



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122022010183-6 B1

(22) Data do Depósito: 23/01/2015

(45) Data de Concessão: 30/01/2024

**(54) Título:** ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A PD-1, SEU MÉTODO PARA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS ISOLADAS, E VETORES

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/28.

**(30) Prioridade Unionista:** 19/06/2014 US 62/014,181; 23/01/2014 US 61/930,576.

**(73) Titular(es):** REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

**(72) Inventor(es):** NICHOLAS J. PAPADOPOULOS; ANDREW J. MURPHY; GAVIN THURSTON; ELLA IOFFE; ELENA BUROVA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2015012589 de 23/01/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/112800 de 30/07/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 25/05/2022

**(62) Pedido Original do Dividido:** BR112016016699-0 - 23/01/2015

**(57) Resumo:** A presente invenção fornece anticorpos que ligam-se à proteína de morte-1 programada de coinibidor de célula T (PD-1), e métodos de uso. Em várias modalidades da invenção, os anticorpos são anticorpos completamente humanos que ligam-se a PD-1. Em certas modalidades, a presente invenção fornece moléculas de ligação de antígeno multiespecíficas compreendendo uma primeira especificidade de ligação que liga-se a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação que liga-se a um antígeno de tecido autoimune, outro coinibidor de célula T, um receptor de Fc, ou um receptor de célula T. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para inibir ou neutralizar atividade de PD-1, desse modo fornecendo meios de tratar uma doença ou distúrbio tal como câncer ou uma infecção viral crônica. Em outras modalidades, os anticorpos são úteis para realçar ou estimular atividade de PD-1, desse modo fornecendo meios de tratar, por exemplo, uma doença autoimune ou distúrbio.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE A PD-1, SEU MÉTODO PARA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS ISOLADAS, E VETORES".**

Dividido do BR112016016699-0, depositado em 23.01.2015.

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção está relacionada a anticorpos humanos e fragmentos de ligação de antígeno de anticorpos humanos que especificamente ligam-se ao receptor imunomodulador morte-1 programada (PD-1), e métodos terapêuticos e diagnósticos de usar esses anticorpos.

#### DECLARAÇÃO DE TÉCNICA RELACIONADA

[002] Morte-1 programada (PD-1) (da mesma forma chamado CD279) é um receptor de proteína de aminoácido 288 expresso em células T e células B ativadas, células extermadoras naturais e monócitos. PD-1 é um membro da família de CD28/CTLA-4 (antígeno de linfócito T citotóxico) / ICOS (co-estimulador induzível) de receptores de co-inibitórios de célula T (Chen e outro 2013, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-242). A função primária de PD-1 é para atenuar a resposta imune (Riley 2009, Immunol. Rev. 229: 114-125). PD-1 tem dois ligantes, PD-ligante1 (PD-L1) e PD-L2. PD-L1 (CD274, B7H1) é expresso amplamente em tecidos linfóides e não linfóides tal como células T de CD4 e CD8, células de linhagem de macrófago, tecidos periféricos bem como em células de tumor, células viralmente infectadas e células de tecido autoimunes. PD-L2 (CD273, B7-DC) tem uma expressão mais restringida do que PD-L1, sendo expresso em células dendríticas ativadas e macrófagos (Dong e outro 1999, Nature Med.). PD-L1 é expresso na maioria dos cânceres humanos, incluindo melanoma,

glioma, câncer do pulmão de célula não pequena, carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, leucemia, câncer pancreático, carcinoma de célula renal, e carcinoma hepatocelular, e pode ser induzível em quase todos os tipos de câncer (Zou e Chen 2008, *Nat. Rev. Immunol.* 8: 467-77). Ligação de PD-1 a seus ligantes resulta em proliferação de célula T diminuída e secreção de citocina, comprometendo respostas imunes humorais e celulares em doenças tal como câncer, infecção viral e doença auto-imune. Bloqueio de ligação de PD-1 para reverter imunossupressão foi estudado em imunoterapia autoimune, viral e de tumor (Ribas 2012, *NEJM* 366: 2517-2519; Watanabe e outro 2012, *Clin. Dev. Immunol.* Volume 2012, Article ID: 269756; Wang e outro 2013, *J. Hep Viral.* 20: 27-39).

[003] Moléculas co-estimuladoras e co-inibitórias de célula T (coletivamente nomeadas moléculas de co-sinalização) desempenham um papel crucial em regulação de ativação de célula T, diferenciação de subconjunto, função efetora e sobrevivência (Chen e outro 2013, *Nature Rev. Immunol.* 13: 227-242). Segundo reconhecimento seguinte de complexos de peptídeo-MHC cognato em células de apresentação de antígeno pelo receptor de célula T, receptores de co-sinalização co-localizam com receptores de célula T na sinapse imune, onde eles sinergizam com sinalização de TCR para promover ou inibir ativação e função de célula T (Flies e outro 2011, *Yale J., Biol. Med.* 84: 409-421). A última resposta imune é regulada por um equilíbrio entre sinais co-estimuladores e co-inibitórios (“pontos de controle”) (Pardoll 2012, *Nature* 12: 252-264). PD-1 funciona como um tal ‘ponto de controle imune’ mediando-se tolerância de célula T periférica e evitando autoimunidade. PD-1 liga-se a PD-L1 ou PD-L2 e inibe ativação de célula T. A capacidade de PD1 inibir ativação de célula T é explorada por infecções virais crônicas e tumores para evadir resposta imune. Em infecções virais crônicas, PD-1 é altamente expresso em células T

específicas de vírus e estas células T tornam-se “gastas” com perda de funções efetoras e capacidade proliferativa (Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276). PD-L1 é expresso em uma ampla variedade de tumores e estudos em modelos animais mostrou que PD-L1 em tumores inibe ativação de célula T e lise de células de tumor e pode levar a morte aumentada de células T específicas de tumor. O sistema de PD-1:PD-L1 da mesma forma desempenha um papel importante em na indução de desenvolvimento de célula T reguladora (Treg) e função de Treg prolongada (Francisco e outro 2010, Immunol. Rev. 236: 219-242).

[004] Visto que PD-1 desempenha um papel importante em autoimunidade, imunidade de tumor e imunidade infecciosa, é um alvo ideal para imunoterapia. Bloqueio de PD-1 com antagonistas, incluindo anticorpos monoclonais, foi estudado em tratamentos de câncer e infecções virais crônicas (Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730).

[005] Anticorpos monoclonais para PD-1 são conhecidos na técnica e foram descritos, por exemplo, em Patente/Publicação US Nos. 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595, e em WO2006121168, WO20091154335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, EP2262837, e EP2504028.

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção fornece anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno do mesmo que liga-se a PD-1. Os anticorpos da presente invenção são úteis, entre outros, para alvejar células T expressando PD-1, e para modular atividade de PD-1. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para inibir ou neutralizar atividade de PD-1 e/ou para estimular ativação de célula T, por exemplo, sob circunstâncias onde morte mediada por célula T é benéfica ou desejável. Em modalidades alternadas, os anticorpos que aumentam ligação e/ou atividade de PD-1 e podem ser usados para

inibir ativação de célula T. Os anticorpos anti-PD-1 da invenção, ou porções de ligação de antígeno dos mesmos, podem ser incluídos como parte de uma molécula de ligação de antígeno multi-específica, por exemplo, para modular a resposta imune e/ou alvejar os anticorpos em um tipo de célula específico, tal como uma célula de tumor, uma célula de tecido autoimune ou uma célula viralmente infectada. Os anticorpos são úteis no tratamento de uma doença ou distúrbio tal como câncer, infecção viral e doença auto-imune.

[007] Os anticorpos da invenção podem ser de tamanho natural (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4) ou pode compreender apenas uma porção de ligação de antígeno (por exemplo, um fragmento de Fab, F(ab')<sub>2</sub> ou scFv), e podem ser modificados para afetar funcionalidade, por exemplo, para eliminar funções efetoras residuais (Reddy e outro, 2000, J., Immunol. 164:1925-1933). Em certas modalidades, os anticorpos podem ser biespecíficos.

[008] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais recombinantes isolados ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que especificamente liga-se a PD-1. Em certas modalidades, os anticorpos são completamente humanos. Anticorpos anti-PD-1 exemplares da presente invenção são listados aqui nas Tabelas 1-3. Tabela 1 menciona os identificadores de sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia pesada (HCVRs), regiões variáveis de cadeia leve (LCVRs), regiões de determinação de complementaridade de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3), e regiões de determinação de complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) dos anticorpos anti-PD-1 exemplares. Tabela 2 menciona os identificadores de sequência de ácido nucléico das HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dos anticorpos anti-PD-1 exemplares. Tabela 3 menciona os identificadores de sequência de aminoácido de cadeia

pesada e sequência de cadeia leve de anticorpos anti-PD-1 exemplares.

[009] A presente invenção fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de quaisquer das sequências de aminoácido de HCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0010] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de quaisquer das sequências de aminoácido de LCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente similar do mesmo tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0011] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma HCVR e um par de sequência de aminoácido de LCVR (HCVR/LCVR) compreendendo quaisquer das sequências de aminoácido de HCVR listadas na Tabela 1 emparelhada com quaisquer das sequências de aminoácido de LCVR listadas na Tabela 1. De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR contido dentro de quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR é selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202,

298/186, 306/186 e 314/186. Em certas modalidades, o par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR é selecionado a partir de um de SEQ ID NOs: 130/138 (por exemplo, H2M7795N), 162/170 (por exemplo, H2M7798N), 234/202 (por exemplo, H4xH9048P), ou 314/186 (por exemplo, H4xH9008P).

[0012] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia pesada CDR1 (HCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionado de quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0013] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia pesada CDR2 (HCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionado de quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0014] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia pesada CDR3 (HCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionado de quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0015] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia clara CDR1 (LCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionado de quaisquer das sequências de aminoácido

de LCDR1 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0016] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia leve CDR2 (LCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de quaisquer das sequências de aminoácido de LCDR2 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0017] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia leve CDR3 (LCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de quaisquer das sequências de aminoácido de LCDR3 listadas na Tabela 1 ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0018] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um HCDR3 e um par de sequência de aminoácido de LCDR3 (HCDR3/LCDR3) compreendendo quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR3 listadas na Tabela 1 emparelhadas com quaisquer das sequências de aminoácido de LCDR3 listadas na Tabela 1. De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um par de sequência de aminoácido de HCDR3/LCDR3 contido dentro de quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o par de sequência de aminoácido de HCDR3/LCDR3 é selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 136/144 (por exemplo, H2M7795N), 168/176 (por exemplo,

H2M7798N), 240/208 (por exemplo, H4xH9048P), e 320/192 (por exemplo, H4xH9008P).

[0019] A presente invenção fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de quaisquer das sequências de aminoácido de HC listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0020] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada de quaisquer das sequências de aminoácido de LC listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0021] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um HC e um par de sequência de aminoácido de LC (HC/LC) compreendendo quaisquer das sequências de aminoácido de HC listadas na Tabela 3 emparelhadas com quaisquer das sequências de aminoácido de LC listadas na Tabela 3. De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um par de sequência de aminoácido de HC/LC contido dentro de quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 3. Em certas modalidades, o par de sequência de aminoácido de HC/LC é selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 330/331, 332/333, 334/335, e 336/337.

[0022] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos, ou

fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um grupo de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contido dentro de quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o grupo de sequência de aminoácido de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 é selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 132-134-136-140-142-144 (por exemplo, H2M7795N); 164-166-168-172-174-176 (por exemplo, H2M7798N); 236-238-240-204-206-208 (por exemplo, H4xH9048P); e 316-318-320-188-190-192 (por exemplo, H4xH9008P).

[0023] Em uma modalidade relacionada, a presente invenção fornece anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo um grupo de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contido dentro de um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR como definido por quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos, ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, compreendendo o grupo de sequência de aminoácido de HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contido dentro de um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 130/138 (por exemplo, H2M7795N); 162/170 (por exemplo, H2M7798N); 234/202 (por exemplo, H4xH9048P); e 314/186 (por exemplo, H4xH9008P). Métodos e técnicas para identificar CDRs dentro de sequências de aminoácido de HCVR e LCVR são bem conhecidas na técnica e podem ser usadas para identificar CDRs dentro das sequências de aminoácido de HCVR e/ou LCVR especificadas descritas aqui. Convenções exemplares que podem ser usadas para identificar os limites de CDRs incluem, por exemplo, a definição de Kabat, a definição de Chothia, e a definição de AbM. Em termos gerais, a definição de Kabat está com

base em variabilidade de sequência, a definição de Chothia está com base no local das regiões de alça estruturais, e a definição de AbM é um compromisso entre as abordagens de Kabat e Chothia. Veja, por exemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani e outro, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); and Martin e outro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Bancos de dados públicos estão da mesma forma disponíveis para identificar sequências de CDR dentro de um anticorpo.

[0024] A presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 tendo um padrão de glicosilação modificado. Em algumas modalidades, modificação para remover sítios de glicosilação indesejáveis pode ser útil, ou um anticorpo necessitando de uma porção de fucose presente na cadeia de oligossacarídeo, por exemplo, para aumentar função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (veja Shield e outro (2002) *JBC* 277:26733). Em outras aplicações, modificação de galactosilação pode ser feita para modificar citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

[0025] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que competem para ligação específica a PD-1 com um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e LCVR cada tem uma sequência de aminoácido selecionada a partir das sequências de HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[0026] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos isolados e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que bloqueiam ligação de PD-1 a PD-L1 ou PD-L2. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo que bloqueia ligação de PD-1 a PD-L1 pode ligar-se ao mesmo

epítopo em PD-1 como PD-L1 ou pode ligar-se a um epítopo diferente em PD-1 como PD-L1.

[0027] Em modalidades alternadas, a presente invenção fornece anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que estimulam ligação de PD-1 a PD-L1. Em certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos isolados ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que liga-se a PD-1, em que os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos aumentam ligação de PD-1 a PD-L1. Em algumas modalidades, os anticorpos isolados ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos compreende as CDRs de uma HCVR, em que a HCVR tem uma sequência de aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 2, 98, e 250; e as CDRs de uma LCVR, em que a LCVR tem uma sequência de aminoácido selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 10, 106, e 202. Em algumas modalidades, os anticorpos isolados ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos compreendem um par de sequência de aminoácido de HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 2/10 (por exemplo, H1M7789N), 98/106 (por exemplo, H2M7791N), e 250/202 (por exemplo, H4H9068P2).

[0028] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que especificamente ligam-se a PD-1 de humano ou outras espécies. Em certas modalidades, os anticorpos podem ligar-se a PD-1 de humano e/ou a PD-1 de cinomolgos.

[0029] A presente invenção da mesma forma fornece anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que compete cruzado para ligação a PD-1 com um anticorpo de referência ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e LCVR cada qual tem uma

sequência de aminoácido selecionada a partir das sequência de HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[0030] Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo isolado ou fragmento de ligação de antígeno tendo uma ou mais das seguintes características: (a) bloqueia a ligação de PD-1 para PD-L1 ou PD-L2; (b) liga-se especificamente a PD-1 de humano e/ou PD-1 de cinomolgos; (c) bloqueia sub regulação de célula T induzida por PD-1 e resgata sinalização de célula T; (d) suprime crescimento de tumor e aumenta sobrevivência em indivíduos com câncer de cólon; (e) inibe proliferação de célula T em um ensaio de reação de linfócito misturado (MLR); e (f) aumenta IL-2 e/ou secreção de interferon-gama em um ensaio de MLR.

[0031] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo pode ligar-se especificamente a PD-1 de uma maneira agonista, isto é, pode aumentar ou estimular ligação e/ou atividade de PD-1; em outras modalidades, o anticorpo pode ligar-se especificamente a PD-1 de uma maneira antagonista, isto é, pode bloquear PD-1 de ligar-se a seu ligante.

[0032] Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno da presente invenção são biespecíficos compreendendo uma primeira especificidade de ligação a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação a um segundo epítopo de alvo. O segundo epítopo alvo podem ser outro epítopo em PD-1 ou em uma proteína diferente. Em certas modalidades, o epítopo alvo pode estar em uma célula diferente incluindo uma célula T diferente, uma célula B, uma célula de tumor, uma célula de tecido autoimune ou uma célula viralmente infectada.

[0033] Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucléico codificando anticorpos anti-PD-1 ou porções dos mesmos. Por exemplo, a presente invenção fornece

moléculas de ácido nucléico codificando quaisquer das sequências de aminoácido de HCVR listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0034] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de LCVR listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0035] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR1 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de HCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0036] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR2 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de HCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente

similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0037] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de HCDR3 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de HCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0038] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de LCDR1 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de LCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0039] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de LCDR2 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de LCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0040] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de LCDR3 listadas na Tabela 1; em certas modalidades a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de polinucleotídeo

selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de LCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso.

[0041] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam uma HCVR, em que a HCVR comprehende um grupo de três CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3), em que o grupo de sequência de aminoácido de HCDR1-HCDR2-HCDR3 é como definido por quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 1.

[0042] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam uma LCVR, em que a LCVR comprehende um grupo de três CDRs (isto é, LCDR1-LCDR2-LCDR3), em que o grupo de sequência de aminoácido de LCDR1-LCDR2-LCDR3 é como definido por quaisquer dos anticorpos anti-PD-1 exemplares listados na Tabela 1.

[0043] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam uma HCVR e uma LCVR, em que a HCVR comprehende uma sequência de aminoácido de quaisquer das sequências de aminoácido de HCVR listadas na Tabela 1, e em que a LCVR comprehende uma sequência de aminoácido de quaisquer das sequências de aminoácido de LCVR listadas na Tabela 1. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucléico comprehende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso, e uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de quaisquer das sequências de ácido nucléico de LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo

pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência a isso. Em certas modalidades de acordo com este aspecto da invenção, a molécula de ácido nucléico codifica uma HCVR e LCVR, em que a HCVR e LCVR são ambas derivadas do mesmo anticorpo anti-PD-1 listado na Tabela 1.

[0044] A presente invenção fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de cadeia pesada listadas na Tabela 3. A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de aminoácido de cadeia leve listadas na Tabela 3.

[0045] A presente invenção da mesma forma fornece moléculas de ácido nucléico que codificam ambas cadeia pesada (HC) e uma cadeia leve (LC), em que a HC compreende uma sequência de aminoácido de quaisquer das sequências de aminoácido de HC listadas na Tabela 3, e em que a LC compreende uma sequência de aminoácido de quaisquer das sequências de aminoácido de LC listadas na Tabela 3.

[0046] Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece vetores de expressão recombinantes capazes de expressar um polipeptídeo compreendendo uma região variável de cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-PD-1. Por exemplo, a presente invenção inclui vetores de expressão recombinantes compreendendo quaisquer das moléculas de ácido nucléico mencionadas acima, isto é, moléculas de ácido nucléico codificando quaisquer das sequências de HCVR, LCVR, e/ou CDR como mencionado na Tabela 1. A presente invenção da mesma forma fornece vetores de expressão recombinantes capazes de expressar um polipeptídeo compreendendo uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-PD-1. Por exemplo, a presente invenção inclui vetores de expressão recombinantes compreendendo quaisquer das moléculas de ácido nucléico mencionadas acima, isto é, moléculas de ácido nucléico que codificam quaisquer das sequências de cadeia

pesada ou cadeia leve como mencionado na Tabela 3. Da mesma forma incluído dentro do escopo da presente invenção são células hospedeiras em que tais vetores foram introduzidos, bem como métodos de produzir os anticorpos ou porções dos mesmos cultivando-se as células hospedeiras sob condições que permitem produção dos anticorpos ou fragmento de anticorpo, e recuperando os anticorpos e fragmentos de anticorpo desse modo produzidos.

[0047] Em um terceiro aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ligação de antígeno multi-específicas e fragmentos de ligação de antígeno das mesmas compreendendo uma primeira especificidade de ligação de antígeno que liga-se especificamente a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação de antígeno que liga-se especificamente a um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em um antígeno específico de célula de tumor, um antígeno específico de tecido autoimune, um antígeno específico de célula infectado, um co-inibidor de célula T, um receptor de célula T, um receptor de Fc, PD-L1, e PD-1. Em certas modalidades, a primeira especificidade de ligação de antígeno pode compreender três CDRs derivados de um HCVR com uma sequência de aminoácido selecionada a partir das sequências de HCVR na Tabela 1 e três CDRs derivados de um LCVR com uma sequência de aminoácido selecionada a partir das sequências de LCVR na Tabela 1. Em uma modalidade, a primeira especificidade de ligação de antígeno pode compreender o domínio extracelular de PD-L1. A segunda especificidade de ligação de antígeno pode alvejar um antígeno na mesma célula como PD-1 ou em uma célula diferente do mesmo tipo de tecido ou de um tipo de tecido diferente. Por exemplo, a molécula de ligação de antígeno multi-específica pode ligar-se a uma célula T em que a primeira especificidade de ligação de antígeno pode especificamente ligar-se a PD-1 e a segunda especificidade de ligação de antígeno pode ligar-se a um

receptor de célula T na célula T. Alternativamente, em outra modalidade, a primeira especificidade de ligação de antígeno pode especificamente ligar-se a PD-1 em uma célula T e a segunda especificidade de ligação de antígeno pode ser alvejada a um antígeno/receptor em uma célula B ou um macrófago ou célula de apresentação de antígeno. Em certas modalidades, a segunda especificidade de ligação de antígeno pode ser dirigida a um antígeno associado com um tecido autoimune. Em uma modalidade, a primeira especificidade de ligação de antígeno pode compreender um domínio extracelular de PD-L1 e a segunda especificidade de ligação de antígeno pode ligar-se a outro epítopo em PD-1. Em certas modalidades, a primeira especificidade de ligação de antígeno liga-se a PD-1 com uma afinidade mais baixa, por exemplo, com um  $K_D$  mais do que  $10^{-7}$  M, mais do que  $10^{-6}$  M, mais do que  $10^{-5}$  M, ou mais do que  $10^{-4}$  M.

[0048] Em um quarto aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo humano recombinante ou fragmento do mesmo que especificamente liga-se a PD-1 e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em um aspecto relacionado, a invenção caracteriza uma composição que é uma combinação de um anticorpo anti-PD-1 e um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo o agente terapêutico é qualquer agente que é vantajosamente combinado com um anticorpo anti-PD-1. Agentes exemplares que podem ser vantajosamente combinados com um anticorpo anti-PD-1 incluem, sem limitação, outros agentes que ligam-se e/ou modulam sinalização de PD-1 (incluindo outros anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, etc.) e/ou agentes que não diretamente ligam-se a PD-1 porém no entanto modulam ativação de célula imune. Terapias de combinação adicionais e co-formulações envolvendo os anticorpos anti-PD-1 da presente invenção são descritas em outro lugar aqui.

[0049] Em um quinto aspecto, a invenção fornece métodos para modular a resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção ao indivíduo em necessidade do mesmo. Em certas modalidades, a invenção fornece métodos para aumentar a resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento do mesmo da invenção que liga-se a PD-1 e bloqueia ligação de PD-1 a PD-L1. Em uma modalidade, a invenção fornece um método para estimular ou aumentar excitação de célula T em um indivíduo. Em uma modalidade, a invenção fornece métodos para inibir uma célula T reguladora (Treg) em um indivíduo, o métodos compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de bloqueio ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção ao indivíduo em necessidade do mesmo. Em certas modalidades, o indivíduo em necessidade pode sofrer de uma doença ou distúrbio da mesma tal como câncer ou infecção viral. Em modalidades alternadas, a invenção fornece métodos para inibir ou suprimir ativação de célula T em um indivíduo, o métodos compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de ativação ou fragmento do mesmo da invenção ao indivíduo em necessidade do mesmo. Em uma modalidade, o indivíduo pode sofrer de uma doença auto-imune ou distúrbio.

[0050] Em um sexto aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para tratar uma doença ou distúrbio tal como câncer, doença auto-imune ou infecção viral em um indivíduo usando um anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação de antígeno de um anticorpo da invenção, em que os métodos terapêuticos compreendem administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma

composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de um anticorpo da invenção ao indivíduo em necessidade do mesmo. O distúrbio tratado é qualquer doença ou condição que são aperfeiçoadas, melhoradas, inibidas ou prevenidas por estímulo ou inibição de atividade ou sinalização de PD-1. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo a invenção é administrada em combinação com um segundo o agente terapêutico ao indivíduo em necessidade do mesmo. O segundo o agente terapêutico pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em um anticorpo a outro co-inibidor de célula T, um anticorpo para um antígeno de célula de tumor, um anticorpo para um receptor de célula T, um anticorpo para um receptor de Fc, um anticorpo para um epítopo em um célula viralmente infectada, um anticorpo para um antígeno de tecido autoimune, um anticorpo para PD-L1, agente citotóxico, um fármaco anti-câncer, um fármaco antiviral, um fármaco antiinflamatório (por exemplo, corticosteroides), agente quimioterapêutico, terapia de radiação, um imunossupressor e qualquer outro fármaco ou terapia conhecidos na técnica. Em certas modalidades, o segundo o agente terapêutico pode ser um agente que ajuda neutralizar ou reduzir qualquer possível efeito(s) colateral(is) associado(s) com um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção, se ta(is) efeito(s) colatera(is) deveria(m) ocorrer.

[0051] Em certas modalidades, a presente invenção fornece métodos para suprimir crescimento de tumor. Em certas modalidades, a presente invenção fornece métodos para aumentar sobrevida de pacientes de câncer. Exemplos de câncer incluem, porém não são limitados a, câncer primário e/ou recorrente, incluindo câncer de cérebro (por exemplo, glioblastoma multiforme), câncer do pulmão (por exemplo, câncer do pulmão de célula não pequena), carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, carcinoma de célula renal,

melanoma, mieloma múltiplo, câncer de próstata, e câncer de cólon. Os métodos compreendem administrar uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 da presente invenção em combinação com um segundo agente terapêutico selecionado a partir do grupo consistindo em um antagonista de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (por exemplo, afibbercept, bevacizumabe), um inibidor de angiopoietina-2 (Ang2) (por exemplo, um anticorpo anti-Ang2 tal como nesvacumabe), um inibidor de gene de ativação de linfócito 3 (LAG-3), um inibidor de antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) (por exemplo, ipilimumabe), agente quimioterapêutico, e terapia de radiação. Exemplos adicionais de agentes de terapias/terapêuticos adicionais que podem ser usados em combinação com um anticorpo anti-PD-1 da invenção para uso no tratamento de câncer são descritos em outro lugar aqui.

[0052] O anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser administrado subcutaneamente, intravenosamente, intradermicamente, intraperitonealmente, oralmente, intramuscularmente, ou intracranianamente. O anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser administrado em uma dose de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal do indivíduo.

[0053] A presente invenção da mesma forma inclui uso de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio que beneficiariam do bloqueio ou reforço de ligação de PD-1 e/ou sinalização.

[0054] Outras modalidades se tornarão aparentes a partir de uma revisão da descrição detalhada resultante.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0055] **Figura 1** é um esquemático do bioensaio de PD-1 com, base em luciferase descrito aqui no Exemplo 8. Painel A: células de Jurkat

Inativas; Painel B: células de Jurkat são ativadas por receptor de célula T (TCR) agrupando através do anticorpo biespecífico CD3xCD20; Painel C: Ativação de PD-1 atenua resposta em células de Jurkat ativadas; Painel D: Bloqueio PD-1 salva a resposta em células de Jurkat ativadas.

[0056] **Figura 2** ilustra crescimento de tumor e resultados de sobrevivência para camundongos implantados com células de tumor Colon-26 no Dia 0 e tratados com as combinações indicadas de moléculas por injeção em Dias 3, 6, 10, 13 e 19 (“modelo de tumor de tratamento precoce”). O gráfico descreve volume de tumor (em mm<sup>3</sup>) para os grupos experimentais diferentes em vários pontos de tempo depois da implantação. Setas para cima ao longo do eixo X indicam a cronometragem de injeções de tratamento. “mlgG2a” é controle de isótipo de IgG2; “Fc” é controle de Fc humano; “Trap de VEGF” é afibbercept; “anti-PD-1” é clone de PD-1 anti-camundongo de RPMI-14; “anti-PD-L1” é um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 como descrito em outro lugar aqui.

[0057] **Figura 3** ilustra crescimento de tumor e resultados de sobrevivência para camundongos implantados com células de tumor Colon-26 no Dia 0 e tratados com as combinações indicadas de moléculas por injeção nos Dias 3, 6, 10, 13 e 19 (“modelo de tumor de tratamento precoce”). O gráfico mostra o volume de tumor (em mm<sup>3</sup>) de camundongos individuais em cada grupo experimental no Dia 28 depois de implantação. “mlgG2a” é controle de isótipo de IgG2; “Fc” é cpntrôle de Fc humano; “Trap de VEGF” é afibbercept; “anti-PD-1” é clone de PD-1 anti-camundongo RPMI-14; “anti-PD-L1” é um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 como descrito em outro lugar aqui.

#### DESCRÍÇÃO DETALHADA

[0058] Antes dos métodos presentes serem descritos, será entendido que esta invenção não é limitada a métodos particulares, e

condições experimentais descritas, como tal métodos e condições podem variar. Será da mesma forma entendido que a terminologia usada aqui é para o propósito de descrever modalidades particulares apenas, e não é pretendida ser limitante, visto que o escopo da presente invenção será limitado apenas pelas reivindicações anexas.

[0059] A menos que de outra maneira definido, todos termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como geralmente entendido por alguém de experiência ordinária na técnica a qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais preferidos são descritos agora. Todas as publicações mencionadas aqui estão incorporadas por referência em sua totalidade.

[0060] O termo “PD-1” refere-se à proteína de morte-1 programada, um co-inibidor de célula T, da mesma forma conhecido como CD279. A sequência de aminoácido de PD-1 de tamanho natural é fornecida em GenBank como número de acesso NP\_005009.2 e é da mesma forma referida aqui como SEQ ID NO: 327. O termo “PD-1” da mesma forma inclui variantes de proteína de PD-1 tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NOs: 321, 322, 323, ou 324. O termo “PD-1” inclui PD-1 recombinante ou um fragmento do mesmo. O termo da mesma forma abrange PD-1 ou um fragmento do mesmo acoplado a, por exemplo, marcador de histidina, camundongo ou Fc humano, ou uma sequência de sinal tal como ROR1. Por exemplo, o termo inclui sequências exemplificadas por SEQ ID NOs: 323 ou 324, compreendendo um camundongo Fc (mIgG2a) ou Fc humano (hIgG1) no terminal C, acoplado a resíduos de aminoácido 25-170 de PD-1 de tamanho natural com uma mudança de C93S. Variantes de proteína como exemplificado por SEQ ID NO: 321 compreendem um marcador de histidina ao terminal C, acoplado a resíduos de aminoácido 25-170 de tamanho

natural PD-1. A menos que especificado como sendo de uma espécie não humana, o termo “PD-1” significa PD-1 humano.

[0061] PD-1 é um membro da família CD28/ CTLA-4/ICOS de co-inibidores de célula T. PD-1 é uma proteína de aminoácido 288 com um domínio de terminal N extracelular que é semelhante a IgV, um domínio de transmembrana e um domínio intracelular contendo um *motif* inibitório com base em tirosina imunoreceptor (ITIM) e um *motif* interruptor com base em tirosina imunoreceptor (ITSM) (Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.). O receptor de PD-1 tem dois ligantes, ligante PD-1 (PD-L1) e PD-L2.

[0062] O termo “PD-L1” refere-se ao ligante do receptor de PD-1 da mesma forma conhecido como CD274 e B7H1. A sequência de aminoácido de PD-L1 de tamanho natural é fornecida em GenBank como número de acesso NP\_054862.1 e é da mesma forma referida aqui como SEQ ID NO: 328. O termo da mesma forma abrange PD-L1 ou um fragmento do mesmo acoplado a, por exemplo, marcador de histidina, Fc de camundongo ou humano, ou uma sequência de sinal tal como ROR1. Por exemplo, o termo inclui sequências exemplificadas por SEQ ID NOs: 325 ou 326, compreendendo um Fc de camundongo (mIgG2a) ou Fc humano (hIgG1) ao terminal C, acoplado a resíduos de aminoácido 19-239 de PD-L1 de tamanho natural. PD-L1 é uma proteína de aminoácido 290 com um domínio extracelular semelhante a IgV, um domínio de transmembrana e um domínio intracelular altamente conservado de aproximadamente 30 aminoácidos. PD-L1 é constitutivamente expresso em muitas células tal como células de apresentação de antígeno (por exemplo, células dendríticas, macrófago, e células B) e em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas (por exemplo, células endoteliais vasculares, ilhotas pancreáticas, e sítios de privilégio imune). PD-L1 é da mesma forma expresso em uma ampla variedade de tumores, células viralmente

infectadas e tecido autoimune, e é um componente do ambiente imunossupressor (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519).

[0063] Quando aqui usado, o termo “co-inibidor de célula T” refere-se a um ligante e/ou receptor que modula a resposta imune por meio de ativação ou supressão de célula T. O termo “co-inibidor de célula T”, da mesma forma conhecido como molécula de co-sinalização de célula T, inclui, porém não é limitado a, proteína de gene de ativação de linfócito 3 (LAG-3, da mesma forma conhecido como CD223), antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), atenuador de linfócito B e T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, imunoglobulina de célula T e mucina 3(TIM3), imunoreceptor de célula T com imunoglobulina e ITIM (TIGIT; da mesma forma conhecido como VSIG9), receptor semelhante a imunoglobulina associado a leucócito 1 (LAIR1; da mesma forma conhecido como CD305), costimulador de célula T induzível (ICOS; da mesma forma conhecido como CD278), suppressor de Ig de domínio V de ativação de célula T (VISTA) e CD160.

[0064] Quando aqui usado, o termo “receptor de Fc” refere-se à proteína de receptor de superfície encontrada em células imunes incluindo linfócitos B, células exterminadoras naturais, macrófagos, basófilos, neutrófilos, e mastócitos que têm uma especificidade de ligação para a região de Fc de um anticorpo. O termo “receptor de Fc” inclui, porém não é limitado a, um receptor de Fc $\gamma$  [por exemplo, Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32), Fc $\gamma$ RIIB (CD32), Fc $\gamma$ RIIIA (CD16a), e Fc $\gamma$ RIIIB (CD16b)], receptor de Fc $\alpha$  (por exemplo, Fc $\alpha$ RI ou CD89) e receptor de Fc $\epsilon$  [por exemplo, Fc $\epsilon$ RI, e Fc $\epsilon$ RII (CD23)].

[0065] O termo "anticorpo", quando aqui usado, é pretendido se referir a moléculas de imunoglobulina compreendidas de quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) inter-conectadas por ligações de dissulfeto (isto é, "moléculas de anticorpo completas"), bem como multímeros do mesmo (por exemplo

IgM) ou fragmentos de ligação de antígeno do mesmo. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (“HCVR” ou “VH”) e uma região constante de cadeia pesada (compreendida de domínios  $C_H1$ ,  $C_H2$  e  $C_H3$ ). Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (“LCVR ou “VL”) e uma região constante de cadeia leve (CL). As regiões de  $V_H$  e  $V_L$  podem ser também subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões de determinação de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas regiões de estrutura (FR). Cada  $V_H$  e  $V_L$  está composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas de terminal amino a terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em certas modalidades da invenção, as FRs do anticorpo (ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo) podem ser idênticas às sequências de linha germinativa humanas, ou pode ser naturalmente ou artificialmente modificadas. Uma sequência de consensos de aminoácido pode ser definida com base em uma análise de lado-por-lado de duas ou mais CDRs.

[0066] Substituição de um ou mais resíduos de CDR ou omissão de uma ou mais CDRs é da mesma forma possível. Anticorpos foram descritos na literatura científica em que uma ou duas CDRs podem ser dispensadas com ligação. Padlan e outro (1995 FASEB J. 9:133-139) analisou as regiões de contato entre anticorpos e seus抗ígenos, com base em estruturas cristalinas publicadas, e concluiu que apenas cerca de um quinto a um terço de resíduos de CDR atualmente contata o抗ígeno. Padlan da mesma forma encontrou muitos anticorpos em que uma ou duas CDRs não tiveram aminoácidos em contato com um抗ígeno (veja da mesma forma, Vajdos e outro 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0067] Resíduos de CDR não contatando抗ígeno podem ser identificados com base em estudos prévios (por exemplo resíduos H60-

H65 em CDRH2 não são frequentemente requeridos), de regiões de Kabat CDRs situando-se fora das CDRs de Chothia, por modelagem molecular e/ou empiricamente. Se uma CDR ou resíduo(s) do mesmo é omitida, é normalmente substituída com um aminoácido ocupando a posição correspondente em outra sequência de anticorpo humano ou um consenso de tais sequências. Posições para substituição dentro de CDRs e aminoácidos para substituir podem da mesma forma ser selecionadas empiricamente. Substituições empíricas podem ser substituições conservadoras ou não conservadoras.

[0068] Os anticorpos monoclonais anti-PD-1 completamente humanos descritos aqui podem compreender uma ou mais substituições de aminoácido, inserções e/ou deleções nas regiões de estrutura e/ou CDR dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve quando comparadas às sequências de linha germinativa correspondentes. Tais mutações podem ser facilmente averiguadas comparando-se as sequências de aminoácido descritas aqui a sequências de linha germinativa disponíveis a partir de, por exemplo, bancos de dados de sequência de anticorpo públicos. A presente invenção inclui anticorpos, e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, que são derivados de quaisquer das sequências de aminoácido descritas aqui, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões de estrutura e/ou CDR são mutadas ao(s) resíduo(s) correspondente(s) da sequência de linha germinativa da qual o anticorpo foi derivado, ou ao(s) resíduo(s) correspondente(s) de outra sequência de linha germinativa humana, ou a uma substituição de aminoácido conservadora do(s) resíduo(s) de linha germinativa correspondente(s) (tais mudanças de sequência são referidas aqui coletivamente como “mutações de linha germinativa”). Uma pessoa de experiência ordinária na técnica, começando com as sequências de região variáveis de cadeia pesada e leve descritas aqui, pode facilmente produzir numerosos anticorpos e fragmentos de ligação

de antígeno que compreende uma ou mais mutações de linha germinativa individuais ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, todos os resíduos de estrutura e/ou CDR dentro dos domínios de  $V_H$  e/ou  $V_L$  são mutados atrás dos resíduos encontrados na sequência de linha germinativa original da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas certos resíduos são mutados de volta à sequência de linha germinativa original, por exemplo, apenas os resíduos mutados encontrados dentro dos primeiros 8 aminoácidos de FR1 ou dentro dos últimos 8 aminoácidos de FR4, ou apenas os resíduos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais resíduo(s) de estrutura e/ou CDR é mutado ao(s) resíduo(s) correspondente(s) de uma sequência de linha germinativa diferente (isto é, uma sequência de linha germinativa que é diferente da sequência de linha germinativa da qual o anticorpo foi originalmente derivado). Além disso, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações de linha germinativa dentro das regiões de estrutura e/ou CDR, por exemplo, em que certos resíduos individuais são mutados ao resíduo correspondente de uma sequência de linha germinativa particular enquanto certos outros resíduos que diferem-se da sequência de linha germinativa original são mantidos ou são mutados ao resíduo correspondente de uma sequência de linha germinativa diferente. Uma vez obtido, anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno que contêm uma ou mais mutações de linha germinativa podem ser facilmente testados para uma ou mais propriedades desejadas tal como, especificidade de ligação melhorada, afinidade de ligação aumentada, melhorou ou realçou propriedades biológicas antagônicas ou agonísticas (como o caso pode ser), imunogenicidade reduzida, etc. Anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno obtidos desta maneira geral dentro da presente invenção.

[0069] A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos monoclonais anti-PD-1 completamente humanos compreendendo variantes de quaisquer das sequências de aminoácido de HCVR, LCVR, e/ou CDR descritas aqui tendo uma ou mais substituições conservadoras. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 tendo sequências de aminoácido de HCVR, LCVR, e/ou CDR com, por exemplo, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. substituições de aminoácido conservadoras relativas a quaisquer das sequências de aminoácido de HCVR, LCVR, e/ou CDR descritas aqui.

[0070] O termo "anticorpo humano", quando aqui usado, é pretendido incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina de linha germinativa humanas. Os mAbs humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por sequências de imunoglobulina de linha germinativa humanas (por exemplo, mutações introduzidas por acaso ou mutagênese sítio-específico *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo nas CDRs e em particular CDR3. Entretanto, o termo "anticorpo humano", quando aqui usado, não é pretendido incluir mAbs em que sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies de mamífero (por exemplo, camundongo), foi enxertada em sequências de FR humanas. O termo inclui anticorpos recombinantemente produzidos em um mamífero não humano, ou em células de um mamífero não humano. O termo não é pretendido incluir anticorpos isolados a partir de ou gerados em um indivíduo humano.

[0071] O termo "recombinante", quando aqui usado, refere-se a anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno do mesmo da invenção criado, expresso, isolado ou obtido por tecnologias ou métodos conhecidos na técnica como tecnologia de DNA recombinante que inclui, por exemplo, entrancamento de DNA e expressão transgênica. O termo refere-se a anticorpos expressos em um mamífero não humano

(incluindo mamíferos não humanos transgênicos, por exemplo, camundongos transgênicos), ou um sistema de expressão de célula (por exemplo, Células de CHO) ou isolado de uma biblioteca de anticorpo humana combinatorial recombinante.

[0072] O termo “moléculas de ligação de antígeno multi-específicas”, quando aqui usado refere-se a moléculas de ligação de antígeno biespecíficas, tri-específicas ou multi-específicas, e fragmentos de ligação de antígeno das mesmas. Moléculas de ligação de antígeno multi-específicas podem ser específicas para epítopos diferentes de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação de antígeno específicos para epítopos de mais do que um polipeptídeo alvo. Uma molécula de ligação de antígeno multi-específica pode ser um único polipeptídeo multifuncional, ou pode ser um complexo multimérico de dois ou mais polipeptídeos que são covalentemente ou não covalentemente associados com um outro. O termo “moléculas de ligação de antígeno multi-específicas” inclui anticorpos da presente invenção que pode ser ligado ou co-expresso com outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína. Por exemplo, um anticorpo ou fragmento do mesmo pode ser ligado funcionalmente (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outra maneira) a uma ou mais outras entidades moleculares, tal como uma proteína ou fragmento da mesma para produzir uma molécula de ligação de antígeno biespecífica ou uma multiespecífica com uma segunda especificidade de ligação. De acordo com a presente invenção, o termo “moléculas de ligação de antígeno multi-específicas” da mesma forma inclui anticorpos biespecíficos, tri-específicos ou multiespecíficos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Em certas modalidades, um anticorpo da presente invenção é funcionalmente ligado a outro anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo para produzir um anticorpo biespecífico

com uma segunda especificidade de ligação. Anticorpos biespecíficos e multiespecíficos da presente invenção são descritos em outro lugar aqui.

[0073] O termo "especificamente liga-se," ou "liga-se especificamente a", ou similar, significa que um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo forma um complexo com um antígeno que é relativamente estável sob condições fisiológicas. Ligação específica pode ser caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio de pelo menos cerca de  $1 \times 10^{-8}$  M ou menos (por exemplo, um  $K_D$  menor denota uma ligação mais apertada). Métodos para determinar se duas moléculas especificamente ligam-se são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância de plásmon superficial, e similar. Como descrito aqui, anticorpos foram identificados por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, BIACORE™ que especificamente liga-se a PD-1. Além disso, anticorpos multiespecíficos que ligam-se a um domínio em PD-1 e um ou mais抗ígenos adicionais ou um biespecífico que liga-se a duas regiões diferentes de PD-1 são no entanto considerados anticorpos que "especificamente ligam-se", quando aqui usado.

[0074] O termo anticorpo de "afinidade alta" refere-se aqueles mAbs tendo uma afinidade de ligação a PD-1, expressos como  $K_D$ , de pelo menos  $10^{-7}$  M; preferivelmente  $10^{-8}$  M; mais preferivelmente  $10^{-9}$  M, ainda mais preferivelmente  $10^{-10}$  M, ainda mais preferivelmente  $10^{-11}$  M, como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, BIACORE™ ou ELISA de afinidade de solução.

[0075] Pelo termo "taxa lenta", "Koff" ou "kd" é significado um anticorpo que dissocia-se de PD-1, com uma taxa constante de  $1 \times 10^{-3}$   $s^{-1}$  ou menos, preferivelmente  $1 \times 10^{-4}$   $s^{-1}$  ou menos, como determinado por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, BIACORE™.

[0076] Os termos "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo,

"fragmento de ligação de antígeno" de um anticorpo, e similar, quando aqui usado, inclui qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtenível, sintético, ou geneticamente criado que especificamente liga-se um antígeno para formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação de antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", quando aqui usado, referem-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de ligar-se a PD-1.

[0077] Em modalidades específicas, anticorpo ou fragmentos de anticorpo da invenção podem ser conjugados a uma porção um tal ligante ou uma porção terapêutica ("imunoconjungado"), tal como um antibiótico, um segundo anticorpo anti-PD-1, ou um anticorpo para outro antígeno um tal antígeno específico de tumor, um antígeno de tecido autoimune, um antígeno de célula viralmente infectada, um receptor de Fc, um receptor de célula T, ou um co-inibidor de célula T, ou uma imunotoxina, ou qualquer outra porção terapêutica útil para tratar uma doença ou condição incluindo câncer, doença auto-imune ou infecção viral crônica.

[0078] Um "anticorpo isolado", quando aqui usado, é pretendido se referir a um anticorpo que está substancialmente livre de outros anticorpos (Abs) tendo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente liga-se a PD-1, ou um fragmento do mesmo, está substancialmente livre de Abs que especificamente liga-se a antígenos diferentes de PD-1).

[0079] Um "anticorpo de bloqueio" ou um "anticorpo de neutralização", quando aqui usado (ou um "anticorpo que neutraliza atividade de PD-1" ou "anticorpo antagonista"), é pretendido se referir a um anticorpo cujo ligação a PD-1 resulta em inibição de pelo menos uma atividade biológica de PD-1. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode prevenir ou bloquear ligação de PD-1 a PD-L1.

[0080] Um “anticorpo de ativação” ou um “anticorpo de realce”, quando aqui usado (ou um “anticorpo agonista”), é pretendido se referir a um anticorpo cuja ligação a PD-1 resulta em aumentar ou estimular pelo menos uma atividade biológica de PD-1. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode aumentar ligação de PD-1 a PD-L1.

[0081] O termo “ressonância de plásmon superficial”, quando aqui usado, refere-se a um fenômeno óptico que permite a análise de interações biomoleculares em tempo real por detecção de alterações em concentrações de proteína dentro de uma matriz de biosensor, usando o sistema de BIACORE™ por exemplo (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

[0082] O termo "KD", quando aqui usado, é pretendido referir-se à dissociação de equilíbrio constante de uma interação de anticorpo-antígeno particular.

[0083] O termo “epítopo” refere-se a um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação específica de antígeno na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um único antígeno pode ter mais do que um epítopo. Desse modo, anticorpos diferentes podem ligar-se a áreas diferentes em um antígeno e podem ter efeitos biológicos diferentes. O termo “epítopo” da mesma forma refere-se a um sítio em um antígeno ao qual células B e/ou T respondem. Da mesma forma refere-se a uma região de um antígeno que é ligado por um anticorpo. Epítopos podem ser definidos como estrutural ou funcional. Epítopos funcionais são geralmente um subconjunto dos epítopos estruturais e têm aqueles resíduos que diretamente contribuem à afinidade da interação. Epítopos podem da mesma forma ser conformacionais, isto é, composto de aminoácidos não lineares. Em certas modalidades, epítopos podem incluir determinantes que são agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar,

grupos fosforila, ou grupos sulfonila, e, em certas modalidades, pode ter características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específica.

[0084] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico," ao se referir a um ácido nucléico ou fragmento do mesmo, indica que, quando otimamente alinhado com inserções de nucleotídeo apropriadas ou deleções com outro ácido nucléico (ou seu filamento complementar), há identidade de sequência de nucleotídeo em pelo menos cerca de 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases de nucleotídeo, como medido por qualquer algoritmo bem conhecido de identidade de sequência, tal como FASTA, BLAST ou GAP, como discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucléico tendo identidade substancial para uma molécula de ácido nucléico de referência pode, em certos exemplos, codificar um polipeptídeo tendo a mesma ou substancialmente similar sequência de aminoácido como o polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucléico de referência.

[0085] Como aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeo, quando otimamente alinhado, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de intervalo de defeito, compartilha pelo menos 90% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos 95%, 98% ou 99% de identidade de sequência. Preferivelmente, posições de resíduo, que não são idênticas diferem-se por substituições de aminoácido conservadoras. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservadora não substancialmente mudará as

propriedades funcionais de uma proteína. Em casos onde duas ou mais sequências de aminoácido diferem-se uma da outra por substituições conservadoras, o percentual ou grau de similaridade podem ser ajustados para corrigir para a natureza conservadora da substituição. Meios para fazer este ajuste são bem conhecidos aqueles de experiência na técnica. Veja, por exemplo, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, que está incorporado aqui por referência. Exemplos de grupos aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais de hidroxila alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina, e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato, e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservadores preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer mudança tendo um valor positivo na matriz de probabilidade de log PAM250 descrita em Gonnet e outro (1992) Science 256: 1443 45, aqui incorporada por referência. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer mudança tendo um valor não negativo na matriz de probabilidade de log PAM250.

[0086] Similaridade de sequência para polipeptídeos é tipicamente medido usando *software* de análise de sequência. *Software* de análise de proteína emparelha sequências similares usando medidas de similaridade nomeadas em várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, *software* de GCG contém programas tal como GAP e BESTFIT que pode ser usado com parâmetros predefinidos para

determinar homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tal como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína de tipo silvestre e uma mutante do mesmo. Veja, por exemplo, GCG Versão 6.1. Sequências de polipeptídeo da mesma forma podem ser comparados usando FASTA com parâmetros predefinidos ou recomendados; um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre a questão e sequências de pesquisa (Pearson (2000) *supra*). Outro algoritmo preferido ao comparar uma sequência da invenção a um banco de dados contendo um número grande de sequência de organismos diferentes é o programa de computação BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, usando parâmetros predeterminados. Veja, por exemplo, Altschul e outro (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 e (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 cada dos quais está incorporado aqui por referência.

[0087] Pela frase “quantidade terapeuticamente eficaz” é significado uma quantidade que produz o efeito desejado a qual é administrada. A quantidade exata dependerá do propósito do tratamento, e será determinável por alguém versado na técnica usando técnicas conhecidas (veja, por exemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[0088] Quando aqui usado, o termo “indivíduo” refere-se a um animal, preferivelmente um mamífero, em necessidade de melhora, prevenção e/ou tratamento de uma doença ou distúrbio tal como infecção viral crônica, câncer ou doença auto-imune.

[0089] Quando aqui usado, “fármaco anti-câncer” significa qualquer agente útil para tratar câncer incluindo, porém não limitado a, citotoxinas e agentes tal como antimetabólicos, agentes de alquilação, antraciclinas,

antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazina, hidroxiureia, asparaginase, corticosteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), biológicos (por exemplo, anticorpos e interferons) e agentes radioativos. Quando aqui usado, “uma citotoxina ou agente citotóxico”, da mesma forma refere-se a um agente quimioterapêutico e significa qualquer agente que é prejudicial a células. Exemplos incluem Taxol® (paclitaxel), temozolamida, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, cisplatina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidróxi antracina dione, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos.

[0090] Quando aqui usado, o termo “fármaco antiviral” refere-se a qualquer fármaco ou terapia usada para tratar, prevenir, ou melhorar uma infecção viral em um indivíduo hospedeiro. O termo “fármaco antiviral” inclui, porém não é limitado a zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina, analgésicos e corticosteroides. No contexto da presente invenção, as infecções virais incluem infecções a longo prazo ou crônicas causadas por vírus incluindo, porém não limitadas a, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), papiloma vírus humano (HPV), vírus da coriomeningite linfocítico (LCMV), e vírus da imunodeficiência símia (SIV).

[0091] Os anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno da presente invenção especificamente ligam-se a PD-1 e modulam a interação de PD-1 com PD-L1. Os anticorpos anti-PD-1 podem ligar-se a PD-1 com afinidade alta ou com afinidade baixa. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos de bloqueio em que os anticorpos podem ligar-se a PD-1 e bloquear a interação de PD-1 com PD-L1. Em algumas modalidades, os anticorpos

de bloqueio da invenção podem bloquear a ligação de PD-1 a PD-L1 e/ou estimular ou realçar ativação de célula T. Em algumas modalidades, os anticorpos de bloqueio podem ser úteis para estimular ou realçar a resposta imune e/ou para tratar um indivíduo sofrendo de câncer, ou uma infecção viral crônica. Os anticorpos quando administrados a um indivíduo em necessidade dos mesmos podem reduzir a infecção crônica por um vírus tal como HIV, LCMV ou HBV no indivíduo. Eles podem ser usados para inibir o crescimento de células de tumor em um indivíduo. Eles podem ser usados sozinhos ou como terapia de suplemento com outras porções terapêuticas ou modalidades conhecidas na técnica por tratar câncer, ou infecção viral.

[0092] Em outras modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos de ativação, em que os anticorpos podem ligar-se a PD-1 e aumentar a interação de PD-1 e PD-L1. Em algumas modalidades, os anticorpos de ativação podem realçar ligação de PD-1 a PD-L1 e/ou inibir ou suprimir ativação de célula T. Os anticorpos de ativação da presente invenção podem ser úteis para inibir a resposta imune em um indivíduo e/ou para tratar doença auto-imune.

[0093] Em certas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 podem ser moléculas de ligação de antígeno multi-específicas, em que eles compreendem uma primeira especificidade de ligação a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação a um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em outro co-inibidor de célula T, um antígeno de tecido autoimune, receptor de célula T, receptor de Fc, receptor de célula T, PD-L1, e um epítopo diferente de PD-1.

[0094] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são obtidos a partir de camundongos imunizados com um imunógeno primário, tal como um PD-1 de tamanho natural [Veja número de acesso de GenBank NP\_005009.2 (SEQ ID NO: 327)] ou com uma forma recombinante de PD-1 ou fragmentos de PD-1 humanos

modificados (SEQ ID NOs: 321, 323, ou 324) ou com fragmentos de PD-1 de cinomolgos modificados (SEQ ID NO: 322), seguido por imunização com um imunógeno secundário, ou com um fragmento imunologicamente ativo de PD-1.

[0095] O imunógeno pode ser um fragmento biologicamente ativo e/ou imunogênico de PD-1 ou DNA codificando o fragmento ativo do mesmo. O fragmento pode ser derivado do domínio de terminal N ou terminal C de PD-1. Em certas modalidades da invenção, o imunógeno é um fragmento de PD-1 que varia de resíduos de aminoácido 25-170 de SEQ ID NO: 327 com uma mudança de C93S.

[0096] Os peptídeos podem ser modificados para incluir adição ou substituição de certos resíduos para rotulagem ou para propósitos de conjugação a moléculas de veículo, tal como, KLH. Por exemplo, uma cisteína pode ser adicionada na extremidade de terminal N ou terminal C de um peptídeo, ou uma sequência ligadora pode ser adicionada para preparar o peptídeo para conjugação a, por exemplo, KLH para imunização.

[0097] A sequência de aminoácido de tamanho natural de PD-1 de tamanho natural humano é mostrada como SEQ ID NO: 327.

[0098] Em certas modalidades, anticorpos que especificamente ligam-se a PD-1 podem ser preparados usando fragmentos das regiões notadas acima, ou peptídeos que estendem-se além das regiões designadas em cerca de 5 a cerca de 20 resíduos de aminoácido de, ou ambos, as extremidades de terminal N ou C das regiões descritas aqui. Em certas modalidades, qualquer combinação das regiões notadas acima ou fragmentos da mesma pode ser usada na preparação de anticorpos específicos de PD-1. Em certas modalidades, qualquer uma ou mais das regiões notadas acima de PD-1, ou fragmentos do mesmo pode ser usada para preparar anticorpos monoespecíficos, bispecíficos, ou multiespecíficos.

[0099] Certos anticorpos anti-PD-1 da presente invenção podem ligar e neutralizar a atividade de PD-1, como determinado por ensaios *in vitro* ou *in vivo*. A capacidade dos anticorpos da invenção ligar e neutralizar a atividade de PD-1 pode ser medida usando qualquer método padrão conhecido aqueles versados na técnica, incluindo ensaios de ligação, ou ensaios de atividade, como descrito aqui.

[00100] Ensaios não limitantes, exemplares para medir atividade de ligação é ilustrada aqui nos Exemplos. No Exemplo 3, as afinidades de ligação e constantes cinéticas de anticorpos anti-PD-1 humanos para PD-1 humano e PD-1 cinomolgos foram determinadas por ressonância de plásmon superficial e as medidas foram conduzidas em um Biacore 4000 ou T200 instrument. Nos Exemplos 4 e 5, ensaios de bloqueio foram usados para determinar a capacidade dos anticorpos anti-PD-1 bloquear capacidade de ligação de PD-L1 de PD-1 *in vitro*. No Exemplo 6, ensaios de bloqueio foram usados para determinar competição cruzada entre anticorpos anti-PD-1. Exemplo 7 descreve a ligação dos anticorpos para superexpressão de células PD-1. No Exemplo 8, um ensaio de luciferase foi usado para determinar a capacidade de anticorpos anti-PD-1 antagonizar sinalização de PD-1/PD-L1 em células T.

[00101] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem aumentar ou estimular ativação de célula T *in vitro* e em um indivíduo com câncer ou em um indivíduo infectado com um vírus tal como LCMV. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são usados em combinação com um segundo agente terapêutico, tal como um anticorpo para um segundo co-inibidor de célula T, para realçar a resposta imune e inibir crescimento de tumor em um indivíduo.

[00102] Os anticorpos específicos para PD-1 podem conter nenhum rótulo adicional ou porções, ou eles podem conter um rótulo ou porção

de terminal N ou terminal C. Em uma modalidade, o rótulo ou porção é biotina. Em um ensaio de ligação, o local de um rótulo (se qualquer) pode determinar a orientação do peptídeo relativo à superfície em que o peptídeo é ligado. Por exemplo, se uma superfície é revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina de terminal N será orientada tal que a porção de terminal C do peptídeo será distal à superfície. Em uma modalidade, o rótulo pode ser um radionuclídeo, uma tintura fluorescente ou um rótulo de MRI detectável. Em certas modalidades, tais anticorpos rotulados podem ser usados em ensaios diagnósticos incluindo ensaios de imageamento.

#### Fragmentos de Ligação de Antígeno de Anticorpos

[00103] A menos que especificamente indicado de outra maneira, o termo "anticorpo," quando aqui usado, será entendido para abranger moléculas de anticorpo compreendendo duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina (isto é, "moléculas de anticorpo total") bem como fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Os termos "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação de antígeno" de um anticorpo, e similar, quando aqui usado, inclui qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtêvel, sintético, ou geneticamente criado que especificamente liga-se a um antígeno para formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação de antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", quando aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade para especificamente ligar-se a PD-1. Um fragmento de anticorpo pode incluir um fragmento de Fab, um fragmento de um  $F(ab')_2$ , um fragmento de Fv, um fragmento de dAb, um fragmento contendo um CDR, ou um CDR isolado. Em certas modalidades, o termo "fragmento de ligação de antígeno" refere-se a um fragmento de polipeptídeo de uma molécula de ligação de antígeno multi-específica. Em tais modalidades, o termo

“fragmento de ligação de antígeno” inclui, por exemplo, um domínio extracelular de PD-L1 que especificamente liga-se a PD-1. Fragmentos de ligação de antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, de moléculas de anticorpo total usando qualquer técnica padrão adequada tal como digestão proteolítica ou técnicas de engenharia genética recombinantes envolvendo a manipulação e expressão de DNA codificando variável de anticorpo e (opcionalmente) domínios constantes. Tal DNA é conhecido e/ou está facilmente disponível a partir de, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo), ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou usando técnicas de biologia moleculares, por exemplo, para organizar um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou introduzir códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar aminoácidos, etc.

[00104] Exemplos não limitantes de fragmentos de ligação de antígeno incluem: (i) fragmentos de Fab; (ii) fragmentos de F(ab')2; (iii) fragmentos de Fd; (iv) fragmentos de Fv; (v) moléculas de Fv de cadeia única (scFv); (vi) fragmentos de dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimas consistindo nos resíduos de aminoácido que imitam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região de determinação de complementaridade isolada (CDR) tal como um peptídeo de CDR3), ou um peptídeo de FR3-CDR3-FR4 restrito. Outras moléculas criadas, tal como anticorpos domínio-específicos, anticorpos de domínio simples, anticorpos domínio-deletados, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados por CDR, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (por exemplo, nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes, etc.), imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs), e domínios de IgNAR variáveis de *shark*, são da mesma forma abrangidos dentro da expressão "fragmento de

ligação de antígeno," quando aqui usado.

[00105] Um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo tipicamente compreenderá pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácido e geralmente compreenderá pelo menos uma CDR, que é adjacente ou em estrutura com uma ou mais sequência de estrutura. Em fragmentos de ligação de antígeno tendo um domínio de  $V_H$  associados com um domínio de  $V_L$ , domínios de  $V_H$  e  $V_L$  podem ser situados relativos um ao outro em qualquer disposição adequada. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros de  $V_H - V_H$ ,  $V_H - V_L$  ou  $V_L - V_L$ . Alternativamente, o fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo pode conter um domínio de  $V_H$  ou  $V_L$  monomérico.

[00106] Em certas modalidades, um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável covalentemente ligado a pelo menos um domínio constante. Configurações exemplares não limitantes de domínios variáveis e constantes que podem ser encontradas dentro de um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo da presente invenção incluem: (i)  $V_H - C_{H1}$ ; (ii)  $V_H - C_{H2}$ ; (iii)  $V_H - C_{H3}$ ; (iv)  $V_H - C_{H1}-C_{H2}$ ; (v)  $V_H - C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vi)  $V_H - C_{H2}-C_{H3}$ ; (vii)  $V_H - CL$ ; (viii)  $VL - C_{H1}$ ; (ix)  $VL - C_{H2}$ ; (x)  $VL - C_{H3}$ ; (xi)  $VL - C_{H1}-C_{H2}$ ; (xii)  $VL - C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (xiii)  $VL - C_{H2}-C_{H3}$ ; e (xiv)  $VL - CL$ . Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo quaisquer das configurações exemplares listadas acima, os domínios variáveis e constantes podem ser ligados diretamente um ao outro ou podem ser ligados por uma articulação total ou parcial ou região ligadora. Uma região de articulação pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos, que resultam em uma ligação flexível ou semi-flexível entre domínios variáveis e/ou constantes adjacentes em uma única molécula de polipeptídeo. Além disso, um fragmento de ligação de

antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homo-dímero ou hetero-dímero (ou outro multímero) de quaisquer das configurações de domínio variáveis e constantes listadas acima em associação não covalente com um outro e/ou com um ou mais domínio de  $V_H$  ou  $V_L$  monomérico (por exemplo, por ligação(ões) de dissulfeto)).

[00107] Como com moléculas de anticorpo total, fragmentos de ligação de antígeno podem ser monoespecíficas ou multiespecíficas (por exemplo, biespecíficas). Um fragmento de ligação de antígeno multiespecífica de um anticorpo tipicamente compreenderá pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de especificamente ligar-se a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os formatos de anticorpo biespecíficos exemplares descritos aqui, pode ser adaptado para uso no contexto de um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo da presente invenção usando técnicas rotineiras disponíveis na técnica.

#### Preparação de Anticorpos Humanos

[00108] Métodos para gerar anticorpos humanos em camundongos transgênicos são conhecidos na técnica. Qualquer tais métodos conhecidos podem ser usados no contexto da presente invenção para fazer anticorpos humanos que especificamente ligam-se a PD-1.

[00109] Um imunógeno compreendendo qualquer um do seguinte pode ser usado para gerar anticorpos em PD-1. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são obtidos a partir de camundongos imunizados com um PD-1 nativo de tamanho natural, (Veja número de acesso de GenBank NP\_005009.2) (SEQ ID NO: 327), ou com um peptídeo de PD-1 recombinante. Alternativamente, PD-1 ou um fragmento do mesmo pode ser produzido usando técnicas bioquímicas padrões e modificadas (SEQ ID NOS: 321-324) e usado como imunógeno.

[00110] Em certas modalidades, o imunógeno pode ser um peptídeo da extremidade de terminal N ou terminal C de PD-1. Em uma modalidade, o imunógeno é o domínio extracelular ou o domínio semelhante a IgV de PD-1. Em certas modalidades da invenção, o imunógeno é um fragmento de PD-1 que varia de cerca de resíduos de aminoácido 25-170 de SEQ ID NO: 327 com uma mudança de C93S.

[00111] Em algumas modalidades, o imunógeno pode ser um peptídeo de PD-1 recombinante expresso em *E. coli* ou em qualquer outras células eucarióticas ou de mamífero tal como células de ovário de *hamster chinês* (C<sub>H</sub>O).

[00112] Em certas modalidades, anticorpos especificamente ligam-se a PD-1 podem ser preparados usando fragmentos das regiões notadas acima, ou peptídeos que estendem-se além das regiões designadas em cerca de 5 a cerca de 20 resíduos de aminoácido de, ou ambos, a extremidade de terminal N ou C das regiões descritas aqui. Em certas modalidades, qualquer combinação das regiões notadas acima ou fragmentos da mesma pode ser usada na preparação de anticorpos específicos de PD-1.

[00113] Usando tecnologia de VELOCIMMUNE® (veja, por exemplo, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) ou qualquer outro método conhecido para gerar anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos de alta afinidade para PD-1 são inicialmente isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. A tecnologia de VELOCIMMUNE® envolve geração de um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo regiões variáveis de cadeia pesada e leve humana operavelmente ligadas a locais de região constante de camundongo endógenos tal que o camundongo produz um anticorpo compreendendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo com respeito a estímulo antigênico. O DNA codificando as regiões variáveis das

cadeias pesadas e leves do anticorpo são isoladas e operavelmente ligadas a DNA codificando as regiões constantes de cadeia pesada e leve humana. O DNA é em seguida expresso em uma célula capaz de expressar o anticorpo completamente humano.

#### Bioequivalentes

[00114] Os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos de anticorpo da presente invenção abrangem proteínas tendo sequências de aminoácido que variam daquelas dos anticorpos descritos, porém que retém a capacidade para ligar-se a PD-1. Tais anticorpos variantes e fragmentos de anticorpo compreendem uma ou mais adições, deleções, ou substituições de aminoácidos quando comparados a sequência origem, porém exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente aquela dos anticorpos descritos. Igualmente, as sequências de DNA de codificação de anticorpo da presente invenção abrangem sequências que compreendem uma ou mais adições, deleções, ou substituições de nucleotídeos quando comparadas à sequência descrita, porém que codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção.

[00115] Duas proteínas de ligação de antígeno, ou anticorpos, são considerados bioequivalentes se, por exemplo, elas são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e extensão de absorção não mostra uma diferença significante quando administrada na mesma dose molar sob condições experimentais similares, única dose ou doses múltiplas. Alguns anticorpos serão considerados alternativas equivalentes ou farmacêuticas se eles forem equivalentes em na extensão de sua absorção porém não em sua taxa de absorção e ainda pode ser considerado bioequivalente porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na rotulagem, não são essenciais ao obtenção de concentrações de fármaco corporais

eficazes em, por exemplo, uso crônico, e são considerados medicalmente insignificantes para o produto de fármaco particular estudado.

[00116] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação de antígeno são bioequivalentes se não houver diferenças clinicamente significantes em sua segurança, pureza, ou potência.

[00117] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação de antígeno são bioequivalentes se um paciente pode ser trocado uma ou mais vezes entre o produto de referência e o produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma mudança clinicamente significante em imunogenicidade, ou eficácia diminuída, quando comparado a terapia continuada sem tal troca.

[00118] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação de antígeno são bioequivalentes se elas igualmente agem por um mecanismo comum ou mecanismos de ação para a condição ou condições de uso, para a extensão que tais mecanismos são conhecidos.

[00119] Bioequivalência pode ser demonstrada por métodos *in vivo* e/ou *in vitro*. Medidas de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos em que a concentração do anticorpo ou seus metabólitos é medida em sangue, plasma, soro, ou outro fluido biológico como uma função de tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado com e é razoavelmente predizível de dados de biodisponibilidade *in vivo* humano; (c) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos em que o efeito farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou seu alvo) é medido como uma função de tempo; e (d) em uma tentativa clínica bem controlada que estabelece segurança, eficácia, ou biodisponibilidade ou bioequivalência de um anticorpo.

[00120] Variantes bioequivalentes dos anticorpos da invenção podem ser construídos, por exemplo, preparando-se várias substituições de resíduos ou sequências ou deletando-se resíduos

terminais ou internos ou sequências não necessárias para atividade biológica. Por exemplo, resíduos de cisteína não essenciais para atividade biológica podem ser deletados ou substituídos com outros aminoácidos para prevenir formação de pontes de dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas em desnaturação. Em outros contextos, anticorpos bioequivalentes podem incluir variantes de anticorpo compreendendo mudanças de aminoácido, que modificam as características de glicosilação dos anticorpos por exemplo, mutações que eliminam ou removem glicosilação.

#### Anticorpos Anti-PD-1 Compreendendo Variantes de Fc

[00121] De acordo com certas modalidades da presente invenção, anticorpos anti-PD-1 são fornecidos compreendendo um domínio de Fc compreendendo uma ou mais mutações que aumentam ou diminuem ligação de anticorpo ao receptor de FcRn, por exemplo, em pH ácido quando comparado a pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 compreendendo uma mutação na região de C<sub>H</sub>2 ou uma C<sub>H</sub>3 do domínio de Fc, em que a(s) mutação(ões) aumenta(m) a afinidade do domínio de Fc para FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, em um endossoma onde pH varia de cerca de 5.5 a cerca de 6.0). Tais mutações podem resultar em um aumento em meia-vida de soro do anticorpo quando administrado a um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações de Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T), e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, A, W, H, F ou Y [N434A, N434W, N434H, N434F ou N434Y]); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação a posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F), e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação de

428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação de 428L, 259I (por exemplo, V259I), e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação de 433K (por exemplo, H433K) e uma 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação de 252, 254, e 256 (por exemplo, 252Y, 254T, e 256E); uma modificação de 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação de 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P). Em ainda outra modalidade, a modificação compreende uma modificação de 265A (por exemplo, D265A) e/ou uma de 297A (por exemplo, N297A).

[00122] Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 compreendendo um domínio de Fc compreendendo um ou mais pares ou grupos de mutações selecionados a partir do grupo consistindo em: 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); 257I e 311I (por exemplo, P257I e Q311I); 257I e 434H (por exemplo, P257I e N434H); 376V e 434H (por exemplo, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (por exemplo, T307A, E380A e N434A); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Em uma modalidade, a presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 compreendendo um domínio de Fc compreendendo uma mutação de S108P na região de articulação de IgG4 para promover estabilização de dímero. Todas as possíveis combinações das mutações de domínio de Fc anteriores, e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpo descritos aqui, são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[00123] A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos anti-PD-1 compreendendo uma região constante de cadeia pesada quimérica ( $C_H$ ), em que a região de  $C_H$  quimérica compreende segmentos derivados das regiões de  $C_H$  de mais do que um isótipo de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem compreender uma região de  $C_H$  quimérica compreendendo parte ou

tudo domínio de C<sub>H</sub>2 derivado de uma molécula de IgG1 humano, IgG2 humano ou IgG4 humano, combinado com parte ou todo domínio de C<sub>H</sub>3 derivado de uma molécula de IgG1 humano, IgG2 humano ou IgG4 humano. De acordo com certas modalidades, os anticorpos da invenção compreendem uma região de C<sub>H</sub> quimérica tendo uma região de articulação quimérica. Por exemplo, uma articulação quimérica pode compreender uma sequência de aminoácido de "articulação superior" (resíduos de aminoácido de posições 216 a 227 de acordo com numeração EU) derivado de uma região de articulação de IgG1 humano, um IgG2 humano ou um IgG4 humano, combinado com uma sequência de "articulação inferior" (resíduos de aminoácido de posições 228 a 236 de acordo com numeração EU) derivado de uma região de articulação de IgG1 humano, um IgG2 humano ou um IgG4 humano. De acordo com certas modalidades, a região de articulação quimérica compreende resíduos de aminoácido derivados de uma articulação superior de IgG1 humano ou um IgG4 humano e resíduos de aminoácido derivados de uma articulação inferior de IgG2 humano. Um anticorpo compreendendo uma região de C<sub>H</sub> quimérica como descrito aqui pode, em certas modalidades, exibir funções efetoras de Fc modificadas sem adversamente afetar as propriedades terapêuticas ou farmacocinéticas do anticorpo. (Veja, por exemplo, USSN. 14/170,166, depositado em 31 de janeiro de 2014, a descrição da qual está incorporada aqui por referência em sua totalidade).

#### Características Biológicas dos Anticorpos

[00124] Em geral, os anticorpos da presente invenção funcionam ligando-se a PD-1. A presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que ligam-se a moléculas de PD-1 monoméricas ou diméricas solúveis com alta afinidade. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno de anticorpos que ligam-se a PD-1

monomérico (por exemplo, a 25°C ou a 37°C) com um  $K_D$  de menos do que cerca de 50nM como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos ligam-se a PD-1 monomérico com um  $K_D$  de menos do que cerca de 40nM, menos do que cerca de 30nM, menos do que cerca de 20nM, menos do que cerca de 10nM menos do que cerca de 5nM, menos do que cerca de 2nM ou menos do que cerca de 1nM, como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui, ou um ensaio substancialmente similar.

[00125] A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que ligam-se a PD-1 dimérico (por exemplo, a 25°C ou a 37°C) com um  $K_D$  de menos do que cerca de 400 pM como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos ligam-se a PD-1 quimérico com um  $K_D$  de menos do que cerca de 300 pM, menos do que cerca de 250 pM, menos do que cerca de 200 pM, menos do que cerca de 100 pM, ou menos do que cerca de 50 pM, como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui, ou um ensaio substancialmente similar.

[00126] A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que ligam-se a cinomolgos (*Macaca fascicularis*) PD-1 (por exemplo, a 25°C ou a 37°C) com um  $K_D$  de menos do que cerca de 35 nM como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos ligam-se

a PD-1 cinomolgos com um  $K_D$  de menos do que cerca de 30 nM, menos do que cerca de 20 nM, menos do que cerca de 15 nM, menos do que cerca de 10 nM, ou menos do que cerca de 5 nM, como medido por ressonância de plásmon superficial, por exemplo, usando o formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui, ou um ensaio substancialmente similar.

[00127] A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que ligam-se a PD-1 com uma meia-vida dissociativa ( $t_{1/2}$ ) maior do que cerca de 1,1 minutos como medido por ressonância de plásmon superficial a 25°C ou 37°C, por exemplo, usando um formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui, ou um ensaio substancialmente similar. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno da presente invenção ligam-se a PD-1 com uma  $t_{1/2}$  maior do que cerca de 5 minutos, maior do que cerca de 10 minutos, maior do que cerca de 30 minutos, maior do que cerca de 50 minutos, maior do que cerca de 60 minutos, maior do que cerca de 70 minutos, maior do que cerca de 80 minutos, maior do que cerca de 90 minutos, maior do que cerca de 100 minutos, maior do que cerca de 200 minutos, maior do que cerca de 300 minutos, maior do que cerca de 400 minutos, maior do que cerca de 500 minutos, maior do que cerca de 600 minutos, maior do que cerca de 700 minutos, maior do que cerca de 800 minutos, maior do que cerca de 900 minutos, maior do que cerca de 1000 minutos, ou maior do que cerca de 1200 minutos, como medido por ressonância de plásmon superficial a 25°C ou 37°C, por exemplo, usando um formato de ensaio como definido no Exemplo 3 aqui (por exemplo, captura de mAb ou formato de captura de antígeno), ou um ensaio substancialmente similar.

[00128] A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que bloqueiam ligação de PD-1m a PD-L1 com um IC50 de menos do que cerca de 3 nM como

determinado usando um ensaio de imunoensaio com base em ELISA, por exemplo, como mostrado no Exemplo 4, ou um ensaio substancialmente similar. A presente invenção da mesma forma inclui anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos que ligam-se a PD-1 e aumentam a ligação de PD-1 a PD-L1.

[00129] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ligar-se ao domínio extracelular de PD-1 ou a um fragmento do domínio. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ligar-se a mais do que um domínio (anticorpos reativo cruzado). Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ligar-se a um epítopo localizado no domínio extracelular compreendendo resíduos de aminoácido 21-171 de PD-1 (SEQ ID NO: 327). Em uma modalidade, os anticorpos podem ligar-se a um epítopo compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em resíduos de aminoácido 1-146 de SEQ ID NOs: 321-324.

[00130] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem funcionar bloqueando-se ou inibindo-se a atividade de ligação de PD-L1 associado com ligação de PD-1 a qualquer outra região ou fragmento da proteína de tamanho natural, a sequência de aminoácido da qual é mostrada em SEQ ID NO: 327. Em certas modalidades, os anticorpos podem atenuar ou modular a interação entre PD-1 e PD-L1.

[00131] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos da invenção podem ligar a um epítopo em um domínio e podem da mesma forma ligar um segundo epítopo em um domínio diferente de PD-1. Em certas modalidades, os anticorpos biespecíficos da invenção podem ligar dois epítopos diferentes no mesmo domínio. Em uma modalidade, a molécula de ligação de antígeno multi-específica compreende uma primeira especificidade de ligação em que a primeira especificidade de

ligação comprehende o domínio extracelular ou fragmento do mesmo de PD-L1; e uma segunda especificidade de ligação a outro epítopo de PD-1.

[00132] Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo monoclonal completamente humano isolado ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo que liga-se a PD-1, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo exibe uma ou mais das seguintes características: (i) comprehende uma HCVR tendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, e 314, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (ii) comprehende uma LCVR tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, e 202, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (iii) comprehende um domínio de HCDR3 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312, e 320, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; e um domínio de LCDR3 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, e 208, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (iv) comprehende um domínio de HCDR1 tendo uma sequência de

aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308, e 316, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; um domínio de HCDR2 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310, e 318, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; um domínio de LCDR1 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, e 204, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; e um domínio de LCDR2 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, e 206, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (v) é uma molécula de ligação de antígeno multiespecífica compreendendo uma primeira especificidade de ligação a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação a um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em PD-1, um antígeno específico de tumor, um antígeno específico de tecido autoimune, um antígeno de célula viralmente infectada, um co-inibidor de célula T diferente, receptor de célula T, e um receptor de Fc; (vi) liga-se a PF-1 humano com um  $K_D$  de cerca de 28pM a cerca de 1,5 $\mu$ M; (vii) liga-se a PD-1 de cinomolgos com um  $K_D$  de cerca de 3nM a cerca de 7,5 $\mu$ M; (viii) bloqueia ou realça a ligação de PD-1 a PD-L1 com um

IC50 ≤ cerca de 3,3nM; (ix) bloqueia sub regulação de célula T induzida por PD-1 e/ou resgata sinalização de célula T em um ensaio reporter de T-célula/APC luciferase; (x) estimula proliferação de célula T e atividade em um ensaio de reação de linfócito misturada (MLR); (xi) induz IL-2 e/ou produção de IFNγ em um ensaio de MLR; e (xii) reprime crescimento de tumor e aumenta sobrevida em indivíduos com câncer.

[00133] Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo monoclonal completamente humano isolado ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo que bloqueia ligação de PD-1 a PD-L1, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo exibe uma ou mais das seguintes características: (i) compreende uma HCVR tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 130, 162, 234 and 314, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (ii) compreende uma LCVR tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 138, 170, 186, e 202, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (iii) compreende um domínio de HCDR3 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 136, 168, 240, e 320, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; e um domínio de LCDR3 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 144, 176, 192, e 208, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (iv) compreende um domínio de HCDR1 tendo uma sequência de

aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 132, 164, 236, e 316, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; um domínio de HCDR2 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 134, 166, 238, e 318, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; um domínio de LCDR1 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 140, 172, 188, e 204, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; e um domínio de LCDR2 tendo uma sequência de aminoácio selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NO: 142, 174, 190, e 206, ou uma sequência substancialmente similar da mesma tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade sequência; (v) é uma molécula de ligação de antígeno multiespecífica compreendendo uma primeira especificidade de ligação a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação a um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em um epítopo diferente de PD-1, um antígeno específico de tumor, um antígeno específico de tecido autoimune, um antígeno de célula viralmente infectada, um co-inibidor de célula T diferente, receptor de célula T, e um receptor de Fc; (vi) liga-se a PF-1 humano com um  $K_D \leq 10^{-9}M$ ; (vii) liga-se a PD-1 de cinomolgos com um  $K_D \leq 10^{-8}M$ ; (viii) bloqueia a ligação de PD-1 a PD-L1 com um  $IC_{50} \leq 10^{-10}M$ ; (ix) bloqueia sub regulação de célula T induzida por PD-1 e/ou resgata sinalização de célula T em um ensaio reporter de T-célula/APC luciferase; (x) estimula proliferação de célula T e atividade em um ensaio de reação de linfócito misturada (MLR); (xi) induz IL-2 e/ou produção de IFN $\gamma$  em

um ensaio de MLR; e (xii) reprime crescimento de tumor e aumenta sobrevida em indivíduos com câncer.

[00134] Os anticorpos da presente invenção podem possuir uma ou mais das características biológicas mencionadas acima, ou qualquer combinação da mesma. Outras características biológicas dos anticorpos da presente invenção estarão evidentes a uma pessoa de experiência ordinária na técnica de uma revisão da presente descrição incluindo os Exemplos de trabalho.

#### Seletividade de Espécies e Reatividade Cruzada de Espécies

[00135] De acordo com certas modalidades da invenção, os anticorpos anti-PD-1 ligam-se a PD-1 humano porém não a PD-1 de outras espécies. Alternativamente, os anticorpos anti-PD-1 da invenção, em certas modalidades, ligam-se a PD-1 humano e a PD-1 de uma ou mais espécies não humanas. Por exemplo, os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ligar-se a PD-1 humano e podem ligar ou não ligar, como pode ser o caso, a um ou mais de PD-1 de camundongo, rato, cobaia, *hamster*, gerbil, porco, gato, cachorro, coelho, cabra, ovelha, vaca, cavalo, camelo, cinomolgos, saguí, reso ou chimpanzé. Em certas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ligar-se ao PD-1 de humano e cinomolgos com as mesmas afinidades ou com afinidades diferentes, porém não liga-se a PD-1 de rato e camundongo.

#### Mapeamento de Epítopo e Tecnologias Relacionadas

[00136] A presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 que interagem com um ou mais aminoácidos encontrados dentro de um ou mais domínios da molécula de PD-1 incluindo, por exemplo, domínio extracelular (semelhante a IgV), um domínio de transmembrana, e um domínio intracelular contendo o *motif* de inibição com base em tirosina imunoreceptor (ITIM) e *motif* comutador com base em tirosina imunoreceptor (ITSM). O epítopo p qual liga-se a anticorpos pode consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos localizadas dentro de quaisquer dos domínios mencionados acima da molécula de PD-1 (por exemplo um epítopo linear em um domínio). Alternativamente, o epítopo podem consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequência de aminoácido) localizada dentro de qualquer um ou ambos os domínios mencionados acima da molécula de PD-1 (por exemplo um epítopo conformacional).

[00137] Várias técnicas conhecidas a pessoas de experiência ordinária na técnica podem ser usadas para determinar se um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos" dentro de um polipeptídeo ou proteína. Técnicas exemplares incluem, por exemplo, ensaios de bloqueio cruzado rotineiros, tal como aqueles descritos em Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Outros métodos incluem análise mutacional de avaliação de, análise de mancha de peptídeo, (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), estudos cristalográficos de análise de clivagem de peptídeo e análise de NMR. Além disso, métodos tal como excisão de epítopo, extração de epítopo e modificação química de抗ígenos podem ser empregados (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com que um anticorpo interage é troca de hidrogênio/deutério detectada por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de troca de hidrogênio/deutério envolve deutério-rotulagem da proteína de interesse, seguido por ligação do anticorpo à proteína rotulada por deutério. Em seguida, o complexo de proteína/anticorpo é transferido a água e prótons trocáveis dentro de aminoácidos que são protegidos pelo complexo de anticorpo sofrem outra troca de deutério para hidrogênio em uma taxa mais lenta do que prótons trocáveis dentro de aminoácidos que não fazem parte da interface. Como um resultado, aminoácidos que

formam parte da interface de proteína/anticorpo podem reter deutério e portanto exibir massa relativamente mais alta comparada a aminoácidos não incluídos na interface. Depois da dissociação do anticorpo, a proteína alvo é submetida a clivagem de protease e análise de espectrometria de massa, desse modo revelando os resíduos rotulados por deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com que o anticorpo interage. *Veja, por exemplo, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259; Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A.*

[00138] O termo "epítopo" refere-se a um sítio em um antígeno o qual células B e/ou T respondem. Epítopos de célula B podem ser formados ambos a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos por reduplicação terciária de uma proteína. Epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos em exposição a solventes de desnaturação, visto que epítopos formados por reduplicação terciária são tipicamente perdidos em tratamento com solventes de desnaturação. Um epítopo tipicamente inclui pelo menos 3, e mais normalmente, pelo menos 5 ou 8-10 aminoácidos em uma conformação de espaço única.

[00139] Perfis de ajuda de modificação (MAPA), da mesma forma conhecido como Perfil de Anticorpo com base em Estrutura de Antígeno (ASAP) é um método que categoriza grandes números de anticorpos monoclonais (mAbs) dirigidos quimicamente contra o mesmo antígeno de acordo com as similaridades do perfil de ligação de cada anticorpo para quimicamente ou enzimaticamente modificar superfícies de antígeno (veja US 2004/0101920, aqui especificamente incorporado por referência em sua totalidade). Cada categoria pode refletir um epítopo único distintamente diferente de ou parcialmente sobrepondo com epítopo representado por outra categoria. Esta tecnologia permite filtragem rápida de anticorpos geneticamente idênticos, tal que

caracterização pode ser focalizada em anticorpos geneticamente distintos. Quando aplicado a avaliação de hibridoma, MAPA pode facilitar identificação de clones de hibridoma raros que produzem mAbs tendo as características desejadas. MAPA pode ser usado para ordenar os anticorpos da invenção em grupos de anticorpos ligando epítópos diferentes.

[00140] Em certas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de ligação de antígeno do mesmo ligam-se a um epítopo dentro de qualquer uma ou mais das regiões exemplificadas em PD-1, ou em forma natural, como exemplificado em SEQ ID NO: 327, ou recombinantemente produzido, como exemplificado em SEQ ID NOS: 321-324, ou a um fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção ligam a uma região extracelular compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em resíduos de aminoácido 21-171 de PD-1. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção ligam-se a uma região extracelular compreendendo um ou mais aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em resíduos de aminoácido 1-146 de PD-1 de cinomolgos, como exemplificado por SEQ ID NO: 322.

[00141] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção, como mostrados na Tabela 1, interagem com pelo menos uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em resíduos de aminoácido variando de cerca de posição 21 a cerca de posição 136 de SEQ ID NO: 327; ou resíduos de aminoácido variando de cerca de posição 136 a cerca de posição 171 de SEQ ID NO: 327. Estas regiões são parcialmente exemplificadas em SEQ ID NOs: 321-324.

[00142] A presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 que ligam-se ao mesmo epítopo, ou uma porção do epítopo, como quaisquer dos anticorpos exemplares específicos descrito aqui na Tabela 1, ou um anticorpo tendo as sequências de CDR de quaisquer dos anticorpos

exemplares descritos na Tabela 1. Igualmente, a presente invenção da mesma forma inclui anticorpos anti-PD-1 que competem para ligação a PD-1 ou um fragmento de PD-1 com quaisquer dos anticorpos exemplares específicos descritos aqui na Tabela 1, ou um anticorpo tendo as sequências de CDR de quaisquer dos anticorpos exemplares descritos na Tabela 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-PD-1 que competem cruzado para ligação a PD-1 com um ou mais anticorpos como definido no Exemplo 6 aqui (por exemplo, H2aM7788N, H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P e H2aM7795N).

[00143] Alguém pode facilmente determinar se um anticorpo liga-se ao mesmo epítopo como, ou compete por ligação com, um anticorpo anti-PD-1 de referência usando-se métodos rotineiros conhecidos na técnica. Por exemplo, determinar se um anticorpo de teste liga-se ao mesmo epítopo como um anticorpo anti-PD-1 de referência da invenção, o anticorpo de referência é permitido ligar-se a uma proteína de PD-1 ou peptídeo sob condições de saturação. Logo, a capacidade de um anticorpo de teste ligar-se à molécula de PD-1 é avaliada. Se o anticorpo de teste é capaz de ligar-se a PD-1 seguindo ligação de saturação com o anticorpo anti-PD-1 de referência, pode ser concluído que o anticorpo de teste liga-se a um epítopo diferente do que o anticorpo anti-PD-1 de referência. Por outro lado, se o anticorpo de teste não é capaz de ligar-se à proteína de PD-1 seguindo ligação de saturação com o anticorpo anti-PD-1 de referência, em seguida o anticorpo de teste pode ligar-se ao mesmo epítopo como o epítopo ligado pelo anticorpo anti-PD-1 de referência da invenção.

[00144] Para determinar se um anticorpo compete por ligação com

um anticorpo anti-PD-1 de referência, a metodologia de ligação descrita acima é realizada em duas orientações: Em uma primeira orientação, o anticorpo de referência é permitido ligar-se a uma proteína de PD-1 sob condições de saturação seguido por avaliação de ligação do anticorpo de teste à molécula de PD-1. Em uma segunda orientação, o anticorpo de teste é permitido ligar-se a uma molécula de PD-1 sob condições de saturação seguido por avaliação de ligação do anticorpo de referência à molécula de PD-1. Se, em ambas as orientações, apenas o primeiro (saturação) anticorpo é capaz de ligação à molécula de PD-1, em seguida é concluído que o anticorpo de teste e o anticorpo de referência competem por ligação a PD-1. Como será apreciado por uma pessoa de experiência ordinária na técnica, um anticorpo que compete por ligação com um anticorpo de referência pode não necessariamente ligar-se ao epítopo idêntico como o anticorpo de referência, porém pode estericamente bloqueiam ligação do anticorpo de referência ligando-se um epítopo de sobreposição ou adjacente.

[00145] Dois anticorpos ligam-se ao mesmo ou epítopo de sobreposição se cada competitivamente inibe (bloqueios) ligação do outro ao antígeno. Isto é, um excesso de 1-, 5-, 10-, 20- ou 100 vezes de um anticorpo inibe ligação do outro em pelo menos 50% porém preferivelmente 75%, 90% ou até mesmo 99% como medido em um ensaio de ligação competitivo (veja, por exemplo, Junghans e outro, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Alternativamente, dois anticorpos tem o mesmo epítopo se essencialmente todas as mutações de aminoácido no antígeno que reduz ou elimina ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam ligação da outra. Dois anticorpos têm epítopos de sobreposição se algumas mutações de aminoácido que reduzem ou eliminam ligação de um anticorpo reduzirem ou eliminam ligação do outro.

[00146] Experimentação rotineira adicional (por exemplo, mutação

de peptídeo e análises de ligação) pode em seguida ser realizada para confirmar se a falta observada de ligação do anticorpo de teste é de fato devido a ligação ao mesmo epítopo como o anticorpo de referência ou se bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável pela falta de ligação observada. Experiências deste tipo podem ser realizadas usando ELISA, RIA, ressonância de plásmon superficial, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio de ligação de anticorpo quantitativo ou qualitativo disponível na técnica.

### Imunoconjugados

[00147] A invenção abrange um anticorpo monoclonal anti-PD-1 humano conjugado em uma porção terapêutica (“imunoconjugado”), tal como uma citotoxina ou um agente quimioterapêutico para tratar câncer. Quando aqui usado, o termo “imunoconjugado” refere-se a um anticorpo que é quimicamente ou biologicamente ligado a uma citotoxina, agente radioativo, uma citocina, um interferon, um alvo ou porção repórter, uma enzima, uma toxina, um peptídeo ou proteína ou um agente terapêutico. O anticorpo pode ser ligado à citotoxina, agente radioativo, citocina, interferon, alvo ou porção repórter, enzima, toxina, peptídeo ou agente terapêutico em qualquer local ao longo da molécula contanto que seja capaz de ligar seu alvo. Exemplos de imunoconjugados incluem conjugados de fármaco de anticorpo e proteínas de fusão de anticorpo-toxina. Em uma modalidade, o agente pode ser um segundo anticorpo diferente para PD-1. Em certas modalidades, o anticorpo pode ser conjugado a um agente específico para uma célula de tumor ou um célula viralmente infectada. O tipo de porção terapêutica que pode ser conjugada ao anticorpo anti-PD-1 e levará em conta a condição a ser tratada e o efeito terapêutico desejado a ser obtido. Exemplos de agentes adequados por formar imunoconjugados são conhecidos na técnica; veja por exemplo, WO 05/103081.

### Anticorpos Multi-específicos

[00148] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos, ou multiespecíficos. Anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para epítópos diferentes de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação de antígeno específicos para mais do que um polipeptídeo alvo. Veja, por exemplo, Tutt e outro, 1991, J., Immunol. 147:60-69; Kufer e outro, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

[00149] Em um aspecto, a presente invenção inclui moléculas de ligação de antígeno multiespecíficas ou fragmentos de ligação de antígeno das mesmas em que uma especificidade de uma imunoglobulina é específica para o domínio extracelular de PD-1, ou um fragmento do mesmo, e a outra especificidade da imunoglobulina é específica para ligação fora do domínio extracelular de PD-1, ou um segundo alvo terapêutico, ou é conjugado em uma porção terapêutica. Em certas modalidades, a primeira especificidade de ligação de antígeno pode compreender PD-L1 ou PD-L2, ou um fragmento do mesmo. Em certas modalidades da invenção, uma especificidade de um imunoglobulina é específica para um epítopo compreendendo resíduos de 21-171 de PD-1 (SEQ ID NO: 327) ou um fragmento dos mesmos, e a outra especificidade da imunoglobulina é específica para um segundo antígeno alvo. O segundo antígeno alvo pode estar na mesma célula como PD-1 ou em uma célula diferente. Em uma modalidade, a segunda célula alvo está em uma célula imune diferente de uma célula T tal como uma célula B, enquanto célula de apresentação de antígeno, monócito, macrófago, ou célula dendrítica. Em algumas modalidades, o segundo antígeno alvo pode estar presente em uma célula de tumor ou uma célula de tecido autoimune ou em uma célula viralmente infectada.

[00150] Em outro aspecto, a invenção fornece moléculas de ligação de antígeno multiespecíficas ou fragmentos de ligação de antígeno das mesmas compreendendo uma primeira especificidade de ligação de

antígeno que liga-se a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação de antígeno que ligam-se a um receptor de célula T, um receptor de célula B ou um receptor de Fc. Em um aspecto relacionado, a invenção fornece moléculas de ligação de antígeno multiespecíficas ou fragmentos de ligação de antígeno das mesmas compreendendo uma primeira especificidade de ligação de antígeno que liga-se a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação de antígeno tal como as que ligam-se a um co-inibidor de célula T diferente LAG-3, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, TIM3, LAIR1, ICOS e CD160.

[00151] Em outro aspecto, a invenção fornece moléculas de ligação de antígeno multiespecíficas ou fragmentos de ligação de antígeno das mesmas compreendendo uma primeira especificidade de ligação de antígeno que liga-se a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação de antígeno que ligam-se a um antígeno específico de tecido autoimune. Em certas modalidades, os anticorpos podem ser anticorpos de ativação ou agonistas.

[00152] Quaisquer das moléculas de ligação de antígeno multiespecíficas da invenção, ou variantes das mesmas, pode ser construídas usando técnicas biológicas moleculares padrões (por exemplo, DNA recombinante e tecnologia de expressão de proteína), como será conhecido a uma pessoa de experiência ordinária na técnica.

[00153] Em algumas modalidades, anticorpos PD-1 específicos são gerados em um formato biespecífico (um "biespecífico") em que regiões variáveis que ligam-se a domínios distintos de PD-1 são ligadas juntas para conferir especificidade de domínio dual dentro de uma única molécula de ligação. Bi-específicos adequadamente designados podem realçar eficácia inibitória de PD-1 total para aumentar ambos, especificidade avidez de ligação. Regiões variáveis com especificidade para domínios individuais, (por exemplo, segmentos do domínio de terminal N), ou que pode ligar-se a regiões diferentes dentro de um

domínio, são emparelhadas em um andaime estrutural que permite cada região ligar-se simultaneamente aos epítopos separados, ou a regiões diferentes dentro de um domínio. Em um exemplo para regiões variáveis biespecíficas, de cadeia pesada ( $V_H$ ) de um aglutinante com especificidade para um domínio são recombinados com regiões variáveis de cadeia leve ( $V_L$ ) de uma série de aglutinantes com especificidade para um segundo domínio para identificar parceiros de  $V_L$  não cognato que podem ser emparelhados com um  $V_H$  original sem romper a especificidade original para aquela  $V_H$ . Desta maneira, um único segmento de  $V_L$  (por exemplo,  $V_L1$ ) pode ser combinado com dois domínios de  $V_H$  diferentes (por exemplo,  $V_H1$  e  $V_H2$ ) para gerar um biespecífico compreendido de dois "braços" de ligação ( $V_H1 - VL1$  e  $V_H2 - VL1$ ). Uso de um único segmento de  $V_L$  reduz a complexidade do sistema e desse modo simplifica e aumenta eficiência em clonagem, expressão, e processos de purificação usados para gerar o biespecífico (Veja, por exemplo, USSN13/022759 e US2010/0331527).

[00154] Alternativamente, anticorpos que ligam mais do que um domínio e um segundo alvo, tal como, porém não limitado a, por exemplo, um segundo anticorpo anti-PD-1 diferente, podem ser preparados em um formato biespecífico usando técnicas descritas aqui, ou outras técnicas conhecidas aqueles versados na técnica. Ligações de regiões variáveis de anticorpo ligando-se a regiões distintas podem ser ligadas juntamente com regiões variáveis em que ligam-se a sítios relevantes, por exemplo, o domínio extracelular de PD-1, para conferir especificidade de antígeno dual dentro de uma única molécula de ligação. Biespecíficos adequadamente designados desta natureza servem uma função dual. Regiões variáveis com especificidade para o domínio extracelular são combinadas com uma região variável com especificidade para fora do domínio extracelular e são emparelhadas em um andaime estrutural que permite cada região variável ligar-se aos

antígenos separados.

[00155] Um formato de anticorpo biespecífico exemplar que pode ser usado no contexto da presente invenção envolve o uso de um primeiro domínio de C<sub>H</sub>3 de imunoglobulina (Ig) e um segundo domínio de C<sub>H</sub>3 Ig, em que o primeiro e segundo domínios de C<sub>H</sub>3 Ig diferem-se um do outro em pelo menos um aminoácido, e em que pelo menos uma diferença de aminoácido reduz ligação do anticorpo biespecífico a Proteína A quando comparado a um anticorpo biespecífico que necessita da diferença de aminoácido. Em uma modalidade, o primeiro domínio de C<sub>H</sub>3 Ig liga-se a Proteína A e o segundo domínio de C<sub>H</sub>3 Ig contém uma mutação que reduz ou abole ligação de Proteína A tal como uma modificação de H95R (por numeração de IMGT exon; H435R por numeração EU). O segundo C<sub>H</sub>3 pode também compreender uma modificação de Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Outras modificações que podem ser encontradas dentro do segundo C<sub>H</sub>3 incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, e V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG1; N44S, K52N, e V82I (IMGT; N384S, K392N, e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG4. Variações no formato de anticorpo biespecífico descritos acima são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[00156] Outros formatos biespecíficos exemplares que podem ser usados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, formatos biespecíficos de diacorpo ou com base em scFv, fusões de IgG-scFv, domínio variável dual (DVD)-Ig, Quadroma, *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com *knobs-into-holes*, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, zíper da leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de ação dual (DAF)-IgG, e formatos

biespecíficos de Mab<sup>2</sup> (veja, por exemplo, Klein e outro 2012, mAbs 4:6, 1-11, e referências citadas aqui, para uma revisão dos formatos anteriores). Anticorpos biespecíficos podem da mesma forma ser construídos usando conjugação de peptídeo/ácido nucléico, por exemplo, em que aminoácidos não naturais com reatividade química ortogonal são usados para gerar conjugados de anticorpo-oligonucleotídeo sítio-específicos que em seguida auto-reunem em complexos multiméricos com composição definida, valência e geometria. (Veja, por exemplo, Kazane e outro, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

#### Administração Terapêutica e Formulações

[00157] A invenção fornece composições terapêuticas compreendendo os anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos da presente invenção. Composições terapêuticas de acordo com a invenção serão administradas com veículos adequados, excipientes, e outros agentes que estão incorporados em formulações para fornecer transferência melhorada, liberação, tolerância, e similar. Uma multidão de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido a todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, ungüentos, geléias, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídio (catiônico ou aniónico) (tal como LIPOFECTIN™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidrosas, emulsões de óleo-em-água e água-em-óleo, carbocera de emulsões (polietileno glicóis de vários pesos moleculares), géis semi-sólidos, e misturas semi-sólidas contendo carbocera. Veja da mesma forma Powell e outro "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

[00158] A dose de anticorpo pode variar, dependendo da idade e do

tamanho de um indivíduo a ser administrada, doença alvo, condições, rotina de administração, e similar. Quando um anticorpo da presente invenção é usado para tratar uma doença ou distúrbio em um paciente adulto, ou para prevenir uma tal doença, é vantajoso administrar o anticorpo da presente invenção normalmente em uma única dose de cerca de 0,1 a cerca de 60 mg/kg de peso corporal, mais preferivelmente cerca de 5 a cerca de 60, cerca de 10 a cerca de 50, ou cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. Dependendo da severidade da condição, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustados. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção pode ser administrado como uma dose inicial de pelo menos cerca de 0,1 mg a cerca de 800 mg, cerca de 1 a cerca de 500 mg, cerca de 5 a cerca de 300 mg, ou cerca de 10 a cerca de 200 mg, a cerca de 100 mg, ou a cerca de 50 mg. Em certas modalidades, a dose inicial pode ser seguida por administração de uma segundo ou uma pluralidade de doses subsequentes do anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo em uma quantidade que pode ser cerca da mesma ou menor do que aquela dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas em pelo menos 1 dia a 3 dias; pelo menos uma semana, pelo menos 2 semanas; pelo menos 3 semanas; pelo menos 4 semanas; pelo menos 5 semanas; pelo menos 6 semanas; pelo menos 7 semanas; pelo menos 8 semanas; pelo menos 9 semanas; pelo menos 10 semanas; pelo menos 12 semanas; ou pelo menos 14 semanas.

[00159] Vários sistemas de liberação são conhecidos e podem ser usados para administrar a composição farmacêutica da invenção, por exemplo, encapsulação em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutante, endocitose mediada por receptor (veja, por exemplo, Wu e outro (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Métodos de introdução

incluem, porém não são limitados a, rotinas intradérmicas, transdérmicas, intramusculares, intraperitoneais, intravenosas, subcutâneas, intranasais, anestesia epidural e orais. A composição pode ser administrada por qualquer rotina conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bolo, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e pode ser administrada juntamente com outros agentes biologicamente ativos. Administração pode ser sistêmica ou local. A composição farmacêutica pode da mesma forma ser liberada em uma vesícula, em particular um lipossoma (veja, por exemplo, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

[00160] O uso de nanopartículas para liberar os anticorpos da presente invenção é da mesma forma contemplado aqui. Nanoparticles conjugadas de anticorpo podem ser usadas igualmente para aplicações terapêuticas e diagnósticas. Nanopartículas conjugadas de anticorpo e métodos de preparação e uso são descritos em detalhes por Arruebo, M., e outro 2009 (“Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications” in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), incorporado aqui por referência. Nanopartículas podem ser desenvolvidas e conjugadas a anticorpos contidos em composições farmacêuticas para alvejar células de tumor ou células de tecido autoimunes ou células viralmente infectadas. Nanopartículas para liberação de fármaco foram da mesma forma descritas em, por exemplo, US 8257740, ou US 8246995, cada qual incorporada aqui em sua totalidade.

[00161] Em certas situações, a composição farmacêutica pode ser liberada em um sistema de liberação controlado. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada. Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser usados. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado em proximidade do alvo da

composição, desse modo requerendo apenas uma fração da dose sistêmica.

[00162] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosas, subcutâneas, intracutâneas, intracranianas, intraperitoneais e intramusculares, infusões de gota, etc. Estas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos publicamente conhecidos. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, dissolvendo-se, suspensando-se ou emulsificando-se o anticorpo ou seu sal descrito acima em um meio aquoso estéril ou um médio oleoso convencionalmente usado para injeções. Como o meio aquoso para injeções, há, por exemplo, solução salina fisiológica, uma solução isotônica contendo glicose e outros agentes auxiliares, etc., que pode ser usado em combinação com um agente de solubilização apropriado tal como um álcool (por exemplo, etanol), um polialcool (por exemplo, propileno glicol, polietileno glicol), um tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) adutor de óleo de rícino hidrogenado)], etc. Como o meio oleoso, são empregados, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de soja, etc., que pode ser usado em combinação com um agente de solubilização tal como benzoato de benzila, álcool benzílico, etc. A injeção desse modo preparada é preferivelmente carregada em uma ampola apropriada.

[00163] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser liberada subcutaneamente ou intravenosamente com uma agulha padrão e seringa. Além disso, com respeito a liberação subcutânea, um dispositivo de liberação tipo caneta facilmente tem aplicações liberando-se uma composição farmacêutica da presente invenção. Um tal dispositivo de liberação tipo caneta pode ser reutilizável ou disponível. Um dispositivo de liberação tipo caneta reutilizável geralmente utiliza um cartucho substituível que contém uma composição farmacêutica. Uma

vez que toda composição farmacêutica dentro do cartucho foi administrada e o cartucho está vazio, o cartucho vazio pode facilmente ser descartado e substituído com um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de liberação tipo caneta pode em seguida ser reutilizado. Em um dispositivo de liberação tipo caneta disponível, não há cartucho substituível. Em vez disso, o dispositivo de liberação tipo caneta disponível vem pré-carregado com a composição farmacêutica contida um reservatório dentro do dispositivo. Uma vez que o reservatório é esvaziado da composição farmacêutica, o dispositivo inteiro é descartado.

[00164] Numerosos dispositivos de liberação tipo caneta de autoinjetores reutilizáveis têm aplicações na liberação subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Exemplos incluem, porém certamente não são limitado a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ pen (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), HUMALOG MIX 75/25™ pen, HUMALOG™ pen, HUMALIN 70/30™ pen (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II and III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD™ pen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, and OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), para nomear apenas alguns. Exemplos de dispositivos de liberação tipo caneta disponíveis que têm aplicações em liberação subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, porém certamente não são limitados à SOLOSTAR™ pen (Sanofi-Aventis), the FLEXPEN™ (Novo Nordisk), and the KWIKPEN™ (Eli Lilly), the SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA), the PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), the EPIPEN (Dey, L.P.) and the HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL), para nomear apenas

alguns.

[00165] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para uso oral ou parenteral descritos acima são preparadas em formas de dosagem em uma dose unitária adequada para ajustar uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagem em uma dose unitária adequada incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios, etc. A quantidade do anticorpo contida é geralmente cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente na forma de injeção, é preferido que o anticorpo esteja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para as outras formas de dosagem.

#### Usos Terapêuticos dos Anticorpos

[00166] Os anticorpos da invenção são úteis, entre outros, para o tratamento, prevenção e/ou melhora de qualquer doença ou distúrbio associado com ou mediado por expressão de PD-1, sinalização, ou atividade, ou tratável bloqueando-se a interação entre PD-1 e um ligante de PD-1 (por exemplo, PD-L1, ou PD-L2) ou de outra maneira inibindo-se atividade e/ou sinalização de PD-1. Por exemplo, a presente invenção fornece métodos para tratar câncer (inibição de crescimento de tumor), infecções virais crônicas e/ou doença auto-imune administrando um anticorpo anti-PD-1 (ou composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti-PD-1) como descrito aqui a um paciente em necessidade de tal tratamento. Os anticorpos da presente invenção são úteis para o tratamento, prevenção, e/ou melhora de doença ou distúrbio ou condição tal como câncer, doença auto-imune ou uma infecção viral e//ou para melhorar pelo menos um sintoma associado com tal doença, distúrbio ou condição. No contexto dos métodos de tratamento descritos aqui, o anticorpo anti-PD-1 pode ser administrado como uma monoterapia (isto é, como o único agente terapêutico) ou em combinação com um ou mais agentes terapêuticos

adicionais (exemplos dos quais são descrito em outro lugar aqui).

[00167] Em algumas modalidades da invenção, os anticorpos descritos aqui são úteis para tratar indivíduos sofrendo de câncer primário ou periódico, incluindo, porém não limitado a, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, câncer do pulmão de célula não pequena, câncer de cérebro (por exemplo, glioblastoma multiforme), carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, câncer gástrico, câncer de próstata, câncer ovariano, câncer de rim, câncer de mama, mieloma múltiplo, e melanoma.

[00168] Os anticorpos podem ser usados para tratar sintomas em estágio precoce ou estágio tardio de câncer. Em uma modalidade, um anticorpo ou fragmento do mesmo da invenção pode ser usado para tratar câncer metastático. Os anticorpos são úteis reduzindo-se ou inibindo-se ou encolhendo crescimento de tumor de tumores sólidos e cânceres de sangue. Em certas modalidades, tratamento com um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção leva a mais do que 50% de regressão, mais do que 60% de regressão, mais do que 70% de regressão, mais do que 80% de regressão ou mais do que 90% de regressão de um tumor em um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos podem ser usados para prevenir recaída de um tumor. Em certas modalidades, os anticorpos são úteis estendendo-se sobrevivência total em um indivíduo com câncer. Em algumas modalidades, os anticorpos são úteis reduzindo-se toxicidade devido a quimioterapia ou radioterapia mantendo sobrevivência a longo prazo em um paciente sofrendo de câncer.

[00169] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para tratar indivíduo sofrendo de uma infecção viral crônica. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis diminuindo-se títulos virais no hospedeiro e/ou resgatar células T esgotadas. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento do mesmo da invenção

pode ser usado para tratar infecção viral crônica por vírus da coriomeningite linfocítico (LCMV). Em algumas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo a invenção pode ser administrada em uma dose terapêutica a um paciente com uma infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou papiloma vírus humano (HPV) ou da hepatite B/C (HBV/HCV). Em uma modalidade relacionada, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção pode ser usado para tratar uma infecção por vírus de imunodeficiência de símio (SIV) em um indivíduo símio tal como cinomolgos.

[00170] Em certas modalidades um anticorpo de bloqueio da presente invenção pode ser administrado em uma quantidade terapeuticamente eficaz a um indivíduo sofrendo de um câncer ou uma infecção viral.

[00171] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para tratar uma doença auto-imune, incluindo porém não limitado a, alopecia em áreas, hepatite autoimune, doença celíaca, doença de Grave, síndrome de Guillain-Barre, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, doença inflamatória intestinal, miopatias inflamatórias, esclerose múltipla, cirrose biliar primária, psoríase, artrite reumatoide, escleroderma, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, vitílico, pancreatite autoimune, urticária autoimune, púrpura trombocitopênica autoimune, doença de Crohn, diabetes Tipo I, fasciite eosinofílica, enterogastrite eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, artrite psoriática, febre reumática, colites ulcerativas, vasculite e granulomatose de Wegener. Em certas modalidades, um anticorpo de ativação da invenção pode ser usado para tratar um indivíduo sofrendo de doença auto-imune.

[00172] Um ou mais anticorpos da presente invenção podem ser administrados para aliviar ou prevenir ou diminuir a severidade de um

ou mais dos sintomas ou condições da doença ou distúrbio.

[00173] É da mesma forma contemplado aqui usar um ou mais anticorpos da presente invenção profilaticamente a pacientes em risco de contrair uma doença ou distúrbio tal como câncer, doença auto-imune e infecção viral crônica.

[00174] Em uma outra modalidade da invenção os presentes anticorpos são usados para a preparação de uma composição farmacêutica para tratar pacientes sofrendo de câncer, doença auto-imune ou infecção viral. Em outra modalidade da invenção, os presentes anticorpos são usados como terapia de suplemento com qualquer outro agente ou qualquer outra terapia conhecida aqueles versados na técnica útil para tratar câncer, doença auto-imune ou infecção viral.

#### Terapias de Combinação e Formulações

[00175] Terapias de combinação podem incluir um anticorpo anti-PD-1 da invenção e qualquer agente terapêutico adicional que podem ser vantajosamente combinados com um anticorpo da invenção, ou com um fragmento biologicamente ativo de um anticorpo da invenção.

[00176] Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados sinergisticamente com um ou mais fármacos anti-câncer ou terapia usada para tratar câncer, incluindo, por exemplo, carcinoma de célula renal, câncer colorretal, glioblastoma multiforme, carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço, câncer do pulmão de célula não pequena, câncer de cólon, câncer ovariano, adenocarcinoma, câncer de próstata, glioma, e melanoma. É contemplado usar anticorpos anti-PD-1 da invenção em combinação com terapias imunoestimuladoras e/ou imunossuprimento para inibir crescimento de tumor, e/ou realçar sobrevivência de pacientes de câncer. As terapias imunoestimuladoras incluem terapias imunoestimulatórias diretas para aumentar atividade de célula imune por “liberar o freio” em células imunes suprimidas ou “pisar no acelerador” para ativar uma resposta imune. Exemplos incluem

alvejar outros receptores de ponto de controle, vacinação e adjuvantes. As modalidades de imunossuporte podem aumentar antigenicidade do tumor promovendo-se morte de célula imunogênica, inflamação ou tem outros efeitos indiretos que promovem um resposta imune anti-tumor. Exemplos incluem radiação, quimioterapia, agentes anti-angiogênicos, e cirurgia.

[00177] Em várias modalidades, um ou mais anticorpos da presente invenção podem ser usados em combinação com um anticorpo para PD-L1, um segundo anticorpo para PD-1 (por exemplo, nivolumab), um inibidor de LAG-3, um inibidor de CTLA-4 (por exemplo, ipilimumab), um inibidor de TIM3, um inibidor de BTLA, um inibidor de TIGIT, um inibidor de CD47, antagonista de outro co-inibidor de célula T ou ligante (por exemplo, um anticorpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 ou VISTA), um inibidor de indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), um antagonista de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) [por exemplo, um “VEGF-Trap” tal como afibbercept ou outra proteína de fusão de inibição de VEGF como mencionado em US 7,087,411, ou um anticorpo anti-VEGF ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo (por exemplo, bevacizumab, ou ranibizumab) ou um inibidor de molécula cinase pequena de receptor de VEGF (por exemplo, sunitinib, sorafenib, ou pazopanib)], um inibidor de Ang2 (por exemplo, nesvacumab), um inibidor de fator beta de crescimento de transformação (TGF $\beta$ ), um inibidor de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, erlotinib, cetuximab), um agonista para um receptor co-estimulador (por exemplo, um agonista para proteína relacionada a TNFR induzida por glucocorticóide), um anticorpo para um antígeno específico de tumor (por exemplo, CA9, CA125, antígeno associado a melanoma 3 (MAGE3), antígeno carcinoembriônico (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de próstata (PSA), mucina-1, MART-1, e CA19-9), uma vacina (por exemplo, Bacillus Calmette-Guerin, uma

vacina de câncer), um adjuvante para aumentar apresentação de antígeno (por exemplo, fator de estimulação de colônia de granulócito-macrófago), um anticorpo biespecífico (por exemplo, anticorpo CD3xCD20 biespecífico, anticorpo PSMAxCD3 biespecífico), uma citotoxina, agente quimioterapêutico (por exemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, cisplatina, carboplatina, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatina, paclitaxel, e vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, um inibidor de IL-6R (por exemplo, sarilumabe), um inibidor de IL-4R (por exemplo, dupilumabe), um inibidor de IL-10, um citocina tal como IL-2, IL-7, IL-21, e IL-15, um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC) (por exemplo, anti-CD19-DM4 ADC, e anti-DS6-DM4 ADC), um fármaco antiinflamatório (por exemplo, corticosteroides, e fármacos antiinflamatórios não esteróides), um suplemento dietético tal como antioxidantes ou qualquer cuidado paliativo para tratar câncer. Em certas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 da presente invenção podem ser usados em combinação com vacinas de câncer que incluem vacinas de célula dendríticas, vírus oncolíticos, vacinas de célula de tumor, etc. para aumentar a resposta anti-tumor. Exemplos de vacinas de câncer que podem ser usadas em combinação com anticorpos anti-PD-1 da presente invenção incluem vacina de MAGE3 para melanoma e câncer de bexiga, vacina de MUC1 para câncer de mama, EGFRv3 (por exemplo, Rindopepimut) para câncer de cérebro (incluindo glioblastoma multiforme), ou ALVAC-CEA (para cânceres de CEA+).

[00178] Em certas modalidades os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser administrados em combinação com terapia de radiação em métodos para gerar respostas anti-tumor durável a longo prazo e/ou realçar sobrevivência de pacientes com câncer. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser administrados antes de, concomitantemente ou depois de administrar

terapia de radiação a um paciente de câncer. Por exemplo, terapia de radiação pode ser administrada em uma ou mais doses em lesões de tumor seguidas por administração de uma ou mais doses de anticorpos anti-PD-1 da invenção. Em algumas modalidades, terapia de radiação pode ser administrada localmente a uma lesão de tumor para aumentar a imunogenicidade local do tumor de um paciente (radiação adjuvante) e/ou matar células de tumor (radiação ablativa) seguido por administração sistêmica de um anticorpo anti-PD-1 da invenção. Por exemplo, radiação intracrania pode ser administrada a um paciente com câncer de cérebro (por exemplo, glioblastoma multiforme) em combinação com administração sistêmica de um anticorpo anti-PD-1 da invenção. Em certas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser administrados em combinação com terapia de radiação e um agente quimioterapêutico (por exemplo, temozolomida) ou antagonista de VEGF (por exemplo, afilibercept).

[00179] Em certas modalidades os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser administrados em combinação com um ou mais fármacos antivirais para tratar infecção viral crônica por LCMV, HIV, HPV, HBV ou HCV. Exemplos de fármacos antivirais incluem, porém não são limitados a, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina e corticosteroides. Em algumas modalidades os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser administrados em combinação com um inibidor de LAG3, um inibidor de CTLA-4 ou qualquer antagonista de outro co-inibidor de célula T para tratar infecção viral crônica.

[00180] Em certas modalidades os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser combinados com um anticorpo para um receptor de Fc em células imunes para o tratamento de uma doença auto-imune. Em uma modalidade, um anticorpo ou fragmento do mesmo da invenção é administrado em combinação com um anticorpo ou proteína de ligação

de antígeno alvejado por um antígeno específico para tecido autoimune. Em certas modalidades, um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo da invenção é administrado em combinação com um anticorpo ou proteína de ligação de antígeno alvejado por um receptor de célula T ou um receptor de célula B, incluindo porém não limitado a, Fc $\alpha$  (por exemplo, CD89), Fc $\gamma$  (por exemplo, CD64, CD32, CD16a, e CD16b), CD19, etc. Os anticorpos de fragmentos dos mesmos da invenção podem ser usados em combinação com qualquer fármaco ou terapia conhecida na técnica (por exemplo, corticosteroides e outros imunossupressores) para tratar uma doença auto-imune ou distúrbio incluindo, porém não limitado a alopecia em áreas, hepatite autoimune, doença celíaca, doença de Grave, síndrome de Guillain-Barre, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, doença inflamatória intestinal, miopatias inflamatórias, esclerose múltipla, cirrose biliar primária, psoríase, artrite reumatoide, escleroderma, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, vitiligo, pancreatite autoimune, urticária autoimune, púrpura trombocitopênica autoimune, doença de Crohn, diabetes Tipo I, fasciite eosinofílica, enterogastrite eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, artrite psoriática, febre reumática, colites ulcerativas, vasculite e granulomatose de Wegener.

[00181] O(s) agente(s)/componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicionais podem ser administrado antes de, simultâneo com, ou depois da administração do anticorpo anti-PD-1 da presente invenção. Para propósitos da presente descrição, tais regimes de administração são considerados a administração de um anticorpo anti-PD-1 "em combinação com" um segundo componente terapeuticamente ativo.

[00182] O(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional(is) pode(m) ser administrado(s) a um indivíduo antes da administração de um anticorpo anti-PD-1 da presente invenção. Por exemplo, um primeiro componente pode ser julgado ser administrado "antes de" um segundo

componente se o primeiro componente é administrado 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes, ou menos de 1 minuto antes da administração do segundo componente. Em outras modalidades, o(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional(is) pode(m) ser administrado(s) a um indivíduo depois da administração de um anticorpo anti-PD-1 da presente invenção. Por exemplo, um primeiro componente pode ser julgado ser administrado "depois de" um segundo componente se o primeiro componente é administrado 1 minuto depois, 5 minutos depois, 10 minutos depois, 15 minutos depois, 30 minutos depois, 1 hora depois, 2 horas depois, 3 horas depois, 4 horas depois, 5 horas depois, 6 horas depois, 12 horas depois, 24 horas depois, 36 horas depois, 48 horas depois, 60 horas depois, 72 horas depois da administração do segundo componente. Em ainda outras modalidades, o(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional(is) pode(m) ser administrado(s) a um indivíduo simultâneo com administração de um anticorpo anti-PD-1 da presente invenção. Administração "simultânea", para propósitos da presente invenção, inclui, por exemplo, administração de um anticorpo anti-PD-1 e um componente terapeuticamente ativo adicional a um indivíduo em uma única forma de dosagem (por exemplo, co-formulado), ou em formas de dosagem separadas administradas ao indivíduo dentro de cerca de 30 minutos ou menos de cada outro. Se administrada em formas de dosagem separadas, cada forma de dosagem pode ser administrada pela mesma rotina (por exemplo, o anticorpo anti-PD-1 e o componente terapeuticamente ativo adicional podem ser administrado intravenosamente, subcutaneamente, etc.); alternativamente, cada forma de dosagem pode ser administrada por uma rotina diferente (por

exemplo, o anticorpo anti-PD-1 pode ser administrado intravenosamente, e o componente terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado subcutaneamente). Em todo caso, administrando os componentes em uma única dosagem de, em formas de dosagem separadas pela mesma rotina, ou em formas de dosagem separadas por rotinas diferentes são todas consideradas "administração simultânea," para propósitos da presente descrição. Para propósitos da presente descrição, administração de um "anticorpo anti-PD-1 antes de," "simultâneo com," ou "depois de" (como esses termos estão aqui acima definidos) administração de um componente terapeuticamente ativo adicional é considerada administração de um "anticorpo anti-PD-1 em combinação com" um componente terapeuticamente ativo adicional).

[00183] A presente invenção inclui composições farmacêuticas em que um anticorpo anti-PD-1 da presente invenção é co-formulado com um ou mais do(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional(is) como descrito em outro lugar aqui usando uma variedade de combinações de dosagem.

[00184] Em modalidades exemplares em que um anticorpo anti-PD-1 da invenção é administrado em combinação com um antagonista de VEGF (por exemplo, uma armadilha de VEGF tal como aflibercept), incluindo administração de co-formulações compreendendo um anticorpo anti-PD-1 e um antagonista de VEGF, os componentes individuais podem ser administrados a um indivíduo e/ou co-formulado usando uma variedade de combinações de dosagem. Por exemplo, o anticorpo anti-PD-1 pode ser administrado a um indivíduo e/ou contido em uma co-formulação em uma quantidade selecionada a partir do grupo consistindo em 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 3,5 mg, 4,0 mg, 4,5 mg, 5,0 mg, 6,0 mg, 7,0 mg, 8,0 mg, 9,0 mg, e 10,0 mg; e o antagonista de VEGF

(por exemplo, uma armadilha de VEGF tal como afibbercept) pode ser administrado ao indivíduo e/ou contido em uma co-formulação em uma quantidade selecionada a partir do grupo consistindo em 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,1 mg, 1,2 mg, 1,3 mg, 1,4 mg, 1,5 mg, 1,6 mg, 1,7 mg, 1,8 mg, 1,9 mg, 2,0 mg, 2,1 mg, 2,2 mg, 2,3 mg, 2,4 mg, 2,5 mg, 2,6 mg, 2,7 mg, 2,8 mg, 2,9 mg e 3,0 mg. As combinações/co-formulações podem ser administradas a um indivíduo de acordo com quaisquer dos regimes de administração descritos em outro lugar aqui, incluindo, por exemplo, duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada 2 semanas, uma vez a cada 3 semanas, uma vez por meses, uma vez a cada 2 meses, uma vez a cada 3 meses, uma vez a cada 4 meses, uma vez a cada 5 meses, uma vez a cada 6 meses, etc.

#### Regimes Administrativos

[00185] De acordo com certas modalidades da presente invenção, doses múltiplas de um anticorpo anti-PD-1 (ou uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo anti-PD-1 e quaisquer dos agentes terapeuticamente ativos adicionais mencionados aqui) podem ser administradas a um indivíduo durante um curso de tempo definido. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem sequencialmente administrar a um indivíduo doses múltiplas de um anticorpo anti-PD-1 da invenção. Quando aqui usado, "sequencialmente administrar" significa que cada dose de anticorpo anti-PD-1 é administrada ao indivíduo em um ponto de tempo diferente, por exemplo, em dias diferentes separados por um intervalo pré-determinado (por exemplo, horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui métodos compreendendo sequencialmente administrar ao paciente uma única dose inicial de um anticorpo anti-PD-1, seguido por uma ou mais doses secundárias do anticorpo anti-PD-1, e opcionalmente seguido por uma ou mais doses terciárias do anticorpo

anti-PD-1. O anticorpo anti-PD-1 pode ser administrado em uma dose entre 0,1 mg/kg a 100 mg/kg.

[00186] Os termos "dose inicial," "doses secundárias," e "doses terciárias," referem-se à sequência temporal de administração do anticorpo anti-PD-1 da invenção. Desse modo, a "dose inicial" é a dose que é administrada no começo do regime de tratamento (da mesma forma referido como "dose de linha base"); as "doses secundárias" são as doses que são administradas depois da dose inicial; e as "doses terciárias" são as doses que são administradas depois das doses secundárias. As doses iniciais, secundárias, e terciárias podem todas conter a mesma quantidade de anticorpo anti-PD-1, porém geralmente pode diferir-se uma da outra em termos de frequência de administração. Em certas modalidades, entretanto, a quantidade de anticorpo anti-PD-1 contida nas doses iniciais, secundárias e/ou terciárias variam uma da outra (por exemplo, ajustado acima ou abaixo quando apropriado) durante o curso de tratamento. Em certas modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, ou 5) doses são administradas no começo do regime de tratamento como "doses de carga" seguido por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente (por exemplo, "doses de manutenção").

[00187] Em certas modalidades exemplares da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada 1 a 26 (por exemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, ou mais) semanas depois da dose imediatamente anterior. A frase "a dose imediatamente anterior," quando aqui usada, significa, em uma sequência de administrações múltiplas, a dose de anticorpo anti-PD-1 que é administrada a um paciente antes da administração da dose muito próxima na sequência sem doses intervenientes.

[00188] Os métodos de acordo com este aspecto da invenção podem compreender administrar a um paciente qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de um anticorpo anti-PD-1. Por exemplo, em certas modalidades, apenas uma única dose secundária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) doses secundárias são administradas ao paciente. Igualmente, em certas modalidades, apenas uma única dose terciária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) doses terciárias são administradas ao paciente.

[00189] Em modalidades envolvendo doses secundárias múltiplas, cada dose secundária pode ser administrada na mesma frequência como as outras doses secundárias. Por exemplo, cada dose secundária pode ser administrada ao paciente 1 a 2 semanas ou 1 a 2 meses depois da dose imediatamente anterior. Similarmente, em modalidades envolvendo doses terciárias múltiplas, cada dose terciária pode ser administrada na mesma frequência como as outras doses terciárias. Por exemplo, cada dose terciária pode ser administrada ao paciente 2 a 12 semanas depois da dose imediatamente anterior. Em certas modalidades da invenção, a frequência em que doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente podem variar durante o curso do regime de tratamento. A frequência de administração pode da mesma forma ser ajustada durante o curso de tratamento por um médico dependendo das necessidades do paciente seguindo exame clínico individual.

[00190] A presente invenção inclui regimes de administração em que 2 a 6 doses de carregamento são administradas a um paciente em uma primeira frequência (por exemplo, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, etc.), seguido por administração de duas ou mais doses de manutenção ao paciente em uma base menos frequente.

Por exemplo, de acordo com este aspecto da invenção, se as doses de carregamento são administradas em uma frequência de, por exemplo, uma vez por mês (por exemplo, dois, três, quatro, ou mais doses de carregamento administradas uma vez por mês), em seguida as doses de manutenção podem ser administradas ao paciente uma vez a cada cinco semanas, uma vez a cada seis semanas, uma vez a cada sete semanas, uma vez a cada oito semanas, uma vez a cada dez semanas, uma vez a cada doze semanas, etc.).

#### Usos Diagnósticos dos Anticorpos

[00191] Os anticorpos anti-PD-1 da presente invenção podem ser usados para detectar e/ou medir PD-1 em uma amostra, por exemplo, para propósitos diagnósticos. Algumas modalidades contemplam o uso de um ou mais anticorpos da presente invenção em ensaios para detectar uma doença ou distúrbio tal como câncer, doença auto-imune ou infecção viral crônica. Ensaios diagnósticos exemplares para PD-1 podem compreender, por exemplo, contatar uma amostra, obtida a partir de um paciente, com um anticorpo anti-PD-1 da invenção, em que o anticorpo anti-PD-1 é rotulado com um rótulo detectável ou molécula repórter ou usado como um ligante de captura para seletivamente isolar PD-1 de amostras de paciente. Alternativamente, um anticorpo anti-PD-1 não rotulado pode ser usado em aplicações diagnósticas em combinação com um anticorpo secundário que é ele próprio detectavelmente rotulado. O rótulo detectável ou molécula repórter podem ser um radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , ou  $^{125}\text{I}$ ; uma porção fluorescente ou quimioluminescente tal como isotiocianato de fluoresceina, ou rodamina; ou uma enzima tal como fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, rábano picante peroxidase, ou luciferase. Ensaios exemplares específicos que podem ser usados para detectar ou medir PD-1 em uma amostra incluem ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), e separador celular ativado por

fluorescência (FACS).

[00192] Amostras que podem ser usadas em ensaios diagnósticos de PD-1 de acordo com a presente invenção incluem qualquer tecido ou amostra de fluido obtenível a partir de um paciente, que contém quantidades detectáveis de proteína de PD-1 ou fragmentos da mesma, sob condições normais ou patológicas. Geralmente, níveis de PD-1 em uma amostra particular obtida a partir de um paciente saudável (por exemplo, um paciente não afeito com câncer ou uma doença auto-imune) serão medidos para inicialmente estabelecer uma linha de base, ou padrão, nível de PD-1. Este nível de linha de base de PD-1 pode em seguida ser comparado contra os níveis de PD-1 medidos em amostras obtidas a partir de indivíduos suspeitos de ter uma condição relacionada a câncer, ou sintomas associados a tal condição.

[00193] Os anticorpos específicos para PD-1 podem não conter rótulos ou porções adicionais, ou eles podem conter um rótulo de terminal N ou terminal C ou porção. Em uma modalidade, o rótulo ou porção é biotina. Em um ensaio de ligação, o local de um rótulo (se qualquer) pode determinar a orientação do peptídeo relativo à superfície em que o peptídeo é ligado. Por exemplo, se uma superfície é revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina de terminal N será orientado tal que a porção de terminal C do peptídeo será distal à superfície.

[00194] Aspectos da invenção referem-se para uso dos anticorpos descritos como marcadores para prever prognóstico de câncer ou um distúrbio autoimune em pacientes. Anticorpos da presente invenção podem ser usados em ensaios diagnósticos para avaliar prognóstico de câncer em um paciente e prever sobrevida.

### EXEMPLOS

[00195] Os seguintes exemplos são mencionados para fornecer aqueles de experiência ordinária na técnica uma divulgação completa e

descrição de como fazer e usar os métodos e composições da invenção, e não são pretendidos limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. Esforços foram feitos para garantir precisão com respeito a números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.) porém alguns erros experimentais e divergências deveriam ser consideradas. A menos que de outra maneira indicado, partes são partes em peso, peso molecular é peso molecular médio, temperatura está em graus Celsius, temperatura ambiente é cerca de 25°C, e pressão é ou está próxima da atmosférica.

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Humanos para PD-1

[00196] Anticorpos humanos para PD-1 foram gerados usando um fragmento de PD-1 que varia de cerca de aminoácidos 25-170 de Acesso de GenBank NP\_005009.2 (SEQ ID NO: 327) com uma mudança de C93S. O imunógeno foi administrado diretamente, com um adjuvante para estimular a resposta imune, a um camundongo VELOCIMMUNE® compreendendo DNA codificando regiões variáveis de cadeia pesada de imunoglobulina humana e leve kappa humana. A resposta imune de anticorpo foi monitorada por um imunoensaio específico de PD-1. Quando uma resposta imune desejada foi obtida esplenócitos foram colhidos e fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar sua viabilidade e formar linhagens celulares de hibridoma. As linhagens celulares de hibridoma foram avaliadas e selecionadas para identificar linhagens celulares que produzem anticorpos específicos de PD-1s. Usando esta técnica, e o imunógeno descrito acima, vários anticorpos quiméricos anti-PD-1 (isto é, anticorpos que possuem domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongo) foram obtidos; anticorpos exemplares gerados desta maneira foram designados como H1M7789N, H1M7799N, H1M7800N, H2M7780N, H2M7788N, H2M7790N, H2M7791N, H2M7794N, H2M7795N, H2M7796N, e H2M7798N.

[00197] Anticorpos anti-PD-1 foram da mesma forma isolados diretamente a partir de células B antígeno-positivas sem fusão a células de mieloma, como descrito em US 2007/0280945A1, aqui especificamente incorporado por referência em sua totalidade. Usando este método, vários anticorpos anti-PD-1 completamente humanos (isto é, anticorpos que possuem domínios variáveis humanos e domínios constantes humanos) foram obtidos; anticorpos exemplares gerados desta maneira foram designados como segue: H4H9019P, H4xH9034P2, H4xH9035P2, H4xH9037P2, H4xH9045P2, H4xH9048P2, H4H9057P2, H4H9068P2, H4xH9119P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9135P2, H4xH9145P2, H4xH8992P, H4xH8999P, e H4xH9008P.

[00198] Propriedades biológicas dos anticorpos exemplares geradas de acordo com os métodos deste Exemplo são descritas em detalhes nos Exemplos mencionados abaixo.

Exemplo 2: Aminoácido de Região Variável de Cadeia Pesada e Leve e Sequências de Nucleotídeo

[00199] Tabela 1 apresenta os identificadores de sequência de aminoácido das regiões variáveis de cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-PD-1 selecionados da invenção. Os identificadores de sequência de ácido nucléico correspondentes são mencionados na Tabela 2.

**Tabela 1:** Identificadores de Sequência de Aminoácido

Designação de anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1M7789N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M7799N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M7800N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M7780N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M7788N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M7790N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M7791N	98	100	102	104	106	108	110	112

Designação de anticorpo	SEQ ID NOs:								
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	
H2M7794N	114	116	118	120	122	124	126	128	
H2M7795N	130	132	134	136	138	140	142	144	
H2M7796N	146	148	150	152	154	156	158	160	
H2M7798N	162	164	166	168	170	172	174	176	
H4H9019P	178	180	182	184	186	188	190	192	
H4xH9034P2	194	196	198	200	202	204	206	208	
H4xH9035P2	210	212	214	216	202	204	206	208	
H4xH9037P2	218	220	222	224	202	204	206	208	
H4xH9045P2	226	228	230	232	202	204	206	208	
H4xH9048P2	234	236	238	240	202	204	206	208	
H4H9057P2	242	244	246	248	202	204	206	208	
H4H9068P2	250	252	254	256	202	204	206	208	
H4xH9119P2	258	260	262	264	202	204	206	208	
H4xH9120P2	266	268	270	272	202	204	206	208	
H4xH9128P2	274	276	278	280	202	204	206	208	
H4xH9135P2	282	284	286	288	202	204	206	208	
H4xH9145P2	290	292	294	296	202	204	206	208	
H4xH8992P	298	300	302	304	186	188	190	192	
H4xH8999P	306	308	310	312	186	188	190	192	
H4xH9008P	314	316	318	320	186	188	190	192	

**Tabela 2:** Identificadores de Sequência Ácidos Nucléicos

Designação de anticorpo	SEQ ID NOs:								
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	
H1M7789N	1	3	5	7	9	11	13	15	
H1M7799N	17	19	21	23	25	27	29	31	
H1M7800N	33	35	37	39	41	43	45	47	
H2M7780N	49	51	53	55	57	59	61	63	
H2M7788N	65	67	69	71	73	75	77	79	
H2M7790N	81	83	85	87	89	91	93	95	
H2M7791N	97	99	101	103	105	107	109	111	
H2M7794N	113	115	117	119	121	123	125	127	
H2M7795N	129	131	133	135	137	139	141	143	
H2M7796N	145	147	149	151	153	155	157	159	

Designação de anticorpo	SEQ ID NOs:								
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	
H2M7798N	161	163	165	167	169	171	173	175	
H4H9019P	177	179	181	183	185	187	189	191	
H4xH9034P2	193	195	197	199	201	203	205	207	
H4xH9035P2	209	211	213	215	201	203	205	207	
H4xH9037P2	217	219	221	223	201	203	205	207	
H4xH9045P2	225	227	229	231	201	203	205	207	
H4xH9048P2	233	235	237	239	201	203	205	207	
H4H9057P2	241	243	245	247	201	203	205	207	
H4H9068P2	249	251	253	255	201	203	205	207	
H4xH9119P2	257	259	261	263	201	203	205	207	
H4xH9120P2	265	267	269	271	201	203	205	207	
H4xH9128P2	273	275	277	279	201	203	205	207	
H4xH9135P2	281	283	285	287	201	203	205	207	
H4xH9145P2	289	291	293	295	201	203	205	207	
H4xH8992P	297	299	301	303	185	187	189	191	
H4xH8999P	305	307	309	311	185	187	189	191	
H4xH9008P	313	315	317	319	185	187	189	191	

[00200] Anticorpos são tipicamente referidos aqui de acordo com a seguinte nomenclatura: compostos de Fc (por exemplo "H4xH," "H1M," "H2M," etc.), seguido por um identificador numérico (por exemplo "7789," "7799," etc., como mostrado na Tabela 1), seguido por um sufixo "P," "P2," "N," ou "B". Desse modo, de acordo com esta nomenclatura, um anticorpo pode ser referido aqui como, por exemplo, "H1H7789N," "H1M7799N," "H2M7780N," etc. O prefixo H4xH, H1M, H2M e H2aM nas designações de anticorpo usadas aqui indicam o isótipo de região de Fc particular do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo "H4xH" tem um IgG4 Fc humano com 2 ou mais mudanças de aminoácidos como descrito em US20100331527, um anticorpo "H1M" tem um Fc de IgG1 de camundongo, e um anticorpo "H2M" tem um Fc de IgG2 de camundongo (um ou isótipo b) (todas as regiões variáveis são completamente humanas como denotado pelo primeira designação de

anticorpo 'H'). Como será apreciado por uma pessoa de experiência ordinária na técnica, um anticorpo tendo um isótipo de Fc particular pode ser convertido a um anticorpo com um isótipo de Fc diferente (por exemplo, um anticorpo com um Fc de IgG1 de camundongo pode ser convertido a um anticorpo com um IgG4 humano, etc.), porém em todo caso, os domínios variáveis (incluindo CDRs) - que são indicados pelos identificadores numéricos mostrados na Tabela 1 - permanecerão os mesmos, e as propriedades de ligação a antígeno são esperadas ser idênticas ou substancialmente similares independentemente da natureza do domínio de Fc.

[00201] Em certas modalidades, anticorpos selecionados com um Fc de IgG1 de camundongo foram convertidos a anticorpos com Fc de IgG4 humano. Em uma modalidade, o domínio de Fc de IgG4 compreende uma mutação de serina para prolina na região de articulação (S108P) para promover estabilização de dímero. Tabela 3 apresenta os identificadores de sequência de aminoácido de sequências de cadeia pesada e cadeia leve de anticorpos anti-PD-1 selecionados com Fc de IgG4 humano.

**Tabela 3**

		SEQ ID NOs:	
Designação de anticorpo	Cadeia pesada	Cadeia clara	
H4H7798N	330	331	
H4H7795N2	332	333	
H4H9008P	334	335	
H4H9048P2	336	337	

[00202] Cada sequência de cadeia pesada na Tabela 3 compreendeu uma região variável ( $V_H$  ou HCVR; compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e uma região constante (compreendendo domínios de  $C_H1$ ,  $C_H2$  e  $C_H3$ ). Cada sequência de cadeia leve na Tabela 3 compreendeu uma região variável ( $VL$  ou LCVR; compreendendo LCDR1, LCDR2 e LCDR3) e uma região constante (CL). SEQ ID NO:

330 compreende uma HCVR compreendendo 1-117 aminoácidos e uma região constante compreendendo 118-444 aminoácidos. SEQ ID NO: 331 compreendeu uma LCVR compreendendo 1-107 aminoácidos e uma região constante compreendendo 108-214 aminoácidos. SEQ ID NO: 332 compreendeu uma HCVR compreendendo 1-122 aminoácidos e uma região constante compreendendo 123-449 aminoácidos. SEQ ID NO: 333 compreendeu uma LCVR compreendendo 1-107 aminoácidos e uma região constante compreendendo 108-214 aminoácidos. SEQ ID NO: 334 compreendeu uma HCVR compreendendo 1-119 aminoácidos e uma região constante compreendendo 120-446 aminoácidos. SEQ ID NO: 335 compreendeu uma LCVR compreendendo 1-108 aminoácidos e uma região constante compreendendo 109-215 aminoácidos. SEQ ID NO: 336 compreendeu uma HCVR compreendendo 1-121 aminoácidos e uma região constante compreendendo 122-448 aminoácidos. SEQ ID NO: 337 compreendeu uma LCVR compreendendo 1-108 aminoácidos e uma região constante compreendendo 109-215 aminoácidos.

Exemplo 3: Ligação de anticorpo a PD-1 como determinado por Ressonância de Plásmon Superficial

[00203] Associação de ligação e constantes de taxa de dissociação ( $k_a$  e  $k_d$ , respectivamente), constantes de dissociação de equilíbrio e meia-vida de dissociação ( $K_D$  e  $t_{1/2}$ , respectivamente) para ligação de antígeno a anticorpos anti-PD1 purificados foram determinados usando um tempo ensaio de biossensor de ressonância de plásmon superficial em um Biacore 4000 ou Biacore T200 instrument. A superfície de sensor Biacore foi derivaizada com um anticorpo anti-camundongo de coelho policlonal (GE, #BR-1008-38) ou com um anticorpo de Fc anti-humano de camundongo de monoclonal (GE, #BR-1008-39) para capturar aproximadamente 100-900 RUs de anticorpos monoclonais anti-PD-1, expressos com um Fc de camundongo ou um Fc humano, respectivamente. Os reagentes de PD-1 testados para ligação aos

anticorpos anti-PD-1 incluíram PD-1 humano recombinante expresso com uma etiqueta de myc-myc-hexahistidina de terminal C (hPD-1-MMH; SEQ ID NO: 321), PD-1 de macaco cinomolgo recombinante expresso com uma etiqueta de myc-myc-hexahistidina de terminal C (MfPD-1-MMH; SEQ ID NO: 322), dímero de PD-1 humano recombinante expresso com ou uma etiqueta de Fc de IgG2a de camundongo de terminal C (hPD-1-mFc; SEQ ID NO: 323) ou com um Fc de IgG1 humano de terminal C (hPD1-hFc; SEQ ID NO: 324), e PD-1 de macaco com mFc (SEQ ID NO: 329). Concentrações diferentes de reagentes de PD-1 variando de 200nM a 3.7nM foram injetadas sobre a superfície capturada de anticorpo monoclonal anti-PD-1 em uma taxa de fluxo de 30µL/min em Biacore 4000 ou a 50µL/min em Biacore T200. A ligação dos reagentes de PD-1 para anticorpos monoclonais capturados foi monitorada durante 3 a 5 minutos enquanto sua dissociação dos anticorpos foi monitorada durante 7 a 10 minutos em tampão fluente de HBST (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,05% v/v Tensoativo P20). Experiências foram realizadas a 25°C e 37°C. Associação cinética ( $k_a$ ) e dissociação ( $k_d$ ) constantes de taxa foram determinadas processando-se e ajustando-se os dados em um modelo de ligação de 1:1 usando software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Constantes de equilíbrio de dissociação de ligação ( $K_D$ ) e meia-vida dissociativa ( $t_{1/2}$ ) foram em seguida calculados a partir das constantes de taxa cinéticas como:  $K_D$  (M) =  $k_d / k_a$  e  $t_{1/2}$  (min) =  $[\ln 2 / (60 * k_d)]$ . Parâmetros de cinéticas de ligação para anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes ligando-se a reagentes de PD-1 diferentes a 25°C e 37°C são tabulados nas Tabelas 4-11.

**Tabela 4:** Parâmetros de ligação cinética de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a PD-1-MMH humano a 25°C.

Anticorpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t^{1/2}$ (min)
H2aM7780N	9,32E+03	3,59E-04	3,85E-08	32
H2aM7788N	1,97E+04	3,88E-04	1,96E-08	30
H1M7789N	2,53E+04	5,31E-05	2,10E-09	218
H2aM7790N	4,63E+04	8,23E-04	1,78E-08	14
H2aM7791N	3,01E+04	7,06E-04	2,34E-08	16
H2aM7794N	5,50E+04	2,12E-03	3,80E-08	5,4
H2aM7795N	4,91E+04	1,15E-03	2,35E-08	10
H2aM7796N	6,73E+03	1,93E-03	2,86E-07	6,0
H2aM7798N	1,32E+05	3,06E-04	2,31E-09	38
H1M7799N	5,04E+04	1,23E-02	2,44E-07	0,9
H1M7800N	5,88E+04	9,47E-03	1,61E-07	1,2
H4H9019P	2,05E+04	8,08E-04	3,94E-08	14
H4xH9034P	1,02E+05	1,49E-03	1,45E-08	7,8
H4xH9035P	1,03E+05	4,75E-04	4,62E-09	24
H4xH9037P	7,32E+04	7,95E-04	1,09E-08	15
H4xH9045P	5,40E+04	4,03E-03	7,46E-08	2,9
H4xH9048P2	1,37E+05	1,23E-03	8,95E-09	9,4
H4H9057P2	4,60E+04	1,34E-02	2,91E-07	0,9
H4H9068P2	NB *	NB *	NB *	NB *
H4xH9119P2	7,84E+04	1,22E-03	1,56E-08	9,5
H4xH9120P2	3,32E+04	9,98E-04	3,01E-08	12
H4xH9128P2	4,95E+04	7,19E-04	1,45E-08	16
H4xH9135P2	1,17E+05	1,20E-03	1,02E-08	10
H4xH9145P2	3,47E+04	1,34E-03	3,85E-08	8,6
H4xH8992P	1,50E+05	2,13E-02	1,41E-07	0,5
H4xH8999P	2,83E+05	1,23E-03	4,33E-09	9,4
H4xH9008P	4,29E+04	1,33E-03	3,10E-08	8,7
H4H7795N2	6,35E+04	1,48E-03	2,33E-08	8
H4H7798N	1,47E+05	4,43E-04	3,01E-09	26

\*NB indica que sob as condições experimentais, reagente de PD-1 não ligou-se ao anticorpo monoclonal anti-PD-1 capturado

**Tabela 5:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a PD-1-MMH humano a 37°C.

Anticorpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sup>1/2</sup> (min)
H2aM7780N	2,72E+04	1,52E-03	5,58E-08	7,6
H2aM7788N	2,88E+04	1,49E-03	5,19E-08	7,7
H1M7789N	4,53E+04	2,95E-04	6,52E-09	39
H2aM7790N	6,13E+04	5,20E-03	8,49E-08	2,2
H2aM7791N	4,18E+04	2,24E-03	5,35E-08	5,2
H2aM7794N	1,20E+05	7,92E-03	6,61E-08	1,5
H2aM7795N	6,75E+04	4,58E-03	6,78E-08	2,5
H2aM7796N	1,09E+04	1,65E-02	1,51E-06	0,7
H2aM7798N	1,73E+05	6,56E-04	3,79E-09	18
H1M7799N	7,94E+04	4,25E-02	5,36E-07	0,3
H1M7800N	7,83E+04	3,99E-02	5,10E-07	0,3
H4H9019P	1,20E+04	5,44E-03	4,53E-07	2,1
H4xH9034P	2,79E+05	1,12E-02	4,02E-08	1,0
H4xH9035P	2,98E+05	4,26E-03	1,43E-08	2,7
H4xH9037P	2,26E+05	6,68E-03	2,95E-08	1,7
H4xH9045P	8,04E+04	5,32E-02	6,62E-07	0,2
H4xH9048P2	3,70E+05	8,60E-03	2,32E-08	1,3
H4H9057P2	NB *	NB *	NB *	NB *
H4H9068P2	NB *	NB *	NB *	NB *
H4xH9119P2	2,40E+05	1,04E-02	4,35E-08	1,1
H4xH9120P2	6,88E+04	7,01E-03	1,02E-07	1,6
H4xH9128P2	1,04E+05	4,36E-03	4,20E-08	2,6
H4xH9135P2	4,18E+05	1,11E-02	2,66E-08	1,0
H4xH9145P2	1,31E+05	1,23E-02	9,40E-08	0,9
H4xH8992P	IC *	IC *	IC *	IC *
H4xH8999P	5,99E+05	9,42E-03	1,57E-08	1,2
H4xH9008P	1,29E+05	8,09E-03	6,26E-08	1,4
H4H7795N2	6,41E+04	6,64E-03	1,04E-07	1,7
H4H7798N	2,27E+05	1,70E-03	7,48E-09	7

\*NB indica que sob as condições experimentais, reagente de PD-1 não ligou-se ao anticorpo monoclonal anti-PD-1 capturado. IC indica que sob as condições

experimentais, ligação de PD-1 é inconclusiva.

**Tabela 6:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a dímero de PD-1 humano (PD-1-mFc humano ou humano PD-1-hFc) a 25°C.

Anticorpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub> (min)
H2aM7780N	4,21E+04	9,94E-06	2,36E-10	1162
H2aM7788N	8,94E+04	2,82E-05	3,15E-10	410
H1M7789N	3,91E+04	4,31E-05	1,10E-09	268
H2aM7790N	1,86E+05	3,02E-05	1,62E-10	383
H2aM7791N	4,05E+04	1,01E-04	2,49E-09	114
H2aM7794N	1,79E+05	1,06E-04	5,93E-10	109
H2aM7795N	1,38E+05	3,14E-05	2,27E-10	368
H2aM7796N	2,61E+04	8,67E-05	3,32E-09	133
H2aM7798N	3,50E+05	2,29E-05	6,55E-11	505
H1M7799N	2,38E+05	8,55E-05	3,60E-10	135
H1M7800N	1,52E+05	7,72E-05	5,09E-10	150
H4H9019P	4,38E+04	8,61E-05	1,97E-09	134
H4xH9034P	2,15E+05	1,51E-04	7,01E-10	77
H4xH9035P	2,01E+05	1,03E-04	5,13E-10	112
H4xH9037P	1,50E+05	1,29E-04	8,62E-10	89
H4xH9045P	9,13E+04	1,60E-04	1,75E-09	72
H4xH9048P2	2,36E+05	1,88E-04	7,98E-10	61
H4H9057P2	1,01E+05	1,77E-04	1,75E-09	65
H4H9068P2	4,72E+04	2,80E-03	5,94E-08	4
H4xH9119P2	1,63E+05	1,62E-04	9,92E-10	71
H4xH9120P2	6,52E+04	1,19E-04	1,82E-09	97
H4xH9128P2	8,37E+04	1,33E-04	1,59E-09	87
H4xH9135P2	2,12E+05	1,38E-04	6,51E-10	84
H4xH9145P2	6,58E+04	1,58E-04	2,40E-09	73
H4xH8992P	2,35E+05	1,60E-04	6,80E-10	72
H4xH8999P	5,55E+05	1,20E-04	2,17E-10	96
H4xH9008P	3,52E+04	2,80E-05	7,96E-10	412
H4H7795N2	1,50E+05	9,25E-05	6,15E-10	125
H4H7798N	4,41E+05	5,40E-05	1,22E-10	214

**Tabela 7:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a dímero de PD-1 humano (PD-1-mFc humano

ou PD-1-hFc humano) a 37°C.

Anticorpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$t^{1/2}$ (min)
H2aM7780N	9,94E+04	2,29E-05	2,30E-10	505
H2aM7788N	1,31E+05	2,13E-05	1,63E-10	542
H1M7789N	1,09E+05	= 1,0E-05	= 9,17E-11	≥ 1155
H2aM7790N	2,01E+05	8,49E-05	4,22E-10	136
H2aM7791N	4,98E+04	1,79E-04	3,59E-09	65
H2aM7794N	4,68E+05	2,11E-04	4,52E-10	55
H2aM7795N	1,65E+05	6,13E-05	3,71E-10	188
H2aM7796N	2,21E+04	4,34E-04	1,96E-08	27
H2aM7798N	4,90E+05	1,40E-05	2,80E-11	825
H1M7799N	4,41E+05	1,81E-04	4,11E-10	64
H1M7800N	4,00E+05	1,81E-04	4,50E-10	64
H4H9019P	7,17E+04	1,95E-04	2,71E-09	59
H4xH9034P	3,02E+05	6,30E-04	2,09E-09	18
H4xH9035P	3,16E+05	5,54E-04	1,75E-09	21
H4xH9037P	2,63E+05	9,21E-04	3,50E-09	13
H4xH9045P	2,14E+05	1,10E-03	5,13E-09	11
H4xH9048P2	3,61E+05	1,10E-03	3,05E-09	10
H4H9057P2	2,33E+05	2,11E-03	9,07E-09	5
H4H9068P2	9,69E+04	1,20E-02	1,24E-07	1
H4xH9119P2	2,40E+05	9,09E-04	3,80E-09	13
H4xH9120P2	8,08E+04	4,82E-04	5,96E-09	24
H4xH9128P2	1,86E+05	6,86E-04	3,68E-09	17
H4xH9135P2	3,10E+05	7,02E-04	2,27E-09	16
H4xH9145P2	1,60E+05	5,71E-04	3,58E-09	20
H4xH8992P	3,49E+05	1,02E-03	2,91E-09	11
H4xH8999P	7,57E+05	4,51E-04	5,96E-10	26
H4xH9008P	5,52E+04	= 1,0E-05	= 1,81E-10	≥ 1155
H4H7795N2	1,60E+05	2,64E-04	1,65E-09	44
H4H7798N	6,60E+05	1,15E-04	1,75E-10	100

**Tabela 8:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a MfPD-1-MMH a 25°C.

Anticorpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sub>1/2</sub> (min)
H2aM7780N	1,00E+04	3,15E-04	3,15E-08	37
H2aM7788N	8,63E+03	6,62E-04	7,66E-08	17
H1M7789N	1,55E+04	1,23E-04	7,89E-09	94
H2aM7790N	3,11E+04	9,37E-04	3,01E-08	12
H2aM7791N	1,61E+04	5,53E-04	3,44E-08	21
H2aM7794N	3,60E+04	5,99E-03	1,66E-07	1,9
H2aM7795N	4,44E+04	8,89E-04	2,01E-08	13
H2aM7796N	NB *	NB *	NB *	NB *
H2aM7798N	8,72E+04	3,93E-04	4,50E-09	29
H1M7799N	5,78E+04	1,30E-02	2,24E-07	0,9
H1M7800N	5,89E+04	1,04E-02	1,76E-07	1,1
H4H9019P	1,94E+04	8,33E-04	4,29E-08	14
H4xH9034P	9,61E+04	2,69E-03	2,80E-08	4,3
H4xH9035P	9,36E+04	4,34E-04	4,64E-09	27
H4xH9037P	6,99E+04	9,15E-04	1,31E-08	13
H4xH9045P	6,25E+04	7,05E-03	1,13E-07	1,6
H4xH9048P2	1,28E+05	8,97E-04	7,00E-09	13
H4H9057P2	3,46E+04	1,91E-02	5,51E-07	0,6
H4H9068P2	NB *	NB *	NB *	NB *
H4xH9119P2	7,50E+04	1,66E-03	2,22E-08	6,9
H4xH9120P2	3,17E+04	1,08E-03	3,41E-08	11
H4xH9128P2	3,68E+04	6,49E-04	1,77E-08	18
H4xH9135P2	1,24E+05	1,31E-03	1,06E-08	8,8
H4xH9145P2	2,86E+04	1,24E-03	4,31E-08	9,3
H4xH8992P	1,88E+05	3,76E-02	2,00E-07	0,3
H4xH8999P	4,29E+05	1,33E-03	3,09E-09	8,7
H4xH9008P	1,05E+05	2,49E-03	2,38E-08	4,6
H4H7795N2	6,59E+04	1,48E-03	2,24E-08	8
H4H7798N	1,43E+05	5,51E-04	3,86E-09	21

\*NB indica que sob as condições experimentais, reagente de PD-1 não ligou-se ao

anticorpo monoclonal anti-PD-1 capturado

**Tabela 9:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a MfPD-1-MMH a 37°C.

Anticorpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sup>1/2</sup> (min)
H2aM7780N	2,29E+04	1,38E-03	6,05E-08	8,3
H2aM7788N	1,88E+04	3,28E-03	1,74E-07	3,5
H1M7789N	4,79E+04	4,08E-04	8,50E-09	28
H2aM7790N	2,55E+04	6,93E-03	2,71E-07	1,7
H2aM7791N	3,79E+04	1,91E-03	5,05E-08	6,0
H2aM7794N	6,66E+04	2,01E-02	3,02E-07	0,6
H2aM7795N	6,47E+04	3,89E-03	6,02E-08	3,0
H2aM7796N	NB *	NB *	NB *	NB *
H2aM7798N	1,42E+05	9,93E-04	7,00E-09	12
H1M7799N	8,80E+04	4,67E-02	5,30E-07	0,2
H1M7800N	8,40E+04	4,43E-02	5,27E-07	0,3
H4H9019P	2,14E+04	7,63E-03	3,56E-07	1,5
H4xH9034P	2,83E+05	2,47E-02	8,73E-08	0,5
H4xH9035P	3,06E+05	4,29E-03	1,40E-08	2,7
H4xH9037P	2,22E+05	8,80E-03	3,97E-08	1,3
H4xH9045P	1,40E+04	1,05E-01	7,54E-06	0,1
H4xH9048P2	4,15E+05	6,97E-03	1,68E-08	1,7
H4H9057P2	NB *	NB *	NB *	NB *
H4H9068P2	NB *	NB *	NB *	NB *
H4xH9119P2	2,40E+05	1,23E-02	5,14E-08	0,9
H4xH9120P2	6,98E+04	7,48E-03	1,07E-07	1,5
H4xH9128P2	9,06E+04	4,18E-03	4,61E-08	2,8
H4xH9135P2	4,62E+05	1,34E-02	2,89E-08	0,9
H4xH9145P2	1,71E+05	1,43E-02	8,37E-08	0,8
H4xH8992P	IC *	IC *	IC *	IC *
H4xH8999P	9,83E+05	9,26E-03	9,41E-09	1,2
H4xH9008P	5,86E+05	1,38E-02	2,35E-08	0,8
H4H7795N2	7,80E+04	6,89E-03	8,83E-08	1,7
H4H7798N	2,13E+05	2,23E-3	1,05E-08	5

\*NB indica que sob as condições experimentais, reagente de PD-1 não

ligou-se ao anticorpo monoclonal anti-PD-1 capturado. IC indica que sob as condições experimentais, ligação de PD-1 é inclusiva.

**Tabela 10:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a dímero de PD-1 de macaco (PD-1-mFc de macaco) a 25°C

Anticorpo	Quantidade de mAb Capturado (RU)	100nM Ligação de PD-1-mFc de Macaco (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sup>1/2</sup> (min)
H4H9019P	116	31	4,55E+04	8,96E-05	1,97E-09	129
H4xH9034P	215	95	2,03E+05	1,66E-04	8,18E-10	70
H4xH9035P	153	78	2,16E+05	9,96E-05	4,60E-10	116
H4xH9037P	137	58	1,50E+05	1,37E-04	9,12E-10	84
H4xH9045P	202	78	9,78E+04	1,68E-04	1,72E-09	69
H4xH9048P2	227	115	2,43E+05	1,84E-04	7,54E-10	63
H4H9057P2	196	75	1,02E+05	3,03E-04	2,98E-09	38
H4H9068P2	178	17	5,70E+04	3,09E-03	5,42E-08	4
H4xH9119P2	209	83	1,63E+05	1,72E-04	1,05E-09	67
H4xH9120P2	195	52	5,84E+04	1,12E-04	1,91E-09	104
H4xH9128P2	175	64	7,87E+04	1,24E-04	1,57E-09	94
H4xH9135P2	150	74	2,38E+05	1,43E-04	6,02E-10	81
H4xH9145P2	304	84	7,24E+04	1,50E-04	2,08E-09	77
H4xH8992P	260	122	2,03E+05	2,51E-04	1,24E-09	46
H4xH8999P	217	126	5,50E+05	1,15E-04	2,10E-10	100
H4xH9008P	248	93	1,20E+05	5,77E-05	4,80E-10	200
H4H7795N2	204	60	1,60E+05	9,92E-05	6,21E-10	116
H4H7798N	223	93	4,49E+05	6,14E-05	1,37E-10	188

**Tabela 11:** Parâmetros de ligação cinética de ligação de anticorpos monoclonais anti-PD-1 a dímero de PD-1 de macaco (PD-1-mFc de macaco) a 37°C

Anticorpo	Quantidade de mAb Capturado (RU)	100nM Ligação de PD-1-mFc de Macaco (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (M)	t <sup>1/2</sup> (min)
H4H9019P	89	36	8,16E+04	2,59E-04	3,17E-09	45
H4xH9034P	184	81	3,07E+05	7,49E-04	2,44E-09	15
H4xH9035P	88	40	3,67E+05	6,23E-04	1,70E-09	19
H4xH9037P	55	24	2,80E+05	8,97E-04	3,21E-09	13
H4xH9045P	161	65	2,41E+05	1,36E-03	5,66E-09	8
H4xH9048P2	184	84	4,94E+05	1,13E-03	2,29E-09	10
H4H9057P2	105	28	1,61E+05	4,77E-03	2,96E-08	2,4
H4H9068P2	90	6	1,21E+05	1,05E-02	8,63E-08	1,1
H4xH9119P2	98	40	2,79E+05	8,85E-04	3,17E-09	13
H4xH9120P2	141	46	8,29E+04	5,02E-04	6,06E-09	23
H4xH9128P2	148	60	1,87E+05	8,16E-04	4,36E-09	14
H4xH9135P2	106	52	3,42E+05	7,94E-04	2,32E-09	15
H4xH9145P2	284	94	1,51E+05	6,09E-04	4,04E-09	19
H4xH8992P	206	86	3,50E+05	1,53E-03	4,38E-09	8
H4xH8999P	160	83	7,30E+05	5,10E-04	7,00E-10	23
H4xH9008P	216	98	2,04E+05	1,00E-05 *	4,90E-11 *	1155*
H4H7795N2	164	47	1,70E+05	2,90E-04	1,71E-09	40
H4H7798N	203	88	6,30E+05	1,27E-04	2,02E-10	91

\*indica que, sob as condições experimentais atuais, nenhuma dissociação de reagente de PD-1 foi observada e o valor de kd foi manualmente fixo a 1.00E-05

[00204] Como mostrado na Tabela 4, a 25°C, 28 dos 29 anticorpos anti-PD-1 da invenção ligados a hPD-1-MMH com valores de K<sub>D</sub> variando de 2,1nM a 291nM. Um anticorpo, H4H9068P2, não demonstrou qualquer ligação mensurável a hPD-1-MMH a 25°C. Como mostrado na Tabela 5, a 37°C, 26 dos 29 anticorpos anti-PD-1 da invenção ligados a hPD-1-MMH com valores de K<sub>D</sub> variando de 3,79nM a 1,51μM. Três anticorpos da invenção não demonstraram qualquer ligação conclusivo a hPD-1-MMH a 37°C. Como mostrado na Tabela 6, a 25°C, todos os 29 anticorpos anti-PD-1 da invenção ligados a proteínas de dímero de hPD-1 com valores de K<sub>D</sub> variando de 65,5pM a 59,4nM. Como mostrado na Tabela 7, a 37°C, todos os 27 anticorpos anti-PD-1 da invenção ligados a proteínas de dímero de hPD-1 com

valores de  $K_D$  variando de 3,09pM a 551nM. Como mostrado na Tabela 8, a 25°C, 27 dos 29 anticorpos anti-PD-1 da invenção ligados a MfPD-1-MMH com valores de  $K_D$  variando de 3,09nM a 551nM. Dois anticorpos da invenção não demonstraram qualquer ligação conclusiva a MfPD-1-MMH a 25°C. Como mostrado na Tabela 9, a 37°C, 25 dos 29 anticorpos anti-PD-1 da invenção ligados a MfPD-1-MMH com valores de  $K_D$  variando de 7,00nM a 7,54μM. Quatro anticorpos da invenção não demonstraram qualquer ligação conclusiva a MfPD-1-MMH a 37°C. Como mostrado na Tabela 10, a 25°C, todos os 18 dos anticorpos anti-PD-1 testados da invenção ligados a dímero de MfPD-1 com valores de  $K_D$  variando de 137pM a 54,2nM. Como mostrado na Tabela 11, a 37°C, todos os 18 dos anticorpos anti-PD-1 testados da invenção ligados a dímero de MfPD-1 com valores de  $K_D$  variando de menos do que 49pM a 86,3nM.

Exemplo 4: Bloqueio de ligação de PD-1 a PD-L1 como determinado por ELISA

[00205] A capacidade de anticorpos anti-PD-1 bloquear ligação de PD-1 humano a seu ligante, o receptor de PD-L1, era medido usando três formatos de ELISA de sanduíche de competição. Proteínas de PD-L1 humanas diméricas, compreenderam uma porção do domínio extracelular de PD-L1 humano expresso com uma etiqueta de Fc humano de terminal C (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 325) ou uma etiqueta de Fc de camundongo de terminal C (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 326), ou PD-L2 humano dimérico, compreendido da região extracelular de PD-L2 humano produzida com um etiqueta de Fc humano de terminal C (hPD-L2-hFc; R&D Systems, #1224-PL) foram separadamente revestidos em uma concentração de 2 μg/mL em PBS em um uma placa de microtípulo de 96 cavidades durante a noite a 4°C. Sítios de ligação não específicos foram subsequentemente bloqueados usando uma solução a 0,5% (p/v) de BSA em PBS. Em um primeiro formato de competição, uma

concentração constante de 1,5nM de um proteína de PD-1 humano dimérica, compreendida do domínio extracelular de PD-1 humano expresso com uma etiqueta de Fc de camundongo de terminal C (hPD-1-mFc; SEQ ID: 323) foi adicionada a diluições seriais de anticorpos anti-PD-1 ou anticorpos de controle de isótipo de forma que as concentrações finais de anticorpos variaram de 0 a 200nM. Em um segundo formato de competição, uma concentração constante de 200 pM de proteína de PD-1 humana biotinilada dimérica, compreendida do domínio extracelular de PD-1 humano que foi expresso com um etiqueta de Fc humano de terminal C (biot-hPD-1-hFc; SEQ ID: 323), foi adicionada similarmente a diluições seriais de anticorpos anti-PD-1 ou um isótipo controle em concentrações de anticorpo finais variando de 0 a 50nM. Em um terceiro formato de competição, uma concentração constante de 100 pM de proteína de hPD-1-mFc dimérica foi similarmente adicionada a diluições seriais de anticorpos anti-PD-1 ou um controle de isótipo em concentrações de anticorpo finais variando de 0 a 100nM. Estes complexos de anticorpo-proteína foram em seguida incubados durante 1 hora em temperatura ambiente (RT). Complexos de anticorpo-proteína com 1,5 nM de hPD-1-mFc constante foram transferidos em placas de microtípulo revestidas com hPD-L1-hFc, complexos de anticorpo-proteína com 200 pM de biot-hPD-1-hFc constante foram transferidos a placas revestidas de hPD-L1-mFc, e complexos de anticorpo-proteína com 100 pM de hPD-1-mFc constante foram transferidos em placas de microtípulo revestidas com hPD-L2-hFc. Depois de incubar durante 1 hora em RT, as cavidades foram lavadas, e hPD-1-mFc ligado a placa foi detectado com um anticorpo policlonal anti-mFc conjugado com rábano picante peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc., #115-035-164), e biot-hPD-1-hFc ligado a placa foi detectado com estreptavidina conjugada com HRP (Thermo Scientific, #N200). Amostras foram desenvolvidas com uma solução de

TMB (BD Biosciences, #51-2606KC e #51-2607KC) para produzir uma reação colorimétrica e em seguida desenvolvimento de cor foi estabilizado por adição de 1M de ácido sulfúrico antes de medir absorvência a 450nm em uma leitora de placa Victor X5. Análise de dados foi realizada usando um modelo de resposta de dose sigmoidal dentro de software Prisma™ (GraphPad). O valor de IC<sub>50</sub> calculado, definido como a concentração de anticorpo requerida para reduzir 50% de ligação de PD-1 humano a PD-L1 ou PD-L2 humano, era usado como um indicador de bloqueio de potência. Bloqueio máximo percentual foi calculado como uma medida da capacidade dos anticorpos para completamente bloquear ligação de PD-1 humano a PD-L1 ou PD-L2 humano na placa como determinado a partir da curva de dose. Este bloqueio máximo percentual foi calculado subtraindo-se de 100% a relação da redução em sinal observada na presença da concentração testada mais alta para cada anticorpo relativo à diferença entre o sinal observado para uma amostra de PD-1 humano não contendo anticorpo anti-PD-1 (0% de bloqueio) e o sinal antecedente de anticorpo secundário conjugado por HRP apenas (100% de bloqueio).

[00206] Bloqueio máximo percentual e os valores de IC<sub>50</sub> calculados para anticorpos bloqueando mais do que 35% do sinal de ligação de hPD-1 são mostrados nas Tabelas 12-14. Anticorpos que mostraram uma diminuição no sinal de ligação de hPD-1 de 35% ou menos foram definidos como não bloqueadores. Anticorpos que mostraram um aumento de 35% ou mais no sinal de ligação de PD-1 humano como não bloqueadores/realçadores. A base de ensaio teórico, definido como a concentração de anticorpo mínima teoricamente necessária para ocupar 50% de sítios de ligação de PD-1 humano no ensaio, é 0,75nM para o formato usando 1,5nM de hPD-1-mFc constante, 100pM para o formato usando 200pM de biot-hPD-1-hFc constante, e 50pM para o formato usando 100pM de hPD-1-mFc constante, indicando que valores

de  $IC_{50}$  calculados mais baixos podem não representar ligação de sítio de proteína-anticorpo quantitativa. Por esta razão, anticorpos com valores de  $IC_{50}$  calculados menos do que 0,75nM no ensaio com hPD-1-mFc constante e revestimento de hPD-L1, menos do que 100pM no ensaio com biot-hPD-1-hFc constante e revestimento de hPD-L1, e menos do que 50pM no ensaio com hPD-1-mFc constante e revestimento de hPD-L2 é informado nas Tabelas 12-14 como < 7,5E-10M, < 1,0E-10M e < 5,0E-11M, respectivamente.

**Tabela 12:** Bloqueio de ELISA de ligação de PD-1 humano a PD-L1 humano por anticorpos anti-PD-1

Anticorpo	Bloqueio 1,5nM de ligação de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc, $IC_{50}$ (M)	200nM de bloqueio de anticorpo 1,5nM ligação de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc, % de bloqueio
H4H9019P	1,3E-09	98
H4xH9034P	5,1E-10 *	98
H4xH9045P	2,8E-10 *	98
H4xH9048P2	3,3E-09	67
H4xH9120P2	1,0E-09	98
H4xH9128P2	6,4E-10 *	98
H4xH9035P	6,2E-10 *	99
H4xH9135P2	1,1E-09	97
H4xH9145P2	9,3E-10	90
H4xH9119P2	2,0E-10 *	78
H4H9057P2	1,9E-10 *	98
H4H9068P2	NBI / Realçador	-142
H4xH9037P	8,9E-10	100
H2aM7780N	6,9E-10 *	94
H2aM7788N	2,2E-10 *	74
H1M7789N	NBI / Realçador	-170
H2aM7790N	1,5E-09	74

Anticorpo	Bloqueio 1,5nM de ligação de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc, IC <sub>50</sub> (M)	200nM de bloqueio de anticorpo 1,5nM ligação de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc, % de bloqueio
H2aM7791N	NBI / Realçador	-154
H2aM7794N	1,1E-09	95
H2aM7795N2	8,6E-10	93
H2aM7796N	NBI	-20
H2aM7798N	6,8E-10 *	93
H1M7799N	2,2E-10 *	82
H1M7800N	6,0E-10 *	83
H4xH8992P	1,3E-09	93
H4xH8999P	1,3E-09	88
H4xH9008P	2,4E-09	88
Controle de isótipo 1	NBI	-3
Controle de isótipo 2	NBI	-34
Controle de isótipo 2	NBI	-7
Controle de isótipo 2	NBI	-16

Base de ensaio teórico: para bloquear ELISA com hPD-1-mFc constante e revestimento de hPD-L1 é 7,5E-10 M

(\*) - Base teórica baixa do ensaio;

NT - não testado; NBI - sem bloqueadores;

NBI/Realçador-sem bloqueadores/realçador; IC-inconclusivo

**Tabela 13:** Bloqueio de ELISA de ligação de PD-1 humano biotinilada a PD-L1 humano por anticorpos anti-PD-1

Anticorpo	Bloqueio 200pM de ligação de biot-hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc, IC <sub>50</sub> (M)	50nM de bloqueio de anticorpo 200pM ligação de biot-hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc, % de bloqueio
H4H9019P	6,4E-10	97
H4xH9034P	6,6E-11 *	96
H4xH9045P	1,3E-10	95
H4xH9048P2	IC	76
H4xH9120P2	3,9E-10	96
H4xH9128P2	1,9E-10	97

Anticorpo	Bloqueio 200pM de ligação de biot-hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc, IC <sub>50</sub> (M)	50nM de bloqueio de anticorpo 200pM ligação de biot-hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc,% de bloqueio
H4xH9035P	8,0E-11 *	95
H4xH9135P2	1,5E-10	96
H4xH9145P2	3,5E-10	97
H4xH9119P2	8,2E-11 *	96
H4H9057P2	NBI / Realçador	-57
H4H9068P2	NBI / Realçador	-43
H4xH9037P	7,8E-11 *	95
H2aM7780N	9,1E-11 *	100
H2aM7788N	6,5E-11 *	100
H1M7789N	NBI	9
H2aM7790N	1,9E-10	99
H2aM7791N	NBI / Realçador	-45
H2aM7794N	2,3E-10	99
H2aM7795N2	6,9E-11 *	99
H2aM7796N	1,3E-09	60
H2aM7798N	7,3E-11 *	100
H1M7799N	5,9E-11 *	100
H1M7800N	6,5E-11 *	99
H4xH8992P	1,6E-10	97
H4xH8999P	1,8E-10	92
H4xH9008P	1,3E-09	93
Controle de isótipo 1	NBI	19
Controle de isótipo 2	NBI	35
Controle de isótipo 2	NBI	-18
Controle de isótipo 2	NBI	-11

Base teórica do ensaio: para bloquear ELISA com biot-hPD-1-mFc constante e revestimento de hPD-L1 é 1,0E-10 M

(\*) - Base teórico baixa do ensaio;

NT - não testado; NBI - sem bloqueadores;

NBI/Realçador-sem bloqueadores/realçador; IC-inconclusivo

**Tabela 14:** Bloqueio de ELISA de ligação de PD-1 humano a PD-L2 humano por anticorpos anti-PD-1

Anticorpo	Bloqueio 100pM de ligação de hPD-1-mFc a hPD-L2-hFc, IC <sub>50</sub> (M)	100nM de bloqueio de anticorpo 100pM ligação de hPD-1-mFc a hPD-L2-hFc, % de bloqueio
H4xH9048P2	1,4E-10	98
H2aM7795N2	2,6E-10	100
H2aM7798N	1,3E-10	100
H4xH9008P	1,3E-09	94
Controle de isótipo 2	NBI	-27

Base teórica de ensaio: bloquear ELISA com hPD-1-mFc constante e revestimento de hPD-L2 é 5.0E-11 M

NBI - sem bloqueadores

[00207] Como indicado na Tabela 12, no primeiro formato de ensaio, 23 dos 27 anticorpos anti-PD-1 bloqueados 1,5nM de hPD-1-mFc de ligação a hPD-L1-hFc com valores de IC<sub>50</sub> variando de 190pM a 3,3nM com o bloqueio máximo percentual variando de 67% a 100%. Um anticorpo, H2aM7796N, foi identificado como um não bloqueador. Três anticorpos anti-PD-1 (H4H9068P2, H1M7789N, e H2aM7791N) foram identificados como não bloqueadores / realçadores.

[00208] Como mostrado na Tabela 13, no segundo formato de ensaio, 23 dos 27 anticorpos anti-PD-1 bloqueados 200pM de biot-hPD-1-hFc de ligação a hPD-L1-mFc com valores de IC<sub>50</sub> variando de 59pM a 1,3nM com bloqueio percentual máximo variando de 60% a 101%. Um anticorpo, H1M7789N, foi identificado como um não bloqueador. Três anticorpos anti-PD-1 (H4H9057P2, H4H9068P2, e H2aM7791N) foram identificados como não bloqueadores / realçadores.

[00209] No terceiro formato de ensaio como mostrado na Tabela 14, quatro anticorpos anti-PD-1 da invenção, e um controle de Isótipo foram testados. Todos os 4 anticorpos anti-PD-1 da invenção bloquearam 100pM (concentração fixa) de hPD-1-mFc de ligação a hPD-L2-hFc

revestido por placa com valores de  $IC_{50}$  variando de 0,13nM a 1,3nM e com bloqueio percentual máximo variando de 94% a 100%.

Exemplo 5: Bloqueio de ligação de PD-1 a PD-L1 como determinado por ensaio de biossensor e por ressonância de plásmon superficial

[00210] Inibição de PD-1 humano de ligação a PD-L1 humano por anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes foi estudada usando ensaio de interferometria de bio-camada em tempo real em um instrumento de biossensor Octeto Red96 (ForteBio Inc.) ou usando um ensaio de biossensor de ressonância de plásmon superficial em tempo real em um instrumento Biacore 3000.

[00211] Estudos de inibição para anticorpos monoclonais anti-PD-1 expressos com um Fc de camundongo foram realizados em um instrumento Octeto Red 96. Primeiro, 100nM de um PD-1 humano recombinante expresso com uma etiqueta de Fc de IgG2a de camundongo (hPD-1-mFc; SEQ ID NO: 323) foi incubado com 500nM de cada anticorpo monoclonal anti-PD-1 durante pelo menos 1 hora antes de conduzir o ensaio de inibição. Cerca de 0,8nm a 1,2nm de PD-L1 humano recombinante expresso com uma etiqueta de Fc de IgG1 humano de terminal C (hPD-L1-hFc; SEQ ID NO: 325) foi capturado usando o biossensor de Octetoo de captura de Fc de IgG anti-humano. Os biossensores de Ovtet revestidos com hPD-L1-hFc foram em seguida mergulhados em cavidades contendo a mistura de hPD-1-mFc e anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes. A experiência inteira foi realizada a 25°C em tampão de HBST Octeto (0,01 M de HEPES pH7,4, 0,15M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,05% v/v de Tensoativo P20, 0,1mg/mL BSA) com a placa agitando em uma velocidade de 1000rpm. Os biossensores foram lavados em tampão de HBST Octeto entre cada etapa da experiência. As respostas de ligação em tempo real foram monitoradas durante o curso inteiro da experiência e a resposta de ligação ao término de cada etapa foi

registrado. Ligação de hPD-1-mFc ao hPD-L1-hFc capturado foi comparada na presença e ausência de anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes e foi usada para determinar o comportamento de bloqueio dos anticorpos testados como mostrado na Tabela 15.

**Tabela 15:** Inibição de ligação de PD-L1 humano a PD-1 por anticorpos monoclonais anti-PD-1 expressos com Fc de camundongo como medido em um instrumento Octeto Red 96

Anticorpo Anti-PD-1	Quantidade de hPD-L1-hFc Capturado (nm)	Ligação da mistura de 100nM de hPD-1-mFc e 500nM de anticorpo monoclonal anti-PD-1 (nm)	% de Bloqueio
Nenhum Anticorpo	0,77	0,07	0
H2aM7780N	1,07	-0,01	114
H2aM7788N	0,74	0,00	100
H1M7789N	0,80	0,05	29
H2aM7790N	0,90	-0,01	114
H2aM7791N	1,17	0,23	-229
H2aM7794N	0,87	-0,01	114
H2aM7795N	0,28	-0,01	114
H2aM7796N	0,82	-0,02	129
H2aM7798N	0,85	0,01	86
H1M7799N	0,79	0,00	100
H1M7800N	0,96	0,00	100

[00212] Como mostrado na Tabela 15, 9 dos 11 anticorpos anti-PD-1 testados no instrumento Octeto Red 96 demonstraram bloqueio forte de hPD-1-mFc de ligação a hPD-L1-hFc variando de 86% para completar bloqueio de ligação. Um anticorpo anti-PD-1 (H1M7789N) testado mostrou bloqueio mais fraco de ligação de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc com 29% de bloqueio. Um anticorpo (H2aM7791N) testado demonstrou a capacidade de realçar a ligação de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc.

[00213] Em seguida, estudos de inibição para anticorpos monoclonais anti-PD-1 expressos com Fc humano foram realizados em um instrumento Biacore 3000. Primeiro, 100nM de um PD-1 humano recombinante expresso com uma etiqueta de Fc de IgG1 humano de terminal C (hPD-1-hFc; SEQ ID: 324) foi incubado com 500nM de cada anticorpo monoclonal anti-PD-1 durante pelo menos 2 horas antes de conduzir o ensaio de inibição. Uma superfície de sensor CM5 Biacore foi primeiro derivatizada com anticorpo anti-camundongo de coelho policlonal (GE Catalog #BR-1008-38) usando química de EDC-NHS padrão. Cerca de 730 RUs de PD-L1 humano recombinante expresso com uma etiqueta de Fc de IgG2a de camundongo (hPD-L1.mFc; SEQ ID: 326) foi capturado seguido pela injeção de 100nM de hPD-1.hFc na presença e ausência de anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes em uma taxa de fluxo de 25µL/min durante 3 minutos. A experiência inteira foi realizada a 25°C em tampão fluente compreendido de 0,01 M de HEPES pH7,4, 0,15M de NaCl, 3mM de EDTA, 0,05% v/v de Tensoativo Tween-20 (tampão fluente de HBS-ET). As respostas de ligação em tempo real foram monitoradas durante o curso inteiro da experiência e a resposta de ligação ao término de cada etapa foi registrado. Ligação de hPD-1-hFc ao hPD-L1-mFc capturado foi comparada na presença e ausência de anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes e usada para determinar o comportamento de bloqueio dos anticorpos testados como mostrado na Tabela 16.

**Tabela 16:** Inibição de ligação de PD-L1 humano a PD-1 por anticorpos monoclonais anti-PD-1 expressos com Fc humano como medido em um instrumento Biacore 3000

Anticorpo monoclonal anti-PD-1	500nM de anticorpo monoclonal anti-PD-1 (RU)	Ligação da mistura de 100nM hPD-1.hFc e 500nM de anticorpo monoclonal anti-PD-1 (RU)	% de Bloqueio
Nenhum Anticorpo	N/A	100 ± 1.78	N/A

Anticorpo monoclonal anti-PD-1	500nM de anticorpo monoclonal anti-PD-1 (RU)	Ligaçao da mistura de 100nM hPD-1.hFc e 500nM de anticorpo monoclonal anti-PD-1 (RU)	% de Bloqueio
H4H9019P	-2	-1	101
H4xH9034P	-4	-5	105
H4xH9035P	-3	-4	104
H4xH9037P	-4	-4	104
H4xH9045P	-4	-5	105
H4H9048P2	-7	9	91
H4H9057P2	58	57	43
H4H9068P2	-2	365	-265
H4xH9119P2	-5	-5	105
H4xH9120P2	1	0	100
H4xH9128P2	-5	-5	105
H4xH9135P2	-3	-3	102
H4xH9145P2	-8	-6	106
H4xH8992P	3	2	98
H4xH8999P	1	0	100
H4xH9008P	0	1	99
H4H7795N2	-5	-6	106
H4H7798N	-6	-6	106
H4H9008P	-7	-7	107
H4H9048P2	-4	6	94

[00214] Como mostrado na Tabela 16, 18 entre 20 anticorpos anti-PD-1 da invenção testados no instrumento Biacore 3000 demonstraram bloqueio forte de hPD-1-hFc de ligação a hPD-L1-mFc com o bloqueio variando de 96% a 100%. Um anticorpo demonstrou a capacidade de realçar a ligação de ligação de hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc. Neste estudo, um dos anticorpos testados da invenção (H4H9057P2) demonstrou ligação antecedente não específica à superfície de captura de Fc anti-camundongo.

Exemplo 6: Competição cruzada de Octeto entre anticorpos anti-PD-1

[00215] Competição de ligação entre anticorpos monoclonais anti-PD-1 foi determinada usando um ensaio de interferometria de bio-

camada de rótulo livre em tempo real em um biosensor Octeto RED384 (Pall ForteBio Corp.). A experiência inteira foi realizada a 25°C entre 0,01 M de HEPES pH7,4, 0,15M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,05% v/v de Tensoativo Tween-20, 0,1mg/mL de BSA (tampão de Octeto HBS-ET) com a placa agitando na velocidade de 1000rpm. Para avaliar se 2 anticorpos são capazes de competir um com outro para ligação a seus respectivo epítopos em um PD-1 humano recombinantemente expresso com uma etiqueta de myc-myc-hexahistidina de terminal C (hPD-1-MMH; SEQ ID: 321), em torno de 0,1nM de hPD-1-MMH foi primeiro capturado em pontos de biossensor Octeto revestidas por anticorpo anti-Penta-His (Pall ForteBio Corp., #18-5079) submergindo-se as extremidades durante 5 minutos em cavidades contendo uma solução de 50µg/mL de hPD-1-MMH. As extremidades de biossensor capturadas por antígeno foram em seguida saturadas com o primeiro anticorpo monoclonal anti-PD-1 (subsequentemente chamado mAb-1) imergindo-se em cavidades contendo 50µg/mL de solução de mAb-1 durante 5 minutos. As extremidades de biossensor foram em seguida subsequentemente imersas em cavidades contendo uma solução de 50µg/mL de um segundo anticorpo monoclonal anti-PD-1 (subsequentemente chamado como mAb-2). As extremidades de biossensor foram lavadas em tampão Octeto HBS-ET entre cada etapa da experiência. A resposta de ligação em tempo real foi monitorada durante o curso da experiência e a resposta de ligação ao término de cada etapa foi registrada. A resposta de ligação de mAb-2 a pré-complexo de hPD-1-MMH com mAb-1 foi comparada e comportamento competitivo/não competitivo de anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes foi determinada. Resultados são resumidos na Tabela 17 (\*mAb2s de Auto-competição não são listados).

**Tabela 17:** Competição cruzada entre pares de anticorpos anti-PD-1 selecionados

Primeiro anticorpo aplicado (“mAb1”)	Anticorpos de mAb2 mostrados para competir com mAb1*			
H4xH8992P	H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N			
H4xH8999P	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P			
H1M7799N	H4xH8992P, H4xH8999P, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P			
H2aM7780N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P			
H1M7800N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P			
H2aM7788N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			

Primeiro anticorpo aplicado (“mAb1”)	Anticorpos de mAb2 mostrados para competir com mAb1*			
H2aM7794N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P			
H2aM7798N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P			
H4xH9145P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9008P, H2aM7791N, H4xH9048P2			
H4H9057P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9048P2			
H4xH9120P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9048P2			
H4xH9128P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9008P, H4H9066P2, H4xH9048P2			

Primeiro anticorpo aplicado (“mAb1”)	Anticorpos de mAb2 mostrados para competir com mAb1*			
H4H9019P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			
H4xH9119P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			
H4xH9135P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			
H4xH9034P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H2aM7788N, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			
H2aM7790N	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9034P, H4xH8999P, H4xH9008P			
H4xH9035P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			
H4xH9037P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N			

Primeiro anticorpo aplicado (“mAb1”)	Anticorpos de mAb2 mostrados para competir com mAb1*			
H4xH9045P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9037P, H2aM7795N, H2aM7791N			
H2aM7795N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4H9057P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7791N			
H4xH9008P	H4xH8999P, H2aM7780N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4xH9128P2, H2aM7790N, H4H9068P2, H1M7799N, H4xH9048P2			
H2aM7791N	H2aM7788N, H4H9057P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N			
H4H9068P2	H4xH9128P2, H4xH9008P, H1M7789N, H4xH9048P2,			
H1M7789N	H4xH9008P, H4H9068P2, H4xH9048P2			
H4xH9048P2	H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9008P, H4H9068P2, H1M7799N			

[00216] Uma segunda competição de ligação entre um painel de anticorpos monoclonais anti-PD-1 selecionados foi determinado usando um ensaio de interferometria de bio camada de rótulo livre em tempo real em um biossensor de Octeto HTX (Pall ForteBio Corp.). A experiência inteira foi realizada a 25°C entre 0,01 M de HEPES pH7,4, 0,15M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,05% v/v de Tensoativo Tween-20, 0,1mg/mL BSA (tampão de Octeto HBS-ET) com a placa agitando na velocidade de 1000rpm. Para avaliar se 2 anticorpos foram capazes de competir um com outro para ligação a seus respectivo epítopos no hPD-1-MMH, em torno de 0,25nm de hPD-1-MMH foi primeiro capturado em extremidades de biossensor Octeto revestido por anticorpo anti-Penta-His (ForteBio Inc, #18-5079) submergindo-se as extremidades durante 150 segundos em cavidades contendo uma solução de 10µg/mL de

hPD-1-MMH. As extremidades de biosensor capturadas por antígeno foram em seguida saturadas com um primeiro anticorpo monoclonal anti-PD-1 (subsequentemente referido como mAb-1) imergindo-se em cavidades contendo 100µg/mL de solução de mAb-1 durante 5 minutos. As extremidades de biosensor foram em seguida subsequentemente imersas em cavidades contendo uma solução de de 100µg/mL do segundo anticorpo monoclonal anti-PD-1 (subsequentemente referido como mAb-2) durante 4 minutos. Todos os biosensores foram lavados em tampão de Octeto HBS-ET entre cada etapa da experiência. A resposta de ligação em tempo real foi monitorada durante o curso da experiência e a resposta de ligação na extremidade de cada etapa foi registrada como mostrado na Figura 2. A resposta de ligação de mAb-2 a pré-complexo de hPD-1-MMH com mAb-1 foi comparado e comportamento competitivo/não competitivo de anticorpos monoclonais anti-PD-1 diferentes foi determinado. Resultados são resumidos na Tabela 18 (\*mAb2s de Auto-competição não são listados).

**Tabela 18:** Competição cruzada entre pares de anticorpos anti-PD-1 selecionados

Primeiro Anticorpo aplicado (“mAb1”)	Anticorpos de mAb2 Mostrados para Competir com mAb1 *
H4H7795N2	H4H7798N
H4H7798N	H4H7795N2; H4H9008P
H4H9008P	H4H7798N; H4H9068P2
H4H9068P2	H4H9008P; H4H9048P2
H4H9048P2	H4H9068P2

[00217] Sob as condições experimentais descritas neste Exemplo, H4H7795N2 competido cruzado com H4H7798N; H4H7798N competido cruzado com H4H7795N2 e H4H9008P; H4H9008P competido cruzado com H4H7798N e H4H9068P2; H4H9068P2 competido cruzado com H4H9008P e H4H9048P2.

**Exemplo 7: Ligação de anticorpo em super expressão de células PD-1**

[00218] A ligação de anticorpos anti-PD-1 a uma linhagem celular de rim embrionária humana (HEK293; ATCC, #CRL-1573) estavelmente transfectadas com PD-1 de tamanho natural humano (aminoácidos 1 a 289 de número de acesso NP\_005009.2) (HEK293/hPD-1) foi determinado por FACS.

[00219] Para o ensaio, células aderentes foram separadas usando tripsina ou tampão de dissociação livre de enzima e bloqueadas com meio completo. Células foram centrifugadas e ressuspensas em uma concentração de 2,5-6x10<sup>6</sup> células/mL em PBS frio contendo 2% de FBS. HEK293 parental e células de HEK293/hPD-1 foram em seguida incubadas durante 15-30min em gelo com 100nM de cada anticorpo anti-PD-1. Anticorpos não ligados foram removidos lavando-se com D-PBS contendo 2% de FBS, e células foram subsequentemente incubadas com um F(ab')2 secundário conjugado por aloficocianina reconhecendo qualquer Fc humano (Jackson ImmunoResearch, #109-136-170) ou Fc de camundongo (Jackson ImmunoResearch, #115-136-146) durante 15-30 minutos em gelo. Células foram lavadas com D-PBS contendo 2% de FBS para remover F(ab')2 secundário não ligado e medidas de fluorescência foram adquiridas usando um citômetro de fluxo HyperCyt (IntelliCyt, Inc.) ou um citômetro de fluxo Accuri (BD Biosciences). Dados foram analisados usando software FlowJo (Tree Star).

**Tabela 19:** Ligação de FACS de anticorpos anti-PD-1 a células de HEK293/hPD-1 e células de HEK293 parentais

Anticorpo	FACS em HEK293 células parentais [MFI]	FACS em células de HEK293/hPD-1 [MFI]	Relação de células parentais de HEK293/hPD-1 para HEK293
H1M7789N	262	24166	92,3
H1M7799N	255	6855	26,9
H1M7800N	275	6812	24,7

Anticorpo	FACS em HEK293 células parentais [MFI]	FACS em células de HEK293/hPD-1 [MFI]	Relação de células parentais de HEK293/hPD-1 para HEK293
H2aM7780N	320	23656	73,8
H2aM7788N	305	23112	75,7
H2aM7790N	270	47310	175,5
H2aM7791N	274	4948	18,0
H2aM7794N	270	19127	71,0
H2aM7795N	288	817	2,8
H2aM7796N	297	49755	167,8
H2aM7798N	300	23443	78,1
H4H9019P	111	8610	77,2
H4H9057P2	141	6501	46,1
H4H9068P2	285	1940	6,8
H4xH8992P	358	17502	48,9
H4xH8999P	809	28875	35,7
H4xH9008P	509	26233	51,5
H4xH9034P	147	10115	69,0
H4xH9035P	108	9915	91,7
H4xH9037P	108	8787	81,4
H4xH9045P	95	8884	93,7
H4xH9048P2	102	7196	70,8
H4xH9119P2	109	9142	84,0
H4xH9120P2	109	9975	91,9
H4xH9128P2	135	9081	67,5
H4xH9135P2	114	9380	82,2
H4xH9145P2	226	11552	51,2

[00220] Como mostrado na Tabela 19, 25 dos 27 anticorpos anti-PD-1 da invenção mostraram ligação forte às células de HEK293 / hPD-1 comparados a ligação na linhagem de HEK293 parental. Dois anticorpos da ligação da invenção (H2aM7795N e H4H9068P2) mais fraca a PD-1 humano expressando células comparados aos outros anticorpos testados.

[00221] Para também caracterizar anticorpos anti-PD1 da invenção, ligação dependente de dose a uma linha celular de rim embrionário humano (HEK293; ATCC, #CRL-1573) estavelmente transfectadas com PD-1 humano de tamanho natural (aminoácidos 1 a 289 de número de acesso NP\_005009.2) (HEK293/hPD-1) foi determinado por FACS.

[00222] Para o ensaio, células aderentes foram separadas usando tripsina e bloqueadas com meio completo. Células foram centrifugadas e ressuspensas em uma concentração de  $6 \times 10^6$  células/mL em tampão de manchamento (1% de FBS em PBS). Para determinar o  $EC_{50}$  e  $E_{max}$  dos anticorpos anti-PD1, 90uL de suspensão de célula foi incubado durante 30 minutos em gelo com uma diluição serial de anticorpos anti-PD-1 e controles diluídos em uma concentração final variando de 5 pM a 100 nM (nenhuma amostra de mAb foi incluída como controle negativo) tampão de manchamento. Células foram em seguida centrifugadas e pelotas foram lavadas uma vez com tampão de manchamento para remover anticorpos não ligados. Células foram subsequentemente incubadas durante 30 minutos em gelo com um F(ab')2 secundário conjugado por aloficocianina reconhecendo Fc humano (Jackson ImmunoResearch, #109-136-170) ou Fc de camundongo (Jackson ImmunoResearch, #115-136-071). Células foram centrifugadas e pelotas foram lavadas uma vez com tampão de manchamento para remover F(ab')2 secundário não ligado e em seguida fixas durante a noite com uma diluição de 1:1 de Cytofix (BD Biosciences, #554655) e tampão de manchamento. O dia seguinte, células foram centrifugadas e pelotas foram lavadas uma vez com tampão de manchamento, ressuspensas e filtradas. Medidas de fluorescência foram adquiridas em citômetro de Hypercyt® e analisadas em ForeCyt™ (IntelliCyt; Albuquerque, NM) para determinar as intensidades de fluorescência médias (MFI). Os valores de  $EC_{50}$  foram calculados a partir de uma equação logística de parâmetro quatro em

uma curva de resposta de 11 pontos usando GraphPad Prism.  $E_{max}$  para cada anticorpo foi definido como a ligação à dose de anticorpo mais alta (100nM) testada.

**Tabela 20:** Dose dependente de ligação de FACS de anticorpos anti-PD-1 a células de HEK293/hPD-1

Anticorpo	EC50 [M]	Max Geom, Mau [MFI] @ 100nM
H2aM7779N	2,59E-09	16832
H2aM7780N	1,69E-09	18415
H2aM7781N	5,67E-10	13740
H2aM7782N	1,26E-09	17302
H2aM7787N	2,40E-09	15744
H2aM7788N	3,21E-10	14827
H2aM7790N	1,71E-10	19196
H2aM7791N	Nenhum EC50 determinado	1397
H2aM7794N	1,37E-09	16406
H2aM7795N	Nenhum EC50 determinado	624
H2aM7798N	6,985E-11	20900
H1M7799N	3,318E-11	24405
H1M7800N	4,80E-11	20763
H4xH8992P	5,45E-11	11368
H4xH8999P	5,27E-11	28341
H4H9019P	1,40E-09	29201
H4xH9034P	2,09E-10	32388
H4xH9035P	1,15E-10	28708
H4xH9037P	6,74E-10	36441
H4xH9045P	9,17E-11	24662
H4xH9048P2	6,68E-10	33687
H4H9057P2	2,363E-10	19953
H4H9068P2	Nenhum EC50 determinado	639
H4xH9119P2	3,476E-10	37789
H4xH9120P2	4,797E-10	34057
H4xH9128P2	1,551E-09	37167
H4xH9135P2	1,048E-10	32793

Anticorpo	EC50 [M]	Max Geom, Mau [MFI] @ 100nM
H4xH9145P2	2,321E-10	30613
isótipo de mlgG1	N/A	200
isótipo de mlgG2a	N/A	239
isótipo de hlgG4	N/A	459

**Tabela 21:** Ligação de FACS dependente de dose de anticorpos anti-PD-1 em células HEK293/hPD-1

Anticorpo	EC50 [M]	Média Geom. Máx [MFI] @ 100nM
H4H7795N2	Inconclusivo	15188
H4H7798N	5,09E-10	20305
H4H9008P	Inconclusivo	32230
H4H9048P2	1,60E-09	39774
H1M7789N	Inconclusivo	35574
H2aM7796N	4,81E-09	14111
isótipo de mlgG1	N/A	858
isótipo de mlgG2a	N/A	352
isótipo de hlgG4	N/A	809

[00223] Como mostrado na Tabela 20, 25 de 28, anticorpos anti-PD1 da invenção mostraram ligação dependente de dose em células HEK293/hPD-1 com valores de EC<sub>50</sub> variando de 33,18pM a 2,59nM e valores de E<sub>máx</sub> variando de 37,789 a 11,368 MFI. Três anticorpos anti-PD1 da invenção não demonstraram ligação forte às células HEK293/hPD-1 e portanto um valor de EC<sub>50</sub> não pôde ser determinado. Nenhum dos controles de isótipo demonstrou qualquer ligação mensurável neste ensaio.

[00224] Como mostrado na Tabela 21, 3 de 6 anticorpos anti-PD1 da invenção mostraram ligação dependente de dose às células HEK293/hPD-1 com valores de EC<sub>50</sub> variando de 509pM a 4,81nM e valores de E<sub>máx</sub> variando de 39,774 a 14,111 MFI. Três anticorpos da invenção testaram ligação às células HEK293/hPD-1, porém não alcançaram um patamar. Portanto, seus valores de EC<sub>50</sub> precisos não puderam ser

determinados e seus valores de EC<sub>50</sub> são referidos como inconclusivos. Nenhum dos controles de isótipo demonstrou qualquer ligação mensurável neste ensaio.

Exemplo 8: Bloqueio de sub-regulamento de célula T induzido por PD-1 em um ensaio repórter de célula T/APC luciferase

[00225] A ativação da célula T é obtida estimulando-se os receptores de célula T (TcR) que reconhecem peptídeos específicos apresentados por células de apresentação de antígeno ou de proteínas de classe I ou II complexas de histocompatibilidade principal (APC). Os TcRs ativados iniciam por sua vez uma cascata de eventos de sinalização que podem ser monitorados por genes repórter direcionados por fatores de transcrição tal como proteína ativadora 1 (AP-1), Fator Nuclear de células T Ativadas (NFAT) ou realçador de cadeia leve capa de fator Nuclear de células B ativadas (NFkb). Resposta à célula T é modulada por envolvimento dos co-receptores expressos constitutivamente ou indutivamente em células T. Um tal receptor é PD-1, um regulador negativo da atividade de célula T. PD-1 interage com seu ligante, PD-L1, que é expresso em células alvo incluindo APCs ou células de câncer, e age para liberar os sinais inibidores recrutando-se fosfatases aos signalossoma de TcR, resultando na supressão da sinalização positiva.

[00226] A capacidade de anticorpos anti-PD-1 de antagonizar a sinalização mediada por PD-1/PD-L1 pelo receptor de PD-1 em linhagens de célula T humanas foi avaliada usando um ensaio com base em célula *in vitro* mostrado na Figura 1. O bioensaio foi desenvolvido para medir a sinalização de célula T induzida por interação entre células APC e T utilizando-se uma cultura misturada derivada de duas linhagens de célula mamífera: células de Jurkat (uma linhagem de célula T imortalizada) e células de Raji (uma linhagem de célula B). Para o primeiro componente do bioensaio, células E6-1 de Clone de Jurkat

(ATCC, #TIB-152) foram transduzidas com o Repórter Cignal Lenti AP-1 Luc (Qiagen-Sabiosciences, #CLS-011L) de acordo com as instruções do fabricante. O lentivírus codifica o gene de vaga-lume luciferase sob o controle de um promotor de CMV mínimo, repetições *tandem* do elemento de resposta transcrecional induzível de TPA (TRE) e um gene com resistência à puromicina. A linhagem de célula de Jurkat criada foi transduzida subsequentemente com uma quimera de PD-1 compreendendo o domínio extracelular de PD-1 humano (aminoácidos de 1 a 170 de PD1 humano; número de acesso NP\_005009.2) e a transmembrana e domínios citoplásmicos de CD300a humano (aminoácidos de 181 a 299 de CD300a humano; número de acesso NP\_009192.2). A linhagem celular estável resultante (Jurkat/AP1-Luc/hPD1-hCD300a) foi selecionada e mantida em RPMI/10% de FBS/penicilina/estreptomicina/glutamina suplementados com 500ug/mL de G418+1ug/mL de puromicina.

[00227] Para o segundo componente do bioensaio, as células de Raji (ATCC, #CCL-86) foram transduzidas com gene de PD-L1 humano (aminoácidos 1-290 de número de acesso NP\_054862.1) que tinha sido clonado de em um sistema de vetor lentiviral (pLEX) (Thermo Scientific Biosystems, #OHS4735). Células de Raji, positivas para PD-L1 (Raji/hPD-L1) foram isoladas por FACS usando um anticorpo de PD-L1 e mantidas em Iscove/10% de FBS/penicilina/estreptomicina/glutamina suplementadas com 1ug/mL de puromicina.

[00228] Para simular a interação de APC/célula T, um anticorpo biespecífico composto de uma subdivisão de Fab que liga CD3 em células T e a outra subdivisão de Fab que liga CD20 em células de Raji (anticorpo biespecífico de CD3xCD20; por exemplo, como descrito em US20140088295) foi utilizado. A presença da molécula biespecífica no ensaio resulta na ativação da célula T e APC ligando-se as subunidades

de CD3 em células T em CD20 endogenamente expressa em células de Raji. A ligação de CD3 com anticorpos anti-CD3 foi demonstrada para levar à ativação de células T. Neste bioensaio, os anticorpos que bloqueiam a interação de PD1/PD-L1 salvam a atividade de célula T incapacitando-se a sinalização inibidora e levando-se subsequentemente à ativação de AP1-Luc aumentada.

[00229] No bioensaio com base em luciferase, RPMI1640 suplementado com 10% de FBS e penicilina/estreptomicina/glutamina foi usado como meio de ensaio para preparar as suspensões celulares e diluições de anticorpo para realizar a avaliação dos anticorpos monoclonais anti-PD1 (mAbs). No dia da avaliação, os valores de EC<sub>50</sub> de mAbs anti-PD1, na presença de uma concentração fixa de anticorpo biespecífico CD3xCD20 (30 pM), bem como a EC<sub>50</sub> do anticorpo biespecífico sozinho, foram determinados. Na ordem seguinte, as células e reagentes foram adicionados às placas de base plana, brancas de 96 cavidades. Para as determinações de EC<sub>50</sub> de mAb anti-PD1, primeiro uma concentração fixa de anticorpo biespecífico CD3xCD20 (30 pM final) foi preparada e adicionada às cavidades de placa de microtípulo. Em seguida, diluições seriais de 12 pontos de mAbs anti-PD1 e controles foram adicionadas (concentrações finais variando de 1,7 pM a 100 nM; mais cavidades apenas com meio de ensaio). Para a determinação de EC<sub>50</sub> do anticorpo biespecífico (sozinho), o anticorpo biespecífico, em concentrações finais variando de 0,17 pM a 10 nM (mais cavidades apenas com meio de ensaio), foi adicionado às cavidades de placa de microtípulo. Subsequentemente, uma suspensão celular de Raji/hPD-L1 de 2,5x10<sup>6</sup>/mL foi preparada e 20 uL por cavidade foram adicionados (número de célula final/cavidade 5x10<sup>4</sup> células). As placas foram deixadas em temperatura ambiente (15-20 minutos), enquanto uma suspensão de 2,5x10<sup>6</sup>/mL de Jurkat/AP1-Luc/hPD1(ecto)-hCD300a(TM-Cyto) foi preparada. 20 uL da suspensão

de Jurkat (número/cavidade de célula final  $5 \times 10^4$  células) foram adicionados por cavidade. As placas contendo a cocultura foram incubadas durante 5 a 6 horas a  $37^\circ\text{C}/5\%$  de  $\text{CO}_2$ . As amostras foram testadas em duplicata e a atividade de luciferase foi em seguida detectada depois da adição do reagente de ONE-Glo™ (Promega, #E6051) e unidades de iluminação relativas (RLUs) foram medidas em um luminômetro Victor.

[00230] Valores de RLU para cada anticorpo avaliado foram normalizados fixando-se a condição de ensaio com concentração fixa (30 pM) do anticorpo biespecífico de CD3/CD20, porém, sem anticorpo anti-PD-1 a 100%. Esta condição corresponde à resposta de AP1-Luc máxima eliciada pela molécula biespecífica na presença do sinal inibidor de PD-1/PD-L1. Na adição do anticorpo anti-PD-1, o sinal inibidor é suprimido, e a estimulação aumentada é mostrada aqui como  $E_{\text{máx}}$ , o aumento da porcentagem no sinal na presença da dose de anticorpo mais alta testada (100 nM). Para comparar a potência dos anticorpos anti-PD1 testados, a concentração de anticorpo ao qual o valor de RLU normalizada alcançou 150% de ativação foi determinada de uma equação logística de quatro parâmetros em uma curva de resposta de 12 pontos usando GraphPad Prism. Os resultados são resumidos na Tabela 22 e Tabela 23, respectivamente.

**Tabela 22:** Anticorpo Anti-PD1 que bloqueia a inibição dependente de PD-1/PD-L1 da sinalização de AP1-Luc na Experiência 1

Anticorpo	Concentração de ensaio antagônica (M) de Anticorpo em 150% de ativação Experiência 1	Média de $E_{\text{máx}}$ de ensaio antagônico [%] @ 100nM Experiência 1
H1M7789N	N/A	135
H1M7799N	2,97E-08	183
H1M7800N	1,65E-08	182
H2aM7779N	8,92E-09	214
H2aM7780N	6,52E-09	228

Anticorpo	Concentração de ensaio antagônica (M) de Anticorpo em 150% de ativação Experiência 1	Média de E <sub>máx</sub> de ensaio antagônico [%] @ 100nM Experiência 1
H2aM7781N	6,70E-09	230
H2aM7782N	9,96E-09	215
H2aM7787N	1,38E-08	215
H2aM7788N	4,72E-09	189
H2aM7790N	5,24E-09	234
H2aM7791N	N/A	103
H2aM7794N	4,09E-08	170
H2aM7795N	N/A	109
H2aM7796N	N/A	121
H2aM7798N	7,99E-10	239
H4H9019P	1,79E-08	180
H4xH9034P	2,62E-09	202
H4xH9035P	1,20E-09	227
H4xH9037P	2,82E-09	195
H4xH9045P	2,23E-08	176
H4xH9048P2	N/A	138
H4H9057P2	2,68E-08	212
H4H9068P2	N/A	102
H4xH9119P2	1,11E-08	163
H4xH9120P2	1,10E-08	166
H4xH9128P2	3,99E-09	187
H4xH9135P2	1,55E-09	193
H4xH9145P2	2,40E-09	185
H4xH8992P	5,32E-09	178
H4xH8999P	8,63E-10	217
H4H7798N	1,54E-09	202
controle de isótipo de mlgG1	N/A	92
controle de isótipo de mlgG2a	N/A	91
controle de isótipo de hlgG4	N/A	94

N/A = não aplicável porque nas concentrações testadas estes anticorpos não

ativaram 150%

**Tabela 23:** Anticorpo Anti-PD1 que bloqueia a inibição dependente de PD-1/PD-L1 da sinalização de AP1-Luc na Experiência 2

Anticorpo	Concentração de ensaio antagônica (M) de Anticorpo em 150% de ativação Experiência 2	Média de $E_{máx}$ de ensaio antagônico [%] @ 100nM Experiência 2
H4H7795N2	N/A	110
H4H7798N	1,59E-10	343
H4H9008P	9,84E-08	150
H4H9048P	N/A	134
controle de isótipo de hIgG4	N/A	98

N/A = não aplicável porque nas concentrações testadas estes anticorpos não ativaram 150%

[00231] Como mostrado na Tabela 22, 25 entre os 31 anticorpos anti-PD-1 da invenção testados bloquearam a inibição de PD-1/PD-L1 com valores de  $E_{máx}$  variando de 239 a 163. Seis entre os 31 anticorpos anti-PD-1 da invenção não demonstraram bloqueio significativo de interação de PD1/PD-L1 quando testados neste ensaio.

[00232] Como mostrado na Tabela 23, 2 entre os 4 anticorpos anti-PD-1 da invenção testados bloquearam a inibição de PD-1/PD-L1 com valores de  $E_{máx}$  de 150 e 343%, respectivamente. 2 entre os 4 anticorpos anti-PD-1 da invenção não demonstraram bloqueio significativo de interação de PD1/PD-L1 quando testados neste ensaio.

#### Exemplo 9: Eficácia *in vivo* de anticorpos anti-PD-1

[00233] Para determinar o efeito de um número seletivo de anticorpos anti-PD-1 da invenção em um modelo *in vivo* relevante, três estudos de crescimento de tumor MC38.ova, envolvendo injeção subcutânea de células de tumor e começados em dias diferentes, foram conduzidos em camundongos que eram homozigotos para a expressão do domínio extracelular de PD-1 humano no lugar do domínio extracelular de PD-1

de camundongo (camundongos HumIn de PD-1) em uma base de cepa de 75% de C57/Bl6 / 25% de 129.

[00234] Para os estudos, os camundongos foram divididos uniformemente de acordo com peso corporal em 5 grupos de tratamento ou controle para o Estudo 1 (5 camundongos por grupo), 8 grupos de tratamento ou controle para Estudo 2 (5 camundongos por grupo), e 5 grupos de tratamento ou controle para Estudo 3 (7 camundongos por grupo). No dia 0, os camundongos foram anestesiados através de inalação de isoflurano e em seguida subcutaneamente injetados no flanco direito com  $5 \times 10^5$  células de MC38.ova em suspensão de 100uL de DMEM para o Estudo 1 ou  $1 \times 10^6$  células de MC38.ova em suspensão de 100 uL de DMEM para o Estudo 2 e Estudo 3. Para o Estudo 1, grupos de tratamento foram intraperitonealmente injetados com 200ug de qualquer um dos três anticorpos anti-PD-1 da invenção, ou um anticorpo de controle de isótipo com especificidade irrelevante nos dias 3, 7, 10, 14, e 17 da experiência, enquanto um grupo de camundongos foi deixado sem tratamento. Para o Estudo 2, grupos de tratamento foram intraperitonealmente injetados com qualquer um dos três anticorpos anti-PD-1 da invenção em 10mg/kg ou 5mg/kg por/dose, um anticorpo da invenção (H4H7795N2) em 10mg/kg por dose, ou um anticorpo de controle de isótipo com especificidade irrelevante em 10mg/kg nos dias 3, 7, 10, 14, e 17 da experiência. Para o Estudo 3, grupos de tratamento foram intraperitonealmente injetados com qualquer um dos dois anticorpos anti-PD-1 da invenção em 5mg/kg ou 2,5mg/kg por/dose, ou um anticorpo de controle de isótipo com especificidade irrelevante em 5mg/kg nos dias 3, 7, 10, 14, e 17 da experiência. O protocolo de tratamento e de dosagem experimental para grupos de camundongos é mostrado na Tabela 24.

**Tabela 24:** Protocolo de tratamento e de dosagem experimental para grupos de camundongos

Estudo #	Amostras Testadas	Quantidade de dosagem em cada ponto de tempo de dosagem	Intervalo de dosagem
1	Controle de isótipo	200ug	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	Nenhum tratamento	N/A	N/A
	H4H7798N	200ug	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	200ug	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	200ug	Dias 3, 7, 10, 14, 17
2	Controle de isótipo	10mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	10mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	10mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	10mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	10mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
3	Controle de isótipo	5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	2,5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	2,5mg/kg	Dias 3, 7, 10, 14, 17

[00235] Para os estudos, volumes de tumor médios determinados por medição de calibre e percentual de sobrevivência no Dia 14 ou 17 e Dia 23 ou 24 de cada experiência para cada grupo de tratamento foram registrados. Além disso, o número de camundongos livres de tumor foi da mesma forma avaliado no término do estudo (Dia 42 durante o Estudo 1 e Dia 31 para Estudo 2 e Estudo 3). Resultados, expressos como volume de tumor médio ( $\text{mm}^3$ ) ( $\pm \text{SD}$ ), percentual de sobrevivência, e número de camundongos livres de tumor são mostrados na Tabela 23 para o Estudo 1, Tabela 3 para o Estudo 2, e Tabela 4 para o Estudo 3.

**Tabela 25:** Volume de tumor médio, percentual de sobrevivência e números de camundongos livres de tumor em cada grupo de tratamento

no Estudo 1 de tumor *in vivo* 1

Grupo de tratamento (n=5)	Volume de tumor, mm <sup>3</sup> média (±SD)		Sobrevivência, %		Camundongos Livres de Tumor
	Dia 17	Dia 23	Dia 17	Dia 23	Dia 42
	200 ug / camundongo	200 ug / camundongo	200 ug / camundongo	200 ug / camundongo	200 ug / camundongo
Nenhum tratamento	189 (±110)	554 (±317)	100%	100%	1/5 (20%)
Controle de isótipo	86 (±114)	515 (±859)	100%	60%	2/5 (40%)
H4H7798 N	0 (0)	0 (0)	100%	100%	5/5 (100%)
H4H9008 P	14 (±19)	205 (±312)	100%	100%	3/5 (60%)
H4H7795 N2	89 (±176)	445 (±889)	100%	80%	3/5 (60%)

[00236] Como mostrado na Tabela 25 para o Estudo 1, os camundongos tratados com um anticorpo da invenção, H4H7798N não desenvolveu nenhum tumor detectável durante o curso do estudo. Os camundongos tratados com H4H9008P exibiram um volume de tumor reduzido contínuo em comparação a controles nos dias 17 e 24 do estudo com 3 entre 5 camundongos ou 4 entre 5 camundongos que estão livres de tumor ao final da experiência, respectivamente. Em comparação, o tratamento com um dos anticorpos anti-PD1, H4H7795N2, não demonstrou eficácia significante na redução do volume de tumor neste estudo em comparação aos controles. Após o dia 23 do estudo, 1 entre 5 camundongos morreram no grupo de H4H7795N2, e 2 entre 5 camundongos morreram no grupo de tratamento de controle de isótipo. No grupo sem tratamento e grupo de controle de isótipo, alguns camundongos exibiram regressão espontânea dos tumores (1 entre 5 camundongos e 2 entre 5 camundongos, respectivamente).

**Tabela 26:** Volume de tumor médio, percentual de sobrevivência e números de camundongos livres de tumor em cada grupo de tratamento do Estudo 2 de tumor *in vivo* 2

Grupo de tratamento (n=5)	Volume de tumor, mm <sup>3</sup> média (±SD)				Sobrevivência, %				Camundongos livres de tumor	
	Dias 17		Dia 24		Dia 17		Dia 24		Dia 31	
	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/ kg	10 mg/ kg	5 mg/ kg	10 mg/ kg	5 mg/ kg	10 mg/kg
Controle de isótipo	N/A	449 (±434)	N/A	824(±858)	N/A	100%	N/A	60%	N/A	1/5 (20%)
H4H7798N	17 (±38)	0 (0)	104 (±233)	0 (0)	100%	100%	100 %	100 %	4/5 (80%)	5/5/ (100%)
H4H9008P	91 (±204 )	12 (±28)	228 (±509)	96 (±215)	100%	100%	80%	100 %	4/5 (80%)	4/5 (80%)
H4H9048P2	94 (±160 )	10 (±21)	328 (±559)	67 (±150)	100%	100%	80%	100 %	3/5 (60%)	4/5 (80%)
H4H7795N2	N/A	124 (±209)	N/A	359 (±657)	N/A	100%	N/A	80%	N/A	2/5 (40%)

[00237] Como mostrado na Tabela 26 para o Estudo 2, os camundongos tratados com um anticorpo da invenção, H4H7798N em 10mg/kg não desenvolveram tumores detectáveis durante o curso do estudo. Grupos de camundongos tratados com 10 mg/kg de H4H9008P ou H4H9048P2 exibiram volume de tumor substancialmente reduzido em comparação a controles nos dias 17 e 24 do estudo. Quatro entre 5 camundongos em cada grupo tratado com 10mg/kg de H4H9008P ou H4H9048P2 ficaram livres de tumor no Dia 31, considerando que no grupo de tratamento de controle de isótipo apenas 1 entre os 5 animais ficaram livres do tumor como um resultado da regressão de tumor espontânea. Um anticorpo testado em 10mg/kg, H4H7795N2, demonstrou volume de tumor substancialmente reduzido em comparação aos controles nos dias 17 e 24 do estudo, porém, este anticorpo foi o anticorpo anti-PD1 menos eficaz com apenas 2 entre os 5 camundongos que sobrevivem ao término da experiência.

[00238] Uma resposta de dose-dependente na supressão de tumor nas doses testadas (5 mg/kg e 10 mg/kg) foi observada em grupos tratados com H4H7798N, H4H9008P, e H4H9048P2. Terapia de H4H7798N ou H4H9008P em 5 mg/kg foi menos eficaz, com 4 entre 5 camundongos

livres de tumor ao término de experiência no dia 21, considerando que 5 entre 5 camundongos permaneceram livres de tumor em ambos grupos de dose de 10 mg/kg de H4H7798N e H4H9008P.

[00239] Teste de Dunett em comparações múltiplas de ANOVA de Bidirecional revelou que as diferenças no crescimento de tumor entre o grupo tratado com anticorpo de controle de isótipo em 10 mg/kg como referência e os grupos tratados em 10 mg/kg com H4H7798N, H4H9008P, ou H4H9048P2 foram estatisticamente significantes com o valor  $p < 0,005$ . As diferenças no crescimento de tumor entre o grupo tratado com anticorpo de controle de isótipo em 10 mg/kg como referência e os grupos tratados em 5 mg/kg com H4H7798N, H4H9008P ou H4H9048P2 foram da mesma forma estatisticamente significantes com um valor de  $p < 0,05$ .

**Tabela 27:** Volume de tumor médio, percentual de sobrevivência e números de camundongos livres de tumor em cada grupo de tratamento de Estudo 3 de tumor *in vivo*

Grupo de tratamento (n=7)	Volume de tumor, mm <sup>3</sup> média (±SD)				Sobrevivência, %				Camundongos livres de tumor	
	Dias 14		Dia 21		Dia 14		Dia 21		Dia 31	
	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg
Controle de isótipo	N/A	94 (±44)	N/A	405 (±326)	N/A	100 %	N/A	86%	N/A	0/7 (0%)
H4H7798 N	0 (0)	0 (0)	19 (±51)	13 (±35)	100 %	100 %	100 %	100 %	6/7 (86%)	6/7 (86%)
H4H9008 P	41 (±68)	7 (±20)	87 (±123)	16 (±42)	100 %	100 %	100 %	100 %	4/7 (57%)	6/7 (86%)

[00240] Como mostrado na Tabela 27 para o Estudo 3, 6 entre 7 camundongos tratados com um anticorpo da invenção, H4H7798N, ou outro anticorpo da invenção, H4H9008P, em 5mg/kg ficaram livres de

tumor ao término da experiência, considerando que não havia animais livres de tumor no grupo de controle de isótipo. Um camundongo transportando tumor no grupo de controle de IgG4 morreu no dia 17 pós-implantação. Apenas 4 dentre os 7 camundongos tratados com H4H9008P em dose de 2,5 mg/kg permaneceram livres de tumor ao término da experiência. A diferença em volumes de tumor no dia 21 entre os anticorpos anti-PD-1 testados e um grupo de controle de isótipo foi estatisticamente significante visto que determinado por ANOVA unidirecional com o pós-teste de comparação múltipla de Dunnett com  $p<0,01$ . Todos os quatro anticorpos anti-PD-1 foram igualmente mais eficazes na dose de 5 mg/kg do que na dose de 2,5 mg/kg.

Exemplo 10: Efeitos antitumor de uma combinação de um anticorpo anti-PD-1 e um antagonista de VEGF em um modelo de tumor tratamento precoce de camundongo

[00241] Um modelo de tumor de tratamento precoce foi desenvolvido para testar a eficácia de uma combinação de um anticorpo anti-PD-1 e um antagonista de VEGF. Neste modelo, a terapia de combinação é administrada logo após a implantação do tumor. A experiência da mesma forma usou um anticorpo anti-PD-L1 sozinho e em combinação com o antagonista de VEGF. O anticorpo anti-PD-1 usado nesta experiência foi o clone de PD-1 anticamundongo "RPMI-14" com IgG2b de rato (Bio X Cell, West Lebanon, NH). O antagonista de VEGF usado nesta experiência foi *afibbercept* (uma molécula quimérica com base em receptor de VEGF, da mesma forma conhecida como "captura de VEGF" ou "VEGFR1R2-FcΔC1(a)", uma descrição completa da qual é fornecido em outro lugar aqui). O anticorpo anti-PD-L1 usado nesta experiência foi um anticorpo monoclonal anti-PD-L1 com sequências de  $V_H/V_L$  de anticorpo "YW243.55S70" de acordo com US20100203056A1 (Genentech, Inc.), com IgG2a de camundongo e que foi reativo cruzado com PD-L1 de camundongo.

**Tabela 28:** Dosagem experimental e grupos de tratamento

Grupo de tratamento	Primeiro Agente	Segundo Agente
Combinação de Controle	controle de isótipo de IgG2a (250 µg, IP)	controle de hFc (250 µg, SC)
Apenas captura de VEGF	controle de isótipo de IgG2a (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
Apenas anti-PD-1	RPMI-14 de mAb anti-PD-1 (250 µg, IP)	controle de hFc (250 µg, SC)
Apenas anti-PD-L1	mAb anti-PD-L1 (250 µg, IP)	controle de hFc (250 µg, SC)
Captura de VEGF + anti-PD-1	RPMI-14 de mAb anti-PD-1 (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
Captura de VEGF + anti-PD-L1	mAb anti-PD-L1 (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)

[00243] As várias terapias foram administradas em cinco pontos de tempo diferentes durante um período de duas semanas (isto é, injeções no Dia 3, Dia 6, Dia 10, Dia 13 e Dia 19).

[00244] Os animais em cada grupo de terapia foram avaliados em termos de incidência de tumor, volume de tumor, tempo de sobrevivência médio, e número de animais livres de tumor no Dia 50. A extensão do crescimento de tumor é resumida na Figura 2 (curvas de crescimento de tumor) e Figura 3 (volume de tumor no Dia 28). Os resultados são da mesma forma resumidos na Tabela 29.

**Tabela 29:** Camundongos livres de tumor em grupos de tratamento

<b>Grupo de tratamento</b>	<b>No. de Animais Livres de tumor após o dia 50</b>
Combinação de Controle	0/10

Grupo de tratamento	No. de Animais Livres de tumor após o dia 50
Apenas captura de VEGF	3/10
Apenas anti-PD-1	4/10
Apenas anti-PD-L1	5/10
Captura de VEGF + anti-PD-1	7/10
Captura de VEGF + anti-PD-L1	9/10

[00245] O crescimento de tumor foi substancialmente reduzido em animais tratados com a combinação de Captura de VEGF + anticorpo anti-PD-1 em comparação com os regimes de tratamento que envolvem apenas o agente terapêutico (veja Figura 2 e 3). Além disso, a sobrevida foi aumentada substancialmente no grupo de Captura de VEGF + anticorpo anti-PD-1, com 70% de animais que sobrevivem pelo menos ao dia 50 depois da implantação do tumor. Em comparação, para os grupos de monoterapia anti-PD-1 e Captura de VEGF, a sobrevida ao Dia 50 foi apenas 40% e 30% respectivamente (veja Figura 3 e Tabela 29).

Exemplo 11: Estudo de tentativa clínica de dosagem de repetição com anticorpo anti-PD-1 como terapia única e em combinação com outras terapias anticâncer em pacientes com malignidades avançadas

[00246] Este é um estudo de aumento progressivo de dose de anticorpo anti-PD-1, sozinho ou em combinação com radioterapia, ciclofosfamida, ou ambos em pacientes com malignidades avançadas. O anticorpo anti-PD-1 exemplar (“mAb”) usado neste Exemplo compreende HCVR de SEQ ID NO: 162 e LCVR de SEQ ID NO: 170.

Objetivos de Estudo

[00247] O objetivo primário do estudo é caracterizar a segurança, tolerabilidade, DLTs de mAb administradas IV como monoterapia, ou em combinação com radiação alvejada (com a intenção de ter este isto servindo como um imunoestimulador, em vez de principalmente terapia ablativa de tumor), ciclofosfamida de baixa dose (uma terapia mostrada

para inibir as respostas de célula T reguladoras), ou ambas em pacientes com malignidades avançadas.

[00248] Os objetivos secundários do estudo são: (1) determinar uma dose de fase 2 indicada (RP2D) de mAb como monoterapia e em combinação com outras terapias anticâncer (radiação alvejada, ciclofosfamida de baixa dose, ou ambas); (2) descrever a atividade antitumor preliminar de mAb, sozinha e com cada par(es) de combinação; (3) para caracterizar o PK de mAb como monoterapia e em combinação com outras terapias anticâncer (radiação alvejada, ciclofosfamida de baixa dose ou ambos); e (4) avaliar a imunogenicidade de mAb.

#### Projeto de Estudo

[00249] A segurança será avaliada em coorte de aumento progressivo de dose 3 + 3 padrão (em monoterapia, combinação com radioterapia, combinação com ciclofosfamida, e combinação com radioterapia mais ciclofosfamida). A escolha da terapia de combinação com radiação, ciclofosfamida, ou ambas serão com base na avaliação do investigador da melhor escolha de terapia para um paciente individual em consulta com o patrocinador. Para estar registrado em um coorte de radioterapia, um paciente tem que ter uma lesão que pode ser irradiada seguramente e para o qual a radicação nas doses limitadas, paliativas contemplada seria considerada medicamente apropriada, e pelo menos uma outra lesão adequada para avaliação de resposta. Um paciente será permitido ser registrado apenas se uma abertura estiver disponível no coorte para o tratamento escolhido.

[00250] Pacientes passarão por procedimentos de avaliação para determinar a elegibilidade dentro de 28 dias antes da administração inicial de mAb. Após a matrícula dos pacientes em um coorte de monoterapia de mAb, a matrícula de coortes subsequentes será determinada por ocorrência de DLTs em coortes anteriores (isto é,

nenhuma DLT em um coorte de 3 pacientes, ou não mais que 1 DLT em um coorte expandido de 6 pacientes), e a disponibilidade de aberturas de paciente. Os níveis de dose da monoterapia planejado são 1, 3, ou 10 mg/kg administrados IV a cada 14 dias (2 semanas).

[00251] Logo que um ou ambos dentre os períodos de observação de DLT de coorte de monoterapia com 1 mg/kg ou 3 mg/kg de mAb são concluídos sem uma DLT em um coorte de 3 pacientes ou com não mais de 1 DLT em um coorte expandido de 6 pacientes, os pacientes podem ser registrados em um coorte combinando ciclofosfamida ou radioterapia com mAb naquele nível de dose de monoterapia. Os pacientes podem ser registrados em uma combinação de mAb + ciclofosfamida/radioterapia logo que os períodos de observação de DLT igualmente para o coorte para aquele nível de dose de mAb + ciclofosfamida e o coorte para aquele nível de dose de mAb + o mesmo regime de radioterapia são concluídos sem DLT em um coorte de 3 pacientes, ou não mais que 1 DLT em um coorte expandido de 6 pacientes.

[00252] Logo que o período de observação de DLT de coorte de monoterapia com 3 mg/kg de mAb é concluído sem DLT em um coorte de 3 pacientes, ou não mais que 1 DLT em um coorte expandido de 6 pacientes, um coorte de monoterapia com 10 mg/kg de mAb pode da mesma forma ser registrado.

[00253] Coortes de monoterapia com 3 mg/kg e 10 mg/kg de mAb serão registrados depois do número requerido de pacientes no coorte de dose de monoterapia anterior (isto é, 1 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente) tem depurado o período de observação de do dia 28 sem uma dose tolerada máxima (MTD) sendo demonstrado para aquele nível de dose. Um coorte de tratamento de combinação de 1 mg/kg de mAb registrará apenas após a conclusão do período de observação de DLT para o coorte de monoterapia de 1 mg/kg. Coortes

de combinação que recebem 3 mg/kg de mAb registrarão apenas quando o número requerido de pacientes nos coortes de combinação de 1 mg/kg de mAb respectivos depurou o período de observação de DLT sem demonstrar uma MTD. Coortes de combinação tripla que combinam mAb com ciclofosfamida e um regime de radiação registrarão apenas quando o número requerido de pacientes em ambos coortes de combinação dupla correspondentes naquele nível de dosagem depurou o período de observação de DLT sem uma MTD a ser demonstrada.

[00254] A Tabela 30 resume os coortes de aumento progressivo de dose em que os pacientes serão registrados.

**Tabela 30:** Possíveis Coortes de Aumento Progressivo de Dose

n	Possível Coorte de Tratamento Nomeado
3–6	monoterapia com 0,3 mg/kg de mAb (a ser registrado apenas de MTD < 1 mg/kg mAb)
3–6	monoterapia com 1 mg/kg mAb
3–6	monoterapia com 3 mg/kg de mAb
3–6	monoterapia com 10 mg/kg de mAb
3–6	1 mg/kg <sup>a)</sup> de mAb + radioterapia (6 Gy × 5)
3–6	1 mg/kg <sup>a)</sup> de mAb + radioterapia (9 Gy × 3)
3–6	3 mg/kg <sup>b)</sup> (ou MTD) de mAb + ciclofosfamida
3–6	3 mg/kg <sup>b)</sup> (ou MTD) de mAb + radioterapia (6 Gy × 5)
3–6	3 mg/kg <sup>b)</sup> (ou MTD) de mAb + radioterapia (9 Gy × 3)
3–6	3 mg/kg <sup>b)</sup> (ou MTD) de mAb + radioterapia (6 Gy × 5) + ciclofosfamida
3–6	3 mg/kg <sup>b)</sup> (ou MTD) de mAb + radioterapia (9 Gy × 3) + ciclofosfamida

[00255] Uma DLT é definida como qualquer dentre os seguintes: uma toxicidade não hematológica (por exemplo, uveíte, ou qualquer outro irAE), ou uma toxicidade hematológica (por exemplo, neutropenia, trombocitopenia, neutropenia febril).

[00256] A dose tolerada máxima (MTD) é definida como a dose mais alta a qual menos de um terço de um coorte expandido de 6 pacientes experimentam uma DLT durante o primeiro ciclo de tratamento. Desse modo, a MTD é imediatamente definida como o nível de dose abaixo do

nível ao qual a dosagem é interrompida devido à ocorrência de 2 ou mais DLTs em um coorte expandido de 6 pacientes. Se o aumento progressivo da dose não é interrompido devido à ocorrência de DLTs, será considerado que a MTD não foi determinada. É possível que uma MTD possa não ser definida neste estudo, para um grupo de monoterapia ou para grupos de combinação individuais. Adicionalmente, é possível que MTDs de mAb possam diferir entre a monoterapia e cada regime de tratamento de combinação.

#### Duração do Estudo

[00257] Pacientes receberão até 48 semanas de tratamento, depois do qual haverá um período de acompanhamento de 24 semanas. Um paciente receberá tratamento até que o período de tratamento de 48 semanas seja concluído, ou até o progresso da doença, toxicidade inaceitável, retirada de consentimento ou conhecimento de outro critério de retirada de estudo. Depois de um mínimo de 24 semanas de tratamento, os pacientes com respostas completas confirmadas (CR) podem eleger descontinuar o tratamento e continuar com todas as avaliações de estudo relevantes (por exemplo, avaliações de eficácia). Depois de um mínimo de 24 semanas de tratamento, os pacientes com avaliações de carga de tumor de doença estável (SD) ou resposta parcial (PR) que foram inalteradas para 3 avaliações de tumor sucessivas podem da mesma forma eleger descontinuar o tratamento e continuar com todas as avaliações de estudo relevantes (por exemplo, avaliações de eficácia).

#### População de Estudo

[00258] A população alvo para este estudo compreende os pacientes com malignidades avançadas que não são os candidatos para terapia padrão, pouco dispostos a passarem por terapia padrão, ou para os quais não está previsto terapia disponível para transmitir benefício clínico; e pacientes com malignidades que são incuráveis e não têm

respondido ou mostrado progresso de tumor apesar da terapia padrão.

[00259] Critérios de inclusão: Um paciente deve atender aos seguintes critérios para serem elegíveis para a inclusão no estudo: (1) demonstrar progresso de um tumor sólido sem opção terapêutica de padrão-de-cuidado alternativa disponível; (2) pelo menos 1 lesão para avaliação de resposta. Pacientes nomeados à radioterapia requerem pelo menos uma lesão adicional que pode ser irradiada seguramente enquanto tratando as lesões de índice e para qual a radiação nas doses limitadas, paliativas contempladas seria considerada medicamente apropriada; (3) Estado de desempenho de Grupo de Oncologia Cooperativo Oriental (ECOG)  $\leq 1$ ; (4) mais que 18 anos de idade; (5) função hepática: a. bilirrubina total  $\leq 1,5x$  de limite superior do normal (ULN; se metástase de fígado  $\leq 3x$  ULN), b. transaminases  $\leq 3x$  ULN (ou  $\leq 5.0x$  ULN, se metástase de fígado), c. fosfatase alcalina (ALP)  $\leq 2,5x$  ULN (ou 5,0x ULN, se metástase de fígado); (6) função renal: creatinina de soro =  $1,5x$  ULN; (7) contagem de neutrófilo (ANC)  $\geq 1,5 \times 10^9/L$ , c. contagem de plaqueta  $\geq 75 \times 10^9/L$ ; (8) capacidade de fornecer o consentimento informado assinado; e (9) capacidade e disposição de cumprir com visitas marcadas, planos de tratamento, testes de laboratório e outros procedimentos relacionados ao estudo.

[00260] Critérios de exclusão: Um paciente que conhece quaisquer dos seguintes critérios será excluído do estudo: (1) Evidência contínua ou recente (dentro de 5 anos) de doença autoimune significante que requereu tratamento com tratamentos imunossupressores sistêmicos, que podem sugerir o risco para irAEs; (2) Tratamento anterior com um agente que bloqueia a série de reação de PD-1/PD-L1; (3) Tratamento anterior com outros agentes de imunomodulação dentro de menos que 4 semanas ou 4 meias-vidas, a que for maior, antes da primeira dose de mAb; (4) Exemplos de agentes de imunomodulação incluem bloqueadores de CTLA-4, 4-1BB (CD137), OX-40, vacinas

terapêuticas, ou tratamentos com citocina; (5) Metástase cerebrais não tratadas (es) podem ser consideradas ativas. Os pacientes com metástase cerebral previamente tratados podem participar contanto que eles sejam estáveis (isto é, sem evidência de progressão para imageamento por pelo menos 4 semanas antes da primeira dose de tratamento de estudo, e qualquer sintoma neurológico que tenham retornado à linha de referência), e não haja evidência de novas ou aumentadas metástase cerebrais; (6) Doses de corticosteroides imunossupressores (>10 mg de prednisona diariamente ou equivalente) dentro de 4 semanas antes da primeira dose de mAb; (7) Trombose de veia profunda, embolia pulmonar (incluindo embolia pulmonar assintomática identificada em imageamento), ou outro evento tromboembólico dentro dos 6 meses que precedem a primeira dose de mAb; (8) Infecção ativa que requer terapia, incluindo infecção conhecida com o vírus da imunodeficiência humana, ou infecção ativa com vírus da hepatite B ou hepatite C; (9) História de pneumonite dentro dos últimos 5 anos; (10) Qualquer tratamento investigacional ou antitumor dentro de 30 dias antes da administração inicial de mAb; (11) História de reações alérgicas documentadas ou reação de hipersensibilidade aguda atribuída ao tratamento com terapias de anticorpo em geral, ou a agentes especificamente usados no estudo; (12) Alergia conhecida para doxiciclina ou tetraciclina (precaução devido à presença de componentes de traço em mAb); (13) Amamentação; (14) Teste de gravidez em soro positivo; (15) História dentro dos últimos 5 anos de uma malignidade invasiva diferente daquela tratada neste estudo, com a exceção de carcinoma de célula escamosa ou basal removido/ressecado da pele ou carcinoma *in situ* da cerviz, ou outros tumores locais considerados curados através de tratamento local; (16) Problemas psiquiátricos agudos ou crônicos que, sob a avaliação do investigador, torne o paciente inelegível para participação; e (17)

Atividade sexual contínua em homens ou mulheres de potencial fértil que estão pouco dispostos a praticarem a contracepção adequada durante o estudo.

#### Tratamentos de Estudo

[00261] mAb será fornecido como um líquido em frasconetes de uso único, estéreis. Cada frasco conterá um volume suficiente para retirar 10 mL de mAb em uma concentração de 25 mg/mL. As instruções na preparação de dose são fornecidas nos manuais de referência de estudo. mAb será administrado na rotina de um paciente externo como uma infusão IV de 30 minutos. A dose de cada paciente dependerá do peso corporal individual. A dose de mAb deve ser ajustada a cada ciclo para mudanças no peso corporal de  $\geq 10\%$ . mAb será administrado sozinho e em combinação com radiação e ou ciclofosfamida.

#### Monoterapia

[00262] mAb será administrado na rotina de um paciente externo por infusão IV durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas (isto é, Dias 1, 15 $\pm$ 3, 29 $\pm$ 3, e 43 $\pm$ 3 de um ciclo de 56 diaa). Regimes de monoterapia planejados a serem nomeados podem incluir: (i) infusão IV de 1 mg/kg durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas; (ii) infusão de 3 mg/kg durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas; (iii) infusão de 10 mg/kg durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas; e (iv) infusão de 0,3 mg/kg durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas (se MTD é determinada estar abaixo de 1 mg/kg).

#### Terapia de Combinação

[00263] Radioterapia concomitante e ciclofosfamida serão fornecidas por uma prescrição e seu uso, dose, modificações de dose, reduções ou adiamentos, bem como quaisquer AEs potenciais resultantes de seu uso, serão localizados juntamente com aqueles de mAb.

[00264] **Coadministração de mAb e radiação:** mAb será

administrado por infusão IV durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas em combinação com tratamento por radiação do dia 8 ao dia 12. regimes de radioterapia e de mAb de combinação planejados podem incluir:

[00265] • infusão de 1 mg/kg de mAb durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas mais 30 Gy de radioterapia (6 Gy × 5 vezes/semana; administradas 1 semana depois da primeira dose de mAb, preferivelmente em dias sucessivos)

[00266] • infusão de 1 mg/kg de mAb durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas mais 27 Gy de radioterapia (9 Gy × 3 vezes/semana; administradas 1 semana depois da primeira dose de mAb, preferivelmente não em dias sucessivos)

[00267] • infusão de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas mais 30 Gy de radioterapia (6 Gy × 5 vezes/semana; administradas 1 semana depois da primeira dose de mAb, preferivelmente em dias sucessivos)

[00268] • infusão de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas mais 27 Gy de radioterapia (9 Gy × 3 vezes/semana; administradas 1 semana depois da primeira dose de mAb, preferivelmente não em dias sucessivos)

[00269] Pacientes receberão 30 Gy administradas como 5 frações de 6 Gy administradas diariamente começando 1 semana depois da primeira dose de mAb, ou 27 Gy administradas como 3 frações de 9 Gy administradas a cada dois dias começando 1 semana após a primeira dose de mAb. A lesão selecionada para radiação deve ser uma lesão que pode ser irradiada seguramente com irradiação focal enquanto tratando a(s) lesão(ões) de índice, e para qual a radiação às doses limitadas, paliativas contempladas seria considerada medicamente apropriada. A dose alvo para um paciente será com base na designação do coorte e deveria conformar-se às exigências de tecido normal, de

acordo com a prática da oncologia de radiação padrão. O tratamento no regime de dosagem específico de protocolo só é permitido se os critérios de tecido normal são conhecidos. Se os critérios de tecido normal não puderem ser conhecidos em qualquer um dos regimentos de radioterapia especificados no protocolo, o paciente não é elegível para registro em um coorte de tratamento por radiação de combinação neste estudo.

[00270] **Coadministração de mAb e ciclofosfamida:** mAb será administrados por infusão IV durante 30 minutos a cada 14 dias (2 semanas) por 48 semanas em combinação com ciclofosfamida 200 mg/m<sup>2</sup> a cada 14 dias para 4 doses. Cada uma das 4 doses de ciclofosfamida será administrada 1 dia antes de cada das primeiras 4 doses de mAb (dias –1, 14, 28, e 42 do primeiro ciclo de 56 dias).

[00271] Embora a ciclofosfamida tenha sido usada bem sucedidamente simultaneamente com outros fármacos, a taxa de metabolismo e a atividade leucopênica de ciclofosfamida são aumentadas declaradamente por administração crônica de doses altas de fenobarbital. O tratamento com ciclofosfamida causa uma inibição marcada e persistente da atividade de colinesterase, desse modo potencializando o efeito do cloreto de sucinilcolina. O regime de ciclofosfamida e de mAb de combinação planejado a ser nomeado é:

[00272] • Ciclofosfamida 200 mg/m<sup>2</sup> a cada 14 dias (dias –1, 14, 28, e 42 do primeiro ciclo de 56 dias) para um total de 4 doses mais

[00273] • infusão de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas (dose de monoterapia fornecida de 3 mg/kg < MTD; se 3 mg/kg > MTD, a dose será de 1 mg/kg).

[00274] **Coadministração de mAb, radiação e ciclofosfamida:** Os regimes de mAb, radiação e ciclofosfamida de combinação planejados incluem:

• Ciclofosfamida 200 mg/m<sup>2</sup> a cada 14 dias (dias –1, 14, 28,

e 42 do primeiro ciclo de 56 dias) para um total de 4 doses mais

- 27 Gy de radioterapia (9 Gy × 3 vezes/semana; administrada 1 semana após a primeira dose de mAb, preferivelmente não em dias sucessivos) OU

- 30 Gy de radioterapia (6 Gy × 5 vezes/semana; administrada 1 semana após a primeira dose de mAb, preferivelmente em dias sucessivos)

mais

- infusão de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos a cada 14 dias durante 48 semanas (dose de monoterapia fornecida de 3 mg/kg < MTD; se 3 mg/kg > MTD, a dose será 1 mg/kg)

#### Variáveis de Estudo

[00275] Variáveis Primárias: Variáveis de segurança primárias incluem a incidência de DLTs, incidência e severidade de eventos adversos emergentes de tratamento (TEAEs), e resultados de laboratório anormais por 48 semanas de tratamento.

[00276] Variáveis Secundárias: Variáveis secundárias principais incluem os seguintes:

- Concentração de soro e farmacocinéticas (PK) de mAb
- Atividades antitumor avaliadas usando os critérios apropriados para a indicação:

- Critérios de Avaliação de Resposta em critérios de Tumores Sólidos (RECIST) medidos por tomografia computadorizada (CT) ou imageamento por ressonância magnética (MRI)

- Outros critérios de avaliação da mesma forma devem ser usados para tumores específicos nos quais as medidas de RECIST não são o padrão.

- Critérios de Resposta Imuno-Relacionados (irRC) aplicados às medidas de RECIST.

[00277] Em todos os casos, irRC serão a ferramenta administrativa

para determinar o progresso da doença (PD), SD, CR, ou PR. Dados de RECIST padrão serão da mesma forma coletados para propósitos de informação.

- Anticorpos anti-mAb

#### Procedimentos de Estudo

[00278] Os procedimentos seguintes serão realizados na avaliação para o propósito de determinar a elegibilidade do estudo ou caracterizar a população de linha de referência: (i)  $\beta$ -HCG de soro (resultado deve ser  $\leq$  72 horas antes da primeira dose); (ii) Coleta do material de tumor arquivado: Depois que um paciente deu consentimento informado, o paciente será convidado a acomodar-se fornecer quaisquer amostras de tumor previamente coletadas disponíveis; (iii) MRI de Cérebro: MRI de Cérebro é requerido na avaliação se não realizado nos 60 dias anteriores; e (iv) Raios X de Tórax: Rais X de tórax é requerido na avaliação se não realizado nos 60 dias anteriores.

[00279] Procedimentos de Eficácia: Uma CT ou MRI para avaliação de tumor será realizada na visita de avaliação (dentro de 28 dias antes da infusão) e durante todo ciclo (aproximadamente a cada 8 semanas) no dia  $56 \pm 3$ , e quando o progresso da doença é suspeito. Adicionalmente, para pacientes que não progrediram no estudo, a avaliação do tumor será realizada para visitas de acompanhamento 3, 5, e 7. Logo que a escolha foi feita para usar varredura por CT ou MRI, as avaliações subsequentes serão feitas usando a mesma modalidade.

[00280] A avaliação de resposta de tumor será realizada de acordo com os critérios de resposta imunorrelacionados (irRC; Nishino 2013). As avaliações de acordo com os Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) versão 1.1 (Eisenhauer 2009) da mesma forma serão realizados como uma exploração de apoio; entretanto, a determinação primária do progresso de doença para um paciente individual será feita de acordo com irRC. Lesões mensuráveis

selecionadas como lesões alvo para avaliações de RECIST serão da mesma forma incluídas como lesões de índice para avaliações de irRC.

[00281] Procedimentos de Segurança: Sinais vitais, incluindo temperatura, pressão arterial em descanso, pulsação e respiração, serão coletados. Quando marcados na mesma visita como outros procedimentos, os sinais vitais deveriam ser medidos antes das avaliações de laboratório clínicas, PK ou coleta de amostra exploratória. Durante o ciclo 1, sinais vitais serão registrados nos dias de tratamento antes do tratamento, ao término da infusão, a cada 30 minutos para as primeiras 4 horas pós-infusão, e em 6 e 8 horas após a administração do fármaco de estudo. Em ciclos subsequentes, sinais vitais nos dias de tratamento serão avaliados e documentados antes da infusão, a cada 30 minutos durante as primeiras 2 horas, e em seguida de hora em hora até 4 horas após a administração do fármaco de estudo.

[00282] Um exame físico completo ou limitado minucioso será realizado nas visitas. Exame físico completo incluirá exame de pele, cabeça, olhos, nariz, garganta, pescoço, articulações, pulmões, coração, pulsação, abdômen (incluindo, fígado e baço), linfonodos, e extremidades, bem como um exame neurológico breve. Exame físico limitado incluirá pulmões, coração, abdômen e pele.

[00283] Um ECG com 12 derivações padrão, será realizado. Qualquer descoberta por ECG que seja julgada pelo investigador como uma mudança clinicamente significante (piora) em comparação ao valor de linha de referência será considerada um AE, registrado e monitorado.

[00284] Ensaios de segurança imunes consistem em fator reumatoide (RF), hormônio estimulador da tireoide (TSH), proteína reativa C (CRP), e padrão e título de anticorpo antinuclear (ANA). Se, durante o curso do estudo, um aumento de 4 vezes ou mais da linha de referência em RF ou ANA ou níveis anormais de TSH ou CRP for observado, os seguintes testes podem da mesma forma ser realizados:

anticorpo anti-DNA, anticorpo de antígeno de síndrome A anti-Sjögren (SSA) (Ro), anticorpo de antígeno de síndrome B anti-Sjögren (SSB) (La), anticorpo antitiroglobulina, anticorpo anti-LKM, anticorpo antifosfolipídico, anticorpo de célula anti-ilhota, anticorpo de citoplasma antineutrófilo, C3, C4, CH50. O tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e Relação Normalizada Internacional (INR) serão analisados pelo laboratório local do sítio.

### Segurança

[00285] Um evento adverso (AE) é qualquer ocorrência médica desfavorável em um paciente administrado com um fármaco de estudo que pode ou não ter uma relação causal com o fármaco de estudo. Portanto, um AE é qualquer sinal desfavorável e não intencional (incluindo descoberta de laboratório anormal), sintoma ou doença que seja temporariamente associado com o uso de um fármaco de estudo, se ou não considerado relacionado ao fármaco de estudo. Um AE da mesma forma inclui qualquer agravamento (isto é, qualquer mudança clinicamente significante na frequência e/ou intensidade) de uma condição pré-existente que está temporariamente associada com o uso do fármaco de estudo. O progresso de malignidade subjacente não será considerado um AE se for claramente consistente com o padrão de progresso típico do câncer subjacente (incluindo curso de tempo, órgãos afetados, etc.). Sintomas clínicos de progresso podem ser informados como AEs se o sintoma não puder ser determinado como exclusivamente devido ao progresso da malignidade subjacente, ou não ajustar o padrão esperado do progresso para doença em estudo.

[00286] Um evento adverso sério (SAE) é qualquer ocorrência médica desfavorável que em qualquer dose resulta na morte, é ameaçador da vida, requer internação hospitalar ou prolongamento da hospitalização existente, resulta na deficiência/incapacidade persistente ou significante (rompimento significativo da capacidade da pessoa

administrar as funções de vida normais), é uma anomalia/imperfeição de nascimento congênito.

[00287] A informação do paciente sobre todos os AEs e SAEs será registrada.

#### Plano Estatístico

[00288] O aumento progressivo da dose de estudo é com base em um projeto 3 + 3 tradicional com 3 a 6 pacientes nomeados por nível de dose. O número exato de pacientes registrados no estudo dependerá do número de DLTs definidos por protocolo observado, e da necessidade de ampliar os níveis de dose atualmente definidos, ou coortes adicionais abertos em níveis de dose mais baixos. Depois que o registro inicial exigida para o próximo coorte no aumento progressivo de dose ocorreu, o registro de cada um dentre os coortes anteriores abaixo da MTD para aquele tratamento será ampliado (se não previamente expandido durante o aumento progressivo) para um total de 6 pacientes.

[00289] Os dados serão resumidos usando apenas estatísticas descritivas. Em geral, os dados serão resumidos por níveis de dose e combinações. As análises e resumos de segurança serão realizados no conjunto de análise de segurança (SAF). A análise primária de segurança será com base em AEs emergentes de tratamento (TEAEs).

[00290] A presente invenção não deve ser limitada no escopo pelas modalidades específicas descritas aqui. De fato, várias modificações da invenção além daquelas descritas aqui ficarão evidentes àqueles versados na técnica da descrição precedente e das figuras acompanhantes. Tais modificações são pretendidas serem incluídas no escopo das reivindicações anexas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à proteína de morte programada humana-1 (PD-1), caracterizado pelo fato de que

o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende uma região variável de cadeia pesada (HCVR) comprehendendo três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e uma região variável de cadeia leve (LCVR) comprehendendo três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3), em que:

o HCDR1 consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308 e 316;

o HCDR2 consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310 e 318;

o HCDR3 consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312 e 320;

o LCDR1 consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188 e 204;

o LCDR2 consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190 e 206; e

o LCDR3 consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80,

96, 112, 128, 144, 160, 176, 192 e 208.

2. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 consistem nas sequências de aminoácidos de:

SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 12, 14 e 16, respectivamente;

SEQ ID NOs: 20, 22, 24, 28, 30 e 32, respectivamente;

SEQ ID NOs: 36, 38, 40, 44, 46 e 48, respectivamente;

SEQ ID NOs: 52, 54, 56, 60, 62 e 64, respectivamente;

SEQ ID NOs: 68, 70, 72, 76, 78 e 80, respectivamente;

SEQ ID NOs: 84, 86, 88, 92, 94 e 96, respectivamente;

SEQ ID NOs: 100, 102, 104, 108, 110 e 112, respectivamente;

SEQ ID NOs: 116, 118, 120, 124, 126 e 128, respectivamente;

SEQ ID NOs: 132, 134, 136, 140, 142 e 144, respectivamente;

SEQ ID NOs: 148, 150, 152, 156, 158 e 160, respectivamente;

SEQ ID NOs: 164, 166, 168, 172, 174 e 176, respectivamente;

SEQ ID NOs: 180, 182, 184, 188, 190 e 192, respectivamente;

SEQ ID NOs: 196, 198, 200, 204, 206 e 208, respectivamente;

SEQ ID NOs: 212, 214, 216, 204, 206 e 208, respectivamente;

SEQ ID NOs: 220, 222, 224, 204, 206 e 208, respectivamente;

SEQ ID NOs: 228, 230, 232, 204, 206 e 208,

respectivamente;

SEQ ID NOs: 236, 238, 240, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 244, 246, 248, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 252, 254, 256, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 260, 262, 264, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 268, 270, 272, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 276, 278, 280, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 284, 286, 288, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 292, 294, 296, 204, 206 e 208,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 300, 302, 304, 188, 190 e 192,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 308, 310, 312, 188, 190 e 192,  
respectivamente;

SEQ ID NOs: 316, 318, 320, 188, 190 e 192,  
respectivamente.

3. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a HCVR tem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 114, 130, 162, 178, 194, 210, 218, 226, 234, 242, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306 e 314; e a LCVR tem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 122,

138, 170, 186 e 202.

4. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo comprehende um par de sequência de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 e 314/186.

5. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo comprehende um par de sequência de aminoácidos de cadeia pesada/cadeia leve selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 330/331, 332/333, 334/335 and 336/337.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que comprehende o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1-5, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

7. Molécula polinucleotídica isolada, caracterizada pelo fato de que comprehende: uma sequência polinucleotídica selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 217, 225, 233, 241, 249, 257, 265, 273, 281, 289, 297, 305 e 313 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam a sequência de aminoácidos da HCVR do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

8. Vetor isolado, caracterizado pelo fato de que comprehende a molécula polinucleotídica, como definida na reivindicação 7.

9. Molécula polinucleotídica isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência polinucleotídica selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185 e 201 ou suas sequências nucleotídicas degeneradas que codificam a sequência de aminoácidos da LCVR do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

10. Vetor isolado, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula polinucleotídica, como definida na reivindicação 9.

11. Método para produção de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo de uma célula hospedeira que expressa os vetores, como definidos nas reivindicações 8 e 10, sob condições que permitem a produção do anticorpo ou fragmento e a recuperação do anticorpo ou fragmento assim produzido.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula CHO.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a formulação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como uma composição farmacêutica compreendendo um veículo aceitável.