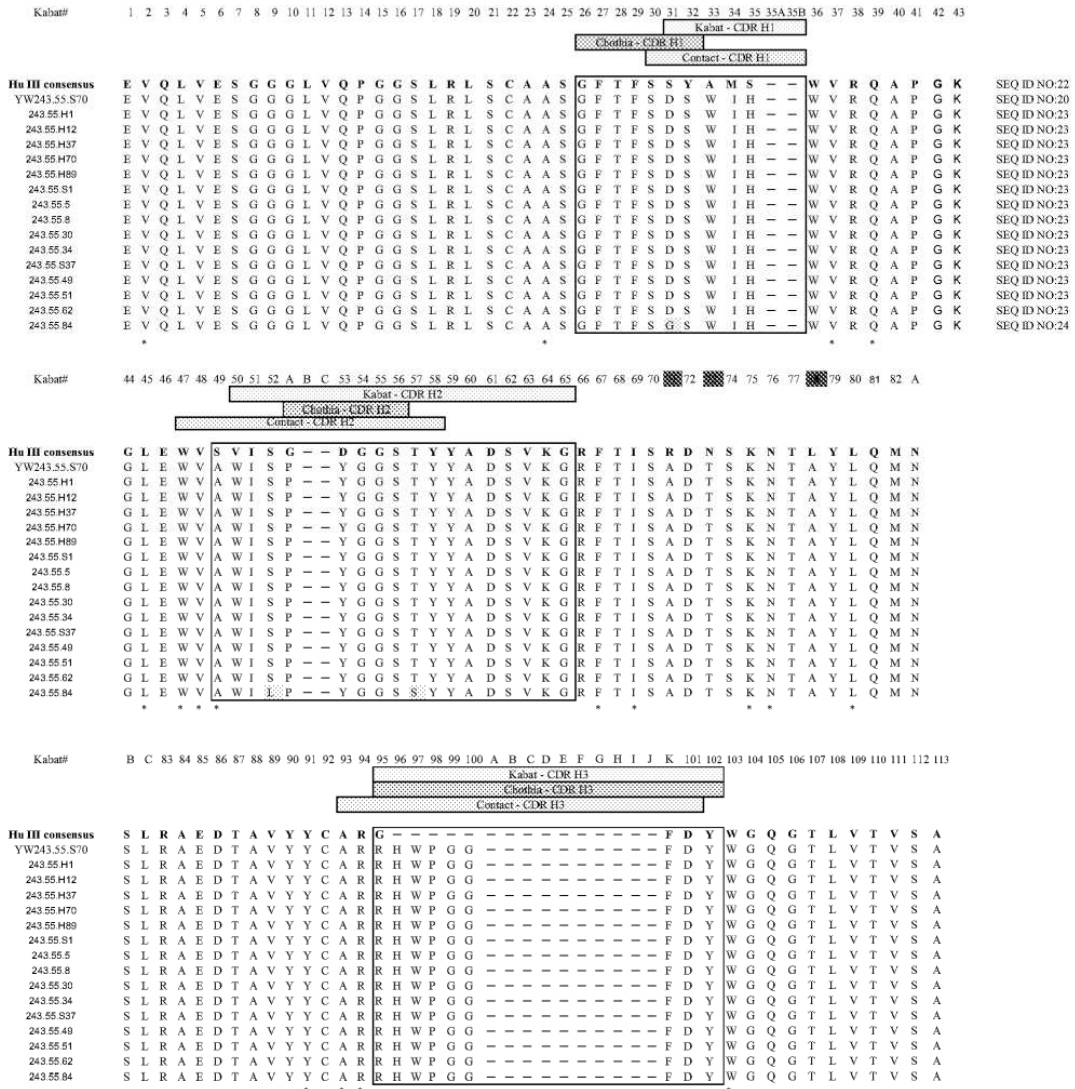


Figure 11A

