



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112017001385-1 B1

(22) Data do Depósito: 22/07/2015

(45) Data de Concessão: 05/12/2023

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DO MESMO QUE LIGA A PD-1, USO DESTA, COMPOSIÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO E VETOR DE EXPRESSÃO

(51) Int.Cl.: A61K 39/395; C07K 16/18.

(30) Prioridade Unionista: 22/07/2014 CN PCT/CN2014/082721.

(73) Titular(es): CB THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): JIPING ZHA; ZIYONG SUN; JUNZHUAN QIU.

(86) Pedido PCT: PCT US2015041575 de 22/07/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/014688 de 28/01/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/01/2017

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTI-PD-1. A presente invenção se refere a anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que ligam a PD-1 e a métodos de usar tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno. Por exemplo, a presente invenção proporciona anticorpos anti-PD-1 humanizados e métodos de uso dos mesmos.

ANTICORPO ISOLADO OU FRAGMENTO DO MESMO QUE LIGA A PD-1, USO DESTE, COMPOSIÇÃO, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO E VETOR DE EXPRESSÃO
REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade do Pedido Internacional PCT/CN2014/082721, depositado em 22 de julho de 2014, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade para todos os fins.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção refere-se a anticorpos e fragmentos dos mesmos de ligação ao antígeno que se ligam a PD-1, e a métodos de utilização de tais anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno.

DESCRIÇÃO DO ARQUIVO DE TEXTO ENVIADO ELETRONICAMENTE

[0003] O conteúdo do arquivo de texto enviado eletronicamente é aqui incorporado por referência na sua totalidade: Uma cópia de formato legível por computador da Listagem de Sequências (nome do arquivo: CRBI_006_01WO_SeqList_ST25); data de gravação: 14 de julho de 2015; arquivo de 147KB tamanho).

FUNDAMENTOS

[0004] O receptor de morte programada 1 (PD-1) é expresso principalmente nos linfócitos e tem dois ligandos, PD-L1 e PD-L2. PD-1 é uma proteína de 55 kDa codificada por um gene Pdcd1 e foi mostrada para infrarregular a sinalização do receptor de antígeno impulsionada pelo engate do seu ligando (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman, et. al. (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32:634-43). PD-1 pertence à superfamília de imunoglobulina que inclui membros, tais como CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. A PD-1 é glicoproteína transmembranar de tipo I contendo um domínio de tipo variável (tipo V) de Ig para ligação de ligando e uma cauda

citoplasmática para a ligação de moléculas de sinalização. O PD-1 contém dois motivos de sinalização à base de tirosina citoplasmática, um motivo de inibição à base de imunorreceptor de tirosina (ITIM) e um motivo de comutação à base de imunorreceptor de tirosina (ITSM). Após a estimulação das células T, PD-1 recruta a tirosina fosfatase SHP-2 para o motivo ITSM dentro da sua cauda citoplasmática, conduzindo à desfosforilação de moléculas efetoras, tais como CD3 Zeta, PKC theta e ZAP70 que estão envolvidas na cascata de sinalização de células T CD3. Em contraste, os ligandos de PD-1 (PD-L1 e PD-L2) têm duas regiões citoplasmáticas curtas sem nenhuma função conhecida. Os ligantes têm uma região extracelular contendo domínios semelhantes a IgV e IgC são constitutivamente expressos ou podem ser induzidos em uma variedade de tipos de células, incluindo os tecidos não hematopoiéticos, assim como vários tipos de tumores. PD-L1 não é apenas expresso em células B, T, mieloides e dendríticas (DCs), mas também em células periféricas, como células endoteliais microvasculares e órgãos não linfóides como coração, pulmão etc. Em contraste, o PD-L2 só é encontrado em macrófagos e DCs. O padrão de expressão de ligandos de PD-1 é sugestivo de um papel para PD-1 na manutenção da tolerância periférica e pode servir para regular as respostas de células T e B autorreativas na periferia. Até à data, numerosos estudos demonstraram que a interação de PD-1 com os seus ligandos leva à inibição da proliferação de linfócitos in vitro e in vivo. A interrupção da interação PD-1/PDL1 demonstrou aumentar a proliferação de células T e promover a produção de citocinas.

[0005] Deste modo, existe um papel importante para a via PD-1/PD-L1 no controle das respostas imunes. A disfunção da

sinalização de PD-1/PD-L1 parece estar correlacionada com a iniciação e desenvolvimento de doenças, tais como câncer e infecção viral. A análise de animais knockout levou ao entendimento de que a PD-1 funciona principalmente na indução e regulação da tolerância periférica. Assim, o bloqueio terapêutico da via PD-1 seria útil na superação da tolerância imunológica e no tratamento de câncer ou infecção bem como no reforço da imunidade durante a vacinação (profilática ou terapêutica). Há uma necessidade na técnica de métodos melhorados para bloquear a via de PD-1.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] Em um aspecto, a presente invenção fornece anticorpos e fragmentos dos mesmos de ligação ao antígeno que se ligam ao receptor de morte programada 1 (PD-1). Em algumas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos se ligam a PD-1 humana. Em algumas modalidades, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos se ligam a PD-1 e bloqueiam a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 a PD-1. Em outras modalidades, os anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos dos mesmos ligam-se a PD-1 e interrompem a via PD-1/PD-L1 ou PD1/PD-L2. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo é um anticorpo murino, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento do mesmo é um anticorpo monoclonal, scFv, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab)', anticorpo biespecífico, imunoconjugado, ou uma combinação dos mesmos.

[0007] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo isolado ou um fragmento do mesmo compreendendo uma ou mais CDRs selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 19-21, 24-26, 29-31, 34-36, 40-42, 45-47, 50-52, 55-57, 60-62, 65-

67, 70-72, 75-77, 80-82, 85-87, 90-92, 95-97, 100-102, 105-107, 110-112, e 115-117.

[0008] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma sequência de CDR1 da cadeia leve com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 81% de homologia, pelo menos 82% de homologia, pelo menos 83% de homologia, pelo menos 84% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 86% de homologia, pelo menos 87% de homologia, pelo menos 88% de homologia, pelo menos 89% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, e 115.

[0009] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento mesmo compreende uma sequência de CDR2 da cadeia leve com, pelo menos, 80% de homologia, pelo menos 81% de homologia, pelo menos 82% de homologia, pelo menos 83% de homologia, pelo menos 84% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 86% de homologia, pelo menos 87% de homologia, pelo menos 88% de homologia, pelo menos 89% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 25, 35, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 e 116.

[0010] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma sequência de CDR3 da cadeia leve com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 81% de homologia, pelo menos 82% de homologia, pelo menos 83% de homologia, pelo menos 84% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 86% de homologia, pelo menos 87% de homologia, pelo menos 88% de homologia, pelo menos 89% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 26, 36, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107 e 117.

[0011] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma sequência de CDR1 da cadeia pesada com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 81% de homologia, pelo menos 82% de homologia, pelo menos 83% de homologia, pelo menos 84% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 86% de homologia, pelo menos 87% de homologia, pelo menos 88% de homologia, pelo menos 89% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 19, 29, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, e 110.

[0012] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma sequência de CDR2 da cadeia pesada com pelo menos

80% de homologia, pelo menos 81% de homologia, pelo menos 82% de homologia, pelo menos 83% de homologia, pelo menos 84% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 86% de homologia, pelo menos 87% de homologia, pelo menos 88% de homologia, pelo menos 89% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20, 30, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, e 111.

[0013] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma sequência de CDR3 da cadeia pesada com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 81% de homologia, pelo menos 82% de homologia, pelo menos 83% de homologia, pelo menos 84% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 86% de homologia, pelo menos 87% de homologia, pelo menos 88% de homologia, pelo menos 89% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21, 31, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 e 112. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma CDR1 da cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, e 115; uma CDR2 da cadeia leve que consiste em uma

sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 25, 35, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, e 116; uma CDR3 da cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 26, 36, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107 e 117; uma CDR1 da cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 19, 29, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, e 110; uma CDR2 da cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20, 30, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, e 111 e uma CDR3 da cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21, 31, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 e 112.

[0014] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 24, 25 e 26, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de

homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 19, 20 e 21, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 24, 25 e 26, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 19, 20 e 21, respectivamente.

[0015] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 34, 35 e 36, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 34, 35 e 36,

respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente.

[0016] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a PD-1 e compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos homologia de 91%, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 45, 46 e 47, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 45, 46 e 47, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, respectivamente.

[0017] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de

homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente.

[0018] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a PD-1 e compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos homologia de 91%, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 65, 66 e 67,

respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOS: 60, 61 e 62, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOS: 65, 66 e 67, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOS: 60, 61 e 62, respectivamente.

[0019] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOS: 75, 76 e 77, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de

homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 70, 71 e 72, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 75, 76 e 77, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 70, 71 e 72, respectivamente.

[0020] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 85, 86 e 87, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácido de acordo com as SEQ ID NOs: 80, 81 e 82, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 85, 86 e 87,

respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 80, 81 e 82, respectivamente.

[0021] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 95, 96 e 97, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácido de acordo com as SEQ ID NOs: 90, 91 e 92, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 95, 96 e 97, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 90, 91 e 92, respectivamente.

[0022] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de

homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 105, 106 e 107, respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOs: 105, 106 e 107, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, respectivamente.

[0023] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento se liga a PD-1 e compreende uma CDR1, CDR2, e CDR3 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99 % de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOs: 115, 116 e 117,

respectivamente; e uma cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NOS: 110, 111 e 112, respectivamente. Em uma outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo compreende uma cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 de acordo com as SEQ ID NOS: 115, 116, 117, respectivamente, e uma CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de acordo com as SEQ ID NOS: 110, 111 e 112, respectivamente.

[0024] Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga a PD-1 e compreende uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92%, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 23, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 133, 143 e 152; e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de

homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 28, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 131 e 141. Em uma outra modalidade, o anticorpo isolado ou o fragmento do mesmo liga-se a PD-1 e compreende uma região variável da cadeia leve compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 23, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 133, 143 e 152; e uma região variável da cadeia pesada compreendendo, consistindo essencialmente em, ou que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 28, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 131 e 141.

[0025] Em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos anti-PD-1 que compreendem uma cadeia leve variável de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em 10D1, 4C10, 7D3, 13F1, 15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8, 7A4 e 7A4D e uma cadeia pesada variável de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em 10D1, 4C10, 7D3, 13F1, 15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8 e 7A4. Assim, em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo ou um fragmento do mesmo compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 23 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 18; e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 33 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 28 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 44 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 39 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 54 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 49 e uma região variável da cadeia leve compreendendo

a SEQ ID NO: 64 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 59 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 74 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 69 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 84 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 79 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 94 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 89 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 104 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 99 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 114 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 109 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 133 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 131 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 143 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 141 e uma região variável da cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 152 e uma região variável da cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 131.

[0026] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 quimérico, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada com uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs;

119, 121, 125 e 127; e uma cadeia leve com uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 123 e 129.

[0027] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada com uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 131 e 141. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve com uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, pelo menos 99% de homologia com uma sequência de

aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 133, 143 e 152.

[0028] Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia com a SEQ ID NO: 131 e uma região variável da cadeia leve com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com a SEQ ID NO: 133 ou 152. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com a SEQ ID NO: 141 e uma região variável da cadeia leve com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 95% de

homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com a SEQ ID NO: 143.

[0029] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada completa com uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 135, 137, 145 e 147. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia leve completa com uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de homologia, pelo menos 85% de homologia, pelo menos 90% de homologia, pelo menos 91% de homologia, pelo menos 92% de homologia, pelo menos 93% de homologia, pelo menos 94% de homologia, pelo menos 95% de homologia, pelo menos 96% de homologia, pelo menos 97% de homologia, pelo menos 98% de homologia, ou pelo menos 99% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 139, 149 e 153.

[0030] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 135 e uma cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 139. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada de acordo com a SEQ

ID NO: 137 e uma cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 139. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 135 e uma cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 153. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 137 e uma cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 153. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 145 e uma cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 149. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo anti-PD-1 humanizado, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 147 e uma cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 149. Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos dos mesmos que se ligam ao mesmo epítipo em PD-1, tal como qualquer um dos anticorpos exemplificativos aqui fornecidos. Em uma modalidade, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos competem com qualquer um dos anticorpos exemplificativos aqui fornecidos para ligação a PD-1. A ligação a PD-1 pode ser medida por ELISA, citometria de fluxo, ensaio de ressonância de plasmon de superfície (SPR) ou qualquer outro método conhecido na técnica.

[0031] Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos que se ligam a PD-1 com uma afinidade de cerca de 1 nM a cerca de 0,01 nM. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,5 nM a cerca de 0,1 nM. Em uma outra modalidade, os

anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 1 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,75 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,5 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,25 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,2 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,15 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,1 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,075 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,05 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,025 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,02 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,015 nM ou inferior. Em uma outra

modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,01 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,0075 nM ou inferior. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 com uma afinidade de cerca de 0,005 nM ou inferior.

[0032] Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 1 ng/mL a cerca de 2000 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1500 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 2 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 2 ng/mL a cerca de 200 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 5 ng/mL a cerca de 100 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecidos aqui têm uma EC50 de ligação para PD-1 de cerca de 5 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos aqui fornecidos tem uma EC50 de ligação para a PD-1 de cerca de 500 ng/mL ou inferior, cerca de 400 ng/mL ou inferior, cerca de 300

ng/mL ou inferior, cerca de 250 ng/mL ou inferior, cerca de 200 ng/mL ou inferior, cerca de 150 ng/mL ou inferior, cerca de 100 ng/mL ou inferior, cerca de 75 ng/mL ou inferior, cerca de 60 ng/mL ou inferior, cerca de 50 ng/mL ou inferior, cerca de 40 ng/mL ou inferior, ou cerca de 30 ng/mL ou inferior.

[0033] Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos inibem a ligação de PD-L1 com uma IC50 de cerca de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1000 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos inibem a ligação de PD-L1 com uma IC50 de cerca de cerca de 2 ng/mL a cerca de 800 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos inibem a ligação de PD-L1 com uma IC50 de cerca de cerca de 5 ng/mL a cerca de 500 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos inibem a ligação de PD-L1 com uma IC50 de cerca de cerca de 5 ng/mL a cerca de 100 ng/mL. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos inibem a ligação de PD-L1 com uma IC50 de cerca de cerca de 10 ng/mL a cerca de 50 ng/mL. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos aqui fornecidos inibem a ligação de PD-L1 com uma IC50 de cerca de 800 ng/mL ou inferior, cerca de 400 ng/mL ou inferior, cerca de 300 ng/mL ou inferior, cerca de 250 ng/mL ou inferior, cerca de 200 ng/mL ou inferior, cerca de 150 ng/mL ou inferior, cerca de 100 ng/mL ou inferior, cerca de 75 ng/mL ou inferior, cerca de 60 ng/mL ou inferior, cerca de 50 ng/mL ou inferior, cerca de 40 ng/mL ou inferior, ou cerca de 30 ng/mL ou inferior.

[0034] Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-1 aqui fornecido é um anticorpo humanizado com uma sequência de

aminoácidos de região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 133 e um aminoácido da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 143; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 141; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 152 e uma sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131; em que o anticorpo anti-PD-1 tem uma EC50 de ligação a PD-1 de cerca de 200 ng/mL ou inferior, ou cerca de 150 ng/mL ou inferior, ou cerca de 100 ng/mL ou inferior, ou cerca de 80 ng/mL ou inferior, ou cerca de 60 ng/mL ou inferior, como medido por ELISA ou FACS. Em uma outra modalidade, o anticorpo anti-PD-1 aqui fornecido é um anticorpo humanizado com uma sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 133 e um aminoácido da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 143; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 141; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 152 e uma sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131; em que o anticorpo anti-PD-1 tem uma IC50 de bloqueio de PD-L1 de cerca de 1000 ng/mL ou inferior, ou cerca de 800 ng/mL ou inferior, ou cerca de 600 ng/mL ou inferior, ou cerca de 500 ng/mL ou inferior, ou cerca de 400 ng/mL ou inferior, ou cerca de 300 ng/mL ou inferior, ou cerca de 200 ng/mL ou inferior, ou cerca de 100 ng/mL ou inferior, ou cerca de 60 ng/mL ou

inferior, ou cerca de 30 ng/mL ou inferior, ou cerca de 25 ng/mL ou inferior, ou cerca de 20 ng/mL ou inferior, ou cerca de 10 ng/mL ou inferior, como medido por ELISA ou FACS. Em uma outra modalidade, o anticorpo anti-PD-1 aqui fornecido é um anticorpo humanizado com uma sequência de aminoácidos de região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 133 e um aminoácido da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 143; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 141; ou com uma sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 152 e uma sequência de aminoácido da região variável da cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131; em que o anticorpo anti-PD-1 tem uma afinidade para PD-1 de cerca de 1 nM ou inferior, ou cerca de 0,5 nM ou inferior, ou cerca de 0,1 nM ou inferior, ou cerca de 0,05 nM ou inferior. Em uma modalidade particular, o anticorpo anti-PD-1 humanizado tem uma afinidade para PD-1 de cerca de 0,1 nM.

[0035] Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos fornecem ligação a PD-1 em células T, interrompendo a interação PD-1/PD-L1 e resultando em um aumento na ativação de células T. Em uma outra modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos ligam-se a PD-1 e resultam em um aumento na proliferação de células T e/ou na produção de citocinas. Em uma outra modalidade adicional, os anticorpos e fragmentos dos mesmos ligam PD-1 e resultam em um aumento de uma ou mais citocinas selecionadas do grupo que consiste em IL-2, IFN γ , TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17 e GM-CSF. Assim, em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para modular uma

resposta imune que compreende o contato das células T com o anticorpo anti-PD-1 ou fragmento do mesmo. Em uma modalidade, a modulação de uma resposta imune pelos anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos aqui fornecidos podem ser medidos em uma reação de linfócitos misturados (MLR). Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos aumentam o nível de produção de citocinas a partir de linfócitos em um MLR. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 aumentam o nível de produção de IL-2 e/ou produção de IFN γ em um MLR. Em ainda outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 aumentam o nível de produção de IL-2 e produção de IFN γ em um MLR. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 potencializam as respostas de células T de memória. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 potencializam as respostas de células T de memória tal como medido por um aumento da produção de IFN γ a partir de células T de memória.

[0036] Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos inibem a função de células T reguladoras. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos inibem a supressão de células T efetoras por células T reguladoras. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos restauram as funções efetoras das células T na presença de células T reguladoras. Em uma outra modalidade os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos restauram a capacidade das células T efetoras de proliferar e/ou produzir citocinas na presença de células T reguladoras. Assim, em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para inibir os efeitos supressores de células T reguladoras in vitro ou em um sujeito em necessidade do mesmo.

[0037] Em um aspecto, um anticorpo isolado ou fragmento dos mesmos que se liga a PD-1 é fornecido, em que o anticorpo é produzido por um hibridoma selecionado a partir do grupo que consiste nos hibridomas aqui designados 10D1, 4C10, 7D3, 13F1, 15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8, 7A4, e 7A4D. Assim, a presente invenção também engloba os hibridomas 10D1, 4C10, 7D3, 13F1, 15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8, 7A4, e 7A4D, bem como qualquer hibridoma que produz um anticorpo aqui divulgado. A presente invenção também fornece polinucleotídeos isolados que codificam os anticorpos e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos. Os vetores de expressão compreendendo os polinucleotídeos isolados, e as células hospedeiras compreendendo tais vetores de expressão, são também abrangidos na invenção.

[0038] Em uma modalidade, a presente invenção proporciona anticorpos anti-PD-1 imunoconjugados. Assim, a presente invenção fornece um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a PD-1 e que está ligado ou conjugado a um agente terapêutico. Os agentes terapêuticos que podem estar ligados ou conjugados com o anticorpo anti-PD-1 podem incluir, mas não estão limitados a, drogas citotóxicas, isótopos radioativos, imunomoduladores ou anticorpos.

[0039] Em um aspecto, a presente invenção fornece composições que compreendem um ou mais anti-PD-1 ou fragmento do mesmo de anticorpo aqui fornecido, e um carreador farmacologicamente aceitável.

[0040] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para modular uma resposta imune em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento aqui fornecido. Em uma modalidade, a presente invenção fornece

métodos para o tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento do mesmo aqui fornecido.

[0041] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para melhorar as respostas antitumorais em um sujeito em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento da invenção. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um método para a redução de tumores ou para inibir o crescimento de células tumorais em um sujeito em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento da invenção. Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece um método para o tratamento de câncer em um sujeito com necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento da invenção. Em uma outra modalidade, o câncer é selecionado do grupo que consiste em linfoma, leucemia, melanoma, glioma, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer dos ossos, câncer de ovário, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer retal, câncer testicular, câncer salivar, câncer da tireoide, câncer de timo, câncer epitelial, cabeça ou pescoço do câncer, câncer gástrico, câncer do pâncreas, ou uma combinação dos mesmos.

[0042] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar uma doença infecciosa em um sujeito em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao sujeito

de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento da invenção. Em uma outra modalidade, a doença infecciosa é selecionada a partir do grupo que consiste em candidíase, candidemia, aspergilose, pneumonia estreptocócica, pele estreptocócica e condições de orofaringe, sepsia gram, tuberculose, mononucleose, influenza, doença respiratória negativa causada por Vírus Sincicial Respiratório, malária, esquistossomose e tripanossomíase.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0043] As **Figuras 1A e 1B representam** um gráfico mostrando o bloqueio do ligando PD-1 PD-L1 e PD-L2 ligando-se a PD-1 por anticorpos anti-PD-1 murinos como medido por FACS. A **Figura 1A** mostra o bloqueio da ligação de PD-L1 por anticorpos anti-PD-1 murinos e a **Figura 1B** mostra o bloqueio da ligação de PD-L2 por anticorpos anti-PD-1 murinos. Os painéis de topo de **Figura 1A e Figura 1B** mostram o MFI ao longo de um intervalo de concentrações de anticorpos. A IC50 de bloqueio para os anticorpos anti-PD-1 é mostrado nos painéis inferiores da **Figura 1A e Figura 1B**.

[0044] A **Figura 2** é um gráfico mostrando a produção de IL-2 (pg/mL) em um MLR em resposta a diferentes concentrações de anticorpos anti-PD-1 murinos. Os anticorpos anti-PD-1 testados foram, da esquerda para a direita, mIgG1 de controle, 22A5-mIgG1, 6E1-mIgG1, 10D1-mIgG1, 4C10-mIgG1, 7D3-mIgG1, 13F1-mIgG1, 14A6-mIgG1, 15H5-mIgG1, 5A8-mIgG1, e 7A4-mIgG1. Como se mostra no eixo-x, cada anticorpo foi testado em 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,002 µg/mL.

[0045] A **Figura 3** é um gráfico mostrando a produção de IFN-γ (pg/mL) em um MLR em resposta a diferentes concentrações de anticorpos anti-PD-1 murinos. Os anticorpos anti-PD-1 testados

foram, da esquerda para a direita, mIgG1 de controle, 22A5-mIgG1, 6E1-mIgG1, 10D1-mIgG1, 4C10-mIgG1, 7D3-mIgG1, 13F1-mIgG1, 14A6-mIgG1, 15H5-mIgG1, 5A8-mIgG1, e 7A4-mIgG1. Como se mostra no eixo-x, cada anticorpo foi testado em 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,002 µg/mL.

[0046] A **Figura 4** é um gráfico mostrando a produção de IL-2 (pg/mL) em um MLR em resposta a diferentes concentrações de anticorpos anti-PD-1 quiméricos. Os anticorpos anti-PD-1 quimérico testados foram, da esquerda para a direita, hIgG4 de controle, 4C10-hIgG4 quimérico, 6E1-hIgG4 quimérico, 7A4-hIgG4 quimérico, 13F1-hIgG4 quimérico, 15H5-hIgG4 quimérico, 22A5-hIgG4 quimérico e 7D3-hIgG4 quimérico. Como se mostra no eixo-x, cada anticorpo foi testado em 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,002 µg/mL.

[0047] A **Figura 5** é um gráfico mostrando a produção de IL-2 (pg/mL) em um MLR em resposta a diferentes concentrações de anticorpos anti-PD-1 quiméricos. Os anticorpos anti-PD-1 quimérico testados foram, da esquerda para a direita, hIgG4 de controle, 4C10-hIgG4 quimérico, 6E1-hIgG4 quimérico, 7A4-hIgG4 quimérico, 13F1-hIgG4 quimérico, 15H5-hIgG4 quimérico, 22A5-hIgG4 quimérico e 7D3-hIgG4 quimérico. Como se mostra no eixo-x, cada anticorpo foi testado em 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL e 0,002 µg/mL.

[0048] A **Figura 6** mostra a EC50 de ligação de anticorpos anti-PD-1 13F1 humanizado (**Figura 6A**) e 7A4 humanizado (**Figura 6B**) como medido por ELISA. O painel superior da **Figura 6A** mostra a absorbância em um intervalo de concentrações de 13F1, 13F1-hIgG1 (h13F1-IgG1) humanizado, 13F1-hIgG4 humanizado (h13F1-IgG4), ou hIgG4 de controle. O painel inferior da **Figura 6A** mostra a EC50 calculada de cada um dos anticorpos de teste. O

painel superior da **Figura 6B** mostra a absorbância ao longo de um intervalo de concentrações de 7A4-hIgG1 quimérico, 7A4-hIgG4 quimérico, 784-hIgG1 humanizado (h7A4hIgG1), 7A4-hIgG4 humanizado (h7A4hIgG4) ou hIgG4 de controle. O painel inferior da **Figura 6B** mostra a EC50 calculada de cada um dos anticorpos de teste.

[0049] A **Figura 7** mostra a EC50 de ligação de anticorpos anti-PD-1 13F1 humanizado (**Figura 7A**) e 7A4 humanizado (**Figura 7B**) como medido por ELISA. O painel superior da **Figura 7A** mostra a intensidade de fluorescência média (MFI) em um intervalo de concentrações de hIgG4 de controle, 13F1-hIgG4 quimérico, 13F1-hIgG1 humanizado (h13F1-hIgG1) ou 13F1-hIgG4 humanizado (h13F1-hIgG4). O painel inferior da **Figura 7A** mostra a EC50 calculada de cada um dos anticorpos de teste. O painel superior da **Figura 7B** mostra o MFI em um intervalo de concentrações de hIgG4 de controle, 7A4-hIgG4 quimérico, 7A4-quimérico-IgG1 quimérico, 7A4-IgG4 humanizado (h7A4-hIgG4) ou 7A4-IgG1 humanizado (h7A4-hIgG1). O painel inferior da **Figura 7B** mostra a EC50 calculada de cada um dos anticorpos de teste.

[0050] A **Figura 8** mostra o bloqueio da ligação de PD-L1 por anticorpos anti-PD-1 13F1 humanizado (**Figura 8A**) e 7A4 humanizado (**Figura 8B**) como medido por ELISA. A **Figura 8A** mostra a absorbância em um intervalo de concentrações de hIgG4 de controle, 13F1 quimérico, 13F1-hIgG1 humanizado ou 13F1-hIgG4 humanizado. A **Figura 8B** mostra a absorbância em um intervalo de concentrações de hIgG4 de controle, 7A4-hIgG1 quimérico, 7A4-hIgG4 quimérico, 784-hIgG1 humanizado ou 7A4-hIgG4 humanizado. A **Figura 8C** mostra a IC50 de bloqueio de PD-L1 calculado dos anticorpos quiméricos e humanizados 13F1 e 7A4.

[0051] A **Figura 9** mostra o bloqueio da ligação de PD-L1 por anticorpos 13F1 e 7A4 humanizados como medido por FACS. O painel superior da **Figura 9** mostra o MFI ao longo de um intervalo de concentrações de anticorpos. A IC50 de bloqueio dos anticorpos humanizados são mostrados no painel inferior da **Figura 9**.

[0052] A **Figura 10** mostra os dados de ligação para os anticorpos monoclonais humanizados de PD-1 h13F1 (painel superior esquerdo) e h7A4 (painel superior direito), como medido pelo ensaio Biacore. O painel inferior fornece os dados de ligação quantificados como medido pelo ensaio Biacore.

[0053] A **Figura 11** é um gráfico que mostra a produção de IL-2 (pg/mL) em uma reação de MLR na presença de hIgG4 de controle, 13F1-mIgG1 murino(13F1-mIgG1), 13F1-hIgG1 humanizado, 13F1-hIgG4 humanizado ou 7A4-hIgG4 quimérico nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL, e 0,002 µg/mL.

[0054] A **Figura 12** é um gráfico mostrando a produção de IFN-γ (pg/mL) em uma reação de MLR na presença de hIgG4 de controle, 13F1-mIgG1 murino(13F1-mIgG1), 13F1-hIgG1 humanizado, 13F1-hIgG4 humanizado ou 7A4-hIgG4 quimérico nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL, e 0,002 µg/mL.

[0055] A **Figura 13** é um gráfico que mostra a produção de IL-2 (pg/mL) em uma reação de MLR na presença de hIgG4 de controle, 7A4-hIgG1 quimérico, 7A4-hIgG4 quimérico, 7A4-hIgG1 humanizado ou 7A4-hIgG4 humanizado nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL, e 0,002 µg/mL.

[0056] A **Figura 14** é um gráfico que mostra a produção de IFN-γ (pg/mL) em uma reação de MLR na presença de hIgG4 de controle, 7A4-hIgG1 quimérico, 7A4-hIgG4 quimérico, 7A4-hIgG1 humanizado ou 7A4-hIgG4 humanizado nas seguintes concentrações: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL, e 0,002 µg/mL.

[0057] A **Figura 15** mostra o efeito de anticorpos anti-PD-1 humanizados sobre as respostas de células T de memória retiradas pela toxina do tétano, medido pela produção de IFN- γ (pg/mL). Testaram-se os anticorpos hIgG4 de controle negativo, 13F1-hIgG1 humanizado, 13F1-hIgG4 humanizado, 7A4-hIgG1 humanizado e 7A4-hIgG4 humanizado, nas seguintes concentrações: 20 μ g/mL, 2 μ g/mL, 0,2 μ g/mL, 0,02 μ g/mL, e 0,002 μ g/mL.

[0058] A **Figura 16** mostra a produção de IFN- γ (pg/mL) a partir de células T em resposta a coestimulação com DCs autólogas e anticorpo anti-CD3, na presença de 10 μ g/ml de anticorpos anti-PD-1 humanizados (h13F1-hIgG1, h13F1-hIgG4, h7A4-hIgG1 ou h7A4-hIgG4), anticorpo de controle de isotipo (hIgG4), ou nenhum anticorpo.

[0059] A **Figuras 17A e 17B** mostram os dados de ligação com bases em Biacore (Figura 17A) e bloqueio com base em FACS (Figura 17B) para anticorpos monoclonais humanizados PD-1 h7A4 e h7A4D. Para a Figura 17A, a parte superior esquerda indica h7A4 e a parte superior direita indica 7A4D, e o painel de fundo da Figura 17A fornece os dados de ligação quantificados medidos pela análise de Biacore. A Figura 17B indica a IC50 de bloqueio da ligação de PD-L1 a células 293T-PD1 por anticorpo 7A4D-hIgG4.

[0060] A **Figura 18** é um gráfico que mostra a produção de IL-2 (pg/mL) em uma reação MLR na presença de hIgG4 de controle, 7A4-hIgG4 humanizado ou 7A4D-hIgG4 humanizado nas seguintes concentrações: 20 μ g/mL, 2 μ g/mL, 0,2 μ g/mL, 0,02 μ g/mL, e 0,002 μ g/mL.

[0061] A **Figura 19** é um gráfico que mostra a produção de IFN- γ (pg/mL) em uma reação de MLR na presença de hIgG4 de controle, 7A4-hIgG4 humanizado ou 7A4D-hIgG4 humanizado nas seguintes

concentrações: 20 µg/mL, 2 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,02 µg/mL, e 0,002 µg/mL.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0062] O receptor de morte programada 1 (PD-1) é um receptor de ponto de verificação do sistema imunológico. É principalmente expressa em células T e B ativadas, mas também ocorre em monócitos e células T negativas duplas CD4-CD8- e células NK-T sob desenvolvimento tímico (Agata et al., Supra, Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170: 711-8). PD-1 tem dois ligandos, PD-L1 e PD-L2. Verificou-se que a interação de PD-1 com qualquer dos dois ligandos atenua as respostas das células T in vitro e in vivo, o que pode, no entanto, ser invertido pela inibição da interação local de PD-1 com PD-L1 e o efeito é aditivo quando a interação de PD-1 com PD-L2 é bloqueada também (Iwai et al. (2002) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA 99: 12293-7; Brown et al. (2003) J. Immunol. 170: 1257-1266).

[0063] Verificou-se que o PD-1 tem uma correlação com o crescimento e desenvolvimento do câncer devido ao seu papel na proteção das células tumorais contra a destruição eficaz do sistema imunológica. O seu ligando, PD-L1, revelou ter uma expressão significativa em vários tumores de murganhos e humanos, que se postula para mediar a evasão imunológica (Iwai, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 99: 12293-12297 (2002); Strome S. E. et al., Cancer Res. 63: 6501-6. 505 (2003); Dong et al. (2002) Nat. Med. 8: 787-9). Nos seres humanos, a expressão de PD-1 (em linfócitos infiltrantes de tumores) e/ou PD-L1 (em células tumorais) foi encontrada em várias biópsias de tumor primário como avaliado por imuno-histoquímica. Tais tecidos incluem câncer de pulmão, de fígado, de ovário, de colo

do útero, de pele, de cólon, de glioma, de bexiga, de mama, de rim, de esôfago, de estômago, de célula escamosa oral, de célula urotelial e de pâncreas, bem como tumores da cabeça e pescoço (Brown J. A. et al., J. Immunol. 170: 1257-1266 (2003); Dong H. et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Wintterle et al., Cancer Res. 63: 7462-7467 (2003); Strome S. E. et al., Cancer Res. 63: 6501 -6505 (2003); Thompson R. H. et al., Cancer Res. 66: 3381-5(2006); Thompson et al., Clin. Cancer Res. 13: 1757-61(2007); Nomi T. et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-7. (2007)). Mais surpreendentemente, a expressão do ligando PD-1 em células tumorais tem sido correlacionada com o mau prognóstico de doentes com câncer em múltiplos tipos de tumores (revisto em OkaZaki e Honjo, Int. Immunol. 19: 813-824 (2007)).

[0064] Embora a interação entre PD-1 e PD-L1 resulte em uma diminuição dos linfócitos infiltrados no tumor, uma diminuição na proliferação mediada pelo receptor de células T e uma evasão imune pelas células cancerosas (Dong et al. (2003) J. Mol. Med. 81: 281-7; Blank et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54: 307-314; Konishi et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10: 5094-100), bloqueio da interação PD-1/PD-L1 foi consequentemente mostrado para aumentar a imunidade das células T específicas do tumor e ser útil na depuração de células tumorais pelo sistema imunológico. Em um modelo murino de câncer pancreático agressivo, por exemplo, Nomi T., et al. (Clin. Cancer Res. 13: 2151-2157, 2007) demonstraram a eficácia terapêutica de bloqueio de PD-1/PD-L1. A administração de qualquer dos anticorpos dirigidos por PD-1 ou PD-L1 inibiu significativamente o crescimento do tumor. O bloqueio de anticorpos promoveu eficazmente a infiltração de células T CD8 + reativas ao tumor no tumor resultando na regulação positiva de efetores antitumorais

incluindo IFN- γ , granzima B e perforina. Adicionalmente, os autores mostraram que o bloqueio de PD-1 pode ser eficazmente combinado com quimioterapia para produzir um efeito sinérgico. Em um outro estudo, utilizando um modelo de carcinoma de células escamosas em camundongos, o bloqueio de anticorpos de PD-1 ou PD-L1 inibiu significativamente o crescimento tumoral (Tsushima F. et al., Oral Oncol. 42: 268-274 (2006)).

[0065] Além disso, a transfecção de uma linhagem de mastocitoma murino com PD-L1 conduziu à diminuição da lise das células tumorais quando cocultivadas com um clone de CTL específico de tumor. A lise foi restaurada quando foi adicionado mAb anti-PD-L1 (Iwai Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 99: 12293-12297 (2002)). In vivo, mostrou-se que o bloqueio da interação de PD-1/PD-L1 aumenta a eficácia da terapia de transferência de células T adotivas em um modelo de tumor de camundongo (Strome S. E. et al., Cancer Res. 63: 6501-6505 (2003)). Outras evidências do papel de PD-1 no tratamento do câncer provêm de experiências realizadas com camundongos knockout PD-1. As células de mieloma que expressam PD-L1 cresceram apenas em animais de tipo selvagem (resultando em crescimento de tumor e morte animal associada), mas não em camundongos deficientes em PD-1 (Iwai Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 99: 12293-12297(2002)). Em human studies, R. M. Wong et al. (Int. Immunol. 19: 1223-1234 (2007)) mostraram que o bloqueio de PD-1 utilizando um anticorpo anti-PD-1 totalmente humano aumentou o número absoluto de células T CD8 + específicas de tumor (CTLs) em ensaios de estimulação ex vivo utilizando antígenos de vacina e células de indivíduos vacinados. Em um estudo semelhante, o bloqueio de anticorpos de PD-L1 resultou em uma atividade citolítica aumentada de células T citotóxicas

específicas de antígeno associadas a tumor e aumento da produção de citocinas por células TH específicas de tumor (Blank C. et al., Int. J. Cancer 119: 317-327 (2006)). Os mesmos autores mostraram que o bloqueio PD-L1 aumenta as respostas de células T específicas do tumor in vitro, quando usado em combinação com o bloqueio anti-CTLA-4. Em geral, a via PD-1/PD-L1 é um alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos de anticorpos para tratamento de câncer. Os anticorpos anti-PD-1 pode também ser úteis na infecção viral crônica. As células T CD8 + de memória geradas após uma infecção viral aguda são altamente funcionais e constituem um componente importante da imunidade protetora. Em contraste, as infecções crônicas são frequentemente caracterizadas por diferentes graus de comprometimento funcional (exaustão) de respostas de células T específicas de vírus, e este defeito é uma razão principal para a incapacidade do hospedeiro de eliminar o patógeno persistente. Embora células T efetoras funcionais sejam inicialmente geradas durante os estágios iniciais da infecção, elas gradualmente perdem função durante o curso de uma infecção crônica. Barber et al. (Barber et al., Nature 439: 682-687 (2006)) mostrou que os camundongos infectados com uma cepa laboratorial de LCMV desenvolveram infecção crônica resultando em níveis elevados de vírus no sangue e outros tecidos. Estes camundongos desenvolveram inicialmente uma resposta robusta de células T, mas acabaram por sucumbir à infecção após a exaustão de células T. Os autores descobriram que a diminuição do número e da função das células T efetoras em camundongos infectados cronicamente poderia ser revertida injetando um anticorpo que bloqueasse a interação entre PD-1 e PD-L1.

[0066] Em um aspecto, a presente invenção fornece anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à célula de morte programada 1 (PD-1). PD-1. Em uma modalidade, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos se ligam a PD-1 humana. Em uma outra modalidade, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos ligam-se a PD-1 humana e cinomóloga. Em uma outra modalidade, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos bloqueiam a interação de PD-1 em células T com o seu ligando PD-L1. Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para produzir e utilizar os anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos dos mesmos e composições compreendendo anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos dos mesmos, incluindo composições farmacêuticas.

[0067] Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína de ligação tendo domínio de ligação de pelo menos um antígeno. Os anticorpos e os fragmentos dos mesmos da presente invenção podem ser anticorpos completos ou qualquer fragmento dos mesmos. Assim, os anticorpos e fragmentos da presente invenção incluem anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos e variantes de anticorpos ou fragmentos dos mesmos, bem como imunoconjugados. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)', fragmentos Fv, regiões CDR isoladas, moléculas Fv de cadeia simples (scFv) e outros fragmentos de anticorpo conhecidos na técnica. Anticorpos e fragmentos dos mesmos podem também incluir polipeptídeos recombinantes, proteínas de fusão e anticorpos bi-específicos. Os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui descritos podem ser de um isotipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. O termo "isotipo" refere-se à classe de anticorpo codificado pelos genes da região constante da cadeia pesada. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e seus fragmentos aqui

descritos são de um isotipo IgG1 ou IgG4. Os anticorpos PD-1 e os fragmentos dos mesmos da presente invenção podem ser derivados de qualquer espécie incluindo, mas não se limitando a, camundongo, rato, coelho, primata, lama e humano. Os anticorpos PD-1 e os seus fragmentos podem ser anticorpos quiméricos, humanizados ou totalmente humanos. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 são anticorpos murinos. Em uma outra modalidade, os anticorpos anti-PD1 são anticorpos quiméricos. Em ainda uma outra modalidade, os anticorpos quiméricos são anticorpos quiméricos camundongos-humano. Em uma outra modalidade, os anticorpos são derivados de camundongos e estão humanizados.

[0068] Um "anticorpo quimérico" é um anticorpo que possui pelo menos uma porção da região variável da cadeia pesada e, pelo menos, uma porção da região variável da cadeia leve derivada de uma espécie; e pelo menos uma porção de uma região constante derivada de uma outra espécie. Por exemplo, em uma modalidade, um anticorpo quimérico pode compreender regiões variáveis murinas e uma região constante humana.

[0069] Um "anticorpo humanizado" é um anticorpo contendo as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) que são derivadas de um anticorpo não humano; e regiões de estrutura, bem como regiões constantes que são derivadas de um anticorpo humano. Por exemplo, os anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos podem compreender CDRs derivadas de um ou mais anticorpos de murino e de estrutura humana e regiões constantes. Assim, em uma modalidade, o anticorpo humanizado aqui fornecido liga-se ao mesmo epítipo em PD-1 como o anticorpo murino a partir do qual as CDRs do anticorpo são derivadas. Exemplos de anticorpos humanizados são aqui fornecidos. Podem ser produzidos anticorpos

anti-PD-1 adicionais compreendendo as CDRs de cadeia pesada e leve aqui fornecidas, ou variantes das mesmas, utilizando qualquer sequência estrutural humana e estão também abrangidos na presente invenção. Em uma modalidade, a estrutura de sequências de comando adequadas para utilização na presente invenção incluem aquelas sequências estruturais que são estruturalmente semelhantes às sequências estruturais aqui fornecidas. Outras modificações nas regiões estruturais podem ser feitas para melhorar as propriedades dos anticorpos aqui fornecidos. Tais modificações estruturais adicionais podem incluir modificações químicas; mutações pontuais para reduzir a imunogenicidade ou remover epítomos de células T; ou de volta para o resíduo na sequência germinativa original.

[0070] Em algumas modalidades, as modificações estruturais incluem aquelas que correspondem às mutações aqui exemplificadas, incluindo retromutações para a sequência da linhagem germinativa. Por exemplo, em uma modalidade, um ou mais aminoácidos nas regiões estruturais humanas do VH e/ou VL dos anticorpos humanizados aqui fornecidos são retromutados ao aminoácido correspondente no anticorpo murino progenitor. Como exemplo, como para VH e VL de 7A4 e 13F1, vários sítios de aminoácidos estruturais do anticorpo humano modelo acima mencionado foram retromutados às sequências de aminoácidos correspondentes nos anticorpos 7A4 e 13F1 de camundongo. Em uma modalidade, o aminoácido nas posições 40 e/ou 45 e/ou 70 e/ou 72 da região variável da cadeia leve é retromutado ao aminoácido correspondente encontrado naquela posição na região variável da cadeia leve 7A4 ou 13F1 do camundongo. Em uma outra modalidade, o aminoácido nas posições 2 e/ou 26 e/ou 46 e/ou 48 e/ou 49 e/ou 67 e/ou 70 e/ou 71 da região variável da cadeia pesada sofre uma

retromutação ao aminoácido correspondente encontrado na referida posição na região variável da cadeia pesada 7A4 ou 13F1 do camundongo. Em uma modalidade, o anticorpo 7A4 humanizado compreende uma região variável da cadeia leve em que o aminoácido na posição 40 é mutado de Tyr (Y) para Phe (F) e o aminoácido na posição 72 é mutado de Gly (G) para Arg (R); e uma região variável de cadeia pesada em que o aminoácido na posição 2 é mutado de Val (V) para Ile (I), o aminoácido na posição 46 é mutado de Glu (E) para Lys (K) e o aminoácido na posição 70 é mutado de Phe (F) para Ile (I). Em uma modalidade, o anticorpo 13F1 humanizado compreende uma região variável da cadeia leve em que o aminoácido na posição 45 é mutado de Leu (L) para Pro (P) e o aminoácido na posição 70 é mutado de Phe (F) para Tyr (Y); e uma região variável de cadeia pesada em que o aminoácido na posição 26 é mutado de Gly (G) para Tyr (Y), o aminoácido na posição 48 é mutado de Ile (I) para Met (M), o aminoácido na posição 49 é mutado de Gly (G) para Ala (A), o aminoácido na posição 67 é mutado de Val (V) para Ile (I) e o aminoácido na posição 71 é mutado de Val (V) para Arg (R). Podem ser feitas mutações secundárias adicionais ou alternativas nas regiões estruturais dos anticorpos humanizados aqui fornecidos para melhorar as propriedades dos anticorpos.

[0071] A presente invenção também abrange anticorpos humanizados que se ligam a PD-1 e compreendem modificações estruturais correspondentes às modificações exemplificativas aqui descritos, em relação a qualquer sequência estrutural adequada, bem como outras modificações estruturais que de outro modo melhoram as propriedades dos anticorpos. Por exemplo, em algumas modalidades, os anticorpos aqui fornecidos compreendem uma ou mais mutações para remover um ou mais locais de

desamidação ou um ou mais sítios de oxidação. Por exemplo, em uma modalidade, os anticorpos aqui fornecidos compreendem uma mutação de um ou mais resíduos de asparagina para remover um ou mais sítios de desamidação; e/ou mutação de um ou mais resíduos de metionina para remover um ou mais sítios de oxidação.

[0072] Em outras modalidades, os anticorpos aqui fornecidos compreendem uma ou mais mutações para melhorar a estabilidade, melhorar a solubilidade, alterar a glicosilação e/ou reduzir a imunogenicidade, tal como, por exemplo, por alterações de aminoácidos alvo que reduzem a desamidação ou oxidação, reduzem a isomerização, o núcleo hidrofóbico e/ou os resíduos do agregado de carga, removem os resíduos superficiais hidrofóbicos, otimizam os resíduos envolvidos na interface entre as cadeias leves variáveis e pesadas variáveis, e/ou modificam o ponto isoelétrico.

[0073] Tal como aqui utilizado, o termo "derivado", quando utilizado para se referir a uma molécula ou polipeptídeo em relação a um anticorpo de referência ou outra proteína de ligação, significa uma molécula ou polipeptídeo que é capaz de se ligar com especificidade ao mesmo epítipo que o anticorpo de referência ou outra proteína de ligação.

[0074] Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno aqui divulgados são específicos para a PD-1. Em uma modalidade, os anticorpos e os fragmentos dos mesmos são específicos para a PD-1 humana. Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos aqui fornecidos ligam-se a PD-1 humana ou primária, mas não a PD-1 de qualquer outro mamífero. Em uma outra modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos não se ligam a PD-1 do camundongo. Os termos "PD-1 humano", "hPD-1" e "huPD-1" e semelhantes são aqui utilizados permutavelmente e referem-se a PD-1 humana e

variantes ou isoformas de PD-1 humana. Por "específico para" entende-se que os anticorpos e fragmentos dos mesmos ligam o receptor de PD-1 com maior afinidade do que qualquer outro alvo. Em uma modalidade, os anticorpos PD-1 e os fragmentos aqui fornecidos são específicos para PD-1 e não reagem de forma cruzada com CTLA4, ICOS ou CD28. Tal como aqui utilizado, o termo "EC50" refere-se à concentração eficaz, 50% da resposta máxima do anticorpo. Tal como aqui utilizado, o termo "IC50" refere-se à concentração inibidora, 50% de resposta máxima do anticorpo. Tanto EC50 como IC50 podem ser medidas por análise ELISA ou FACS, ou qualquer outro método conhecido na técnica.

[0075] Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD1 e fragmento ou variantes dos mesmos têm uma afinidade (KD) para a PD-1 no intervalo de cerca de 0,001 nM a cerca de 100 nM, cerca de 0,002 nM a cerca de 50 nM, de cerca de 0,005 nM a cerca de 5 nM, cerca de 0,01 nM a cerca de 1 nM, ou cerca de 0,05 nM a cerca de 0,1 nM. Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos, têm uma afinidade (KD) para a PD-1 de cerca de 50 nM ou inferior, cerca de 25 nM ou inferior, cerca de 20 nM ou inferior, cerca de 15 nM ou inferior, cerca de 10 nM ou inferior, cerca de 8 nM ou inferior, cerca de 6 nM ou inferior, cerca de 4 nM ou inferior, cerca de 2 nM ou inferior, cerca de 1 nM ou inferior, cerca de 0,9 nM ou inferior, cerca de 0,8 nM ou inferior, cerca de 0,7 nM ou inferior, cerca de 0,6 nM ou inferior, cerca de 0,5 nM ou inferior, cerca de 0,4 nM ou inferior, cerca de 0,3 nM ou inferior, cerca de 0,2 nM ou inferior, cerca de 0,1 nM ou inferior, cerca de 0,09 nM ou inferior, cerca de 0,08 nM ou inferior, cerca de 0,07 nM ou inferior, cerca de 0,06 nM ou inferior, cerca de 0,05 nM ou inferior, cerca de 0,04 nM ou inferior, cerca de 0,03 nM ou

inferior, cerca de 0,02 nM ou inferior, cerca de 0,01 nM ou inferior, cerca de 0,009 nM ou inferior, cerca de 0,008 nM ou inferior, cerca de 0,007 nM ou inferior, cerca de 0,006 nM ou inferior, cerca de 0,005 nM ou inferior, cerca de 0,004 nM ou inferior, cerca de 0,003 nM ou inferior, cerca de 0,002 nM ou inferior, ou cerca de 0,001 nM ou inferior. Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos, têm uma afinidade (KD) para a PD-1 de cerca de 10 nM, cerca de 9 nM, de cerca de 8 nM, cerca de 7 nM, cerca de 6 nM, cerca de 5 nM, de cerca de 4 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2 nM, aproximadamente 1 nM, de cerca de 0,9 nM, cerca de 0,8 nM, de cerca de 0,7 nM, de cerca de 0,6 nM, cerca de 0,5 nM, de cerca de 0,4 nM, de cerca de 0,3 nM, de cerca de 0,2 nM, cerca de 0,1 nM, cerca de 0,09 nM, cerca de 0,08 nM, cerca de 0,07 nM, cerca de 0,06 nM, cerca de 0,05 nM, cerca de 0,04 nM, cerca de 0,03 nM, cerca de 0,02 nM, cerca de 0,01 nM, cerca de 0,009 nM, cerca de 0,008 nM, cerca de 0,007 nM, cerca de 0,006 nM, cerca de 0,005 nM, cerca de 0,004 nM, cerca de 0,003 nM, cerca de 0,002 nM, ou cerca de 0,001.

[0076] Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos aqui fornecidos compreendem uma cadeia leve e uma cadeia pesada, cada uma das quais compreende três regiões CDR. Exemplos de sequências de CDR de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) para a PD-1 de anticorpos da invenção são fornecidos abaixo na **Tabela 1**. Exemplos de sequências de CDR da cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) para os anticorpos PD-1 da invenção são fornecidos abaixo na **Tabela 2**. Exemplos de regiões variáveis e sequências de anticorpo completas para os anticorpos PD-1 da invenção são fornecidos a seguir na **Tabela 3**.

Tabela 1. Sequências de CDR da cadeia leve

Nome	LCDR	SEQ ID NO	Sequência
10D1	1	24	RASQSIENNHL
	2	25	YASQSI
	3	26	QQSNWPLT
4C10	1	34	KASQSVDDVA
	2	35	YAFNRYT
	3	36	QQDYRSPWT
7D3	1	45	RASQSIENLH
	2	46	YVSQSI
	3	47	QQSDSWPLT
13F1	1	55	RANSSVSSMH
	2	56	AIENLAF
	3	57	QQWSSRPPT
15H5	1	65	HASQSINVWLS
	2	66	ASNLHT
	3	67	QQGQSYPT
14A6	1	75	RANSSVSSMH
	2	76	AIENLAF

	3	77	QQWNSRPPT
22A5	1	85	KASQDVDNAVA
	2	86	WASTRHH
	3	87	QQYSTFPYT
6E1	1	95	RASQSLSNNLH
	2	96	YASQSIG
	3	97	QQSNSWPLT
5A8	1	105	KASQSVSNDVA
	2	106	YAFTRYI
	3	107	QQDYSSPYT
7A4	1	115	RASESVDNYGYSEMN
	2	116	RASNLES
	3	117	QQSNADPT

Tabela 2. Sequências de CDR da cadeia pesada

Nome	HCDR	SEQ ID NO	Sequência
10D1	1	19	SYGMS
	2	20	TMSGGGRDIYYPDSMKG

	3	21	QYYDDWFAY
4C10	1	29	TYGVH
	2	30	VIWSGGSTDYNAAFIS
	3	31	EKSVYGNIVGAMDY
7D3	1	40	SYGMS
	2	41	TISGGGRDIYYPDSVKG
	3	42	QYYDDWFAY
13F1	1	50	SDYAWN
	2	51	YISYSGYTSYNPSLKS
	3	52	SLDYDYGTMDY
15H5	1	60	SYDMS
	2	61	TISGGGSYTTYQDSVKG
	3	62	PYGPYFDY
14A6	1	70	SDYAWN
	2	71	YISYSGYTSYNPSLKS
	3	72	SLDYDYGTMDY
22A5	1	80	YYDMS
	2	81	TISGGGRNTYFIDSVKG

	3	82	PYEGAVDF
6E1	1	90	SYGMS
	2	91	TISGGGRDTYYLDSVKG
	3	92	QYYDDWFAY
5A8	1	100	NNWIG
	2	101	DFYPGGGYTNYNEKFKG
	3	102	GYGTNYWYFDV
7A4	1	110	NFGMN
	2	111	WISGYTREPTYAADFKG
	3	112	DVFDY

Tabela 3. Sequências da região variável da cadeia leve e da cadeia pesada e sequências de anticorpos completas

Nome	Região ¹	SEQ ID NO	Sequência
10D1 murino	Variável da cadeia leve	23	DIVLTQTPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNNLH WYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPSRFSGSGSG TDFTLNINSVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGT KLELKR
10D1 murino	Variável da cadeia pesada	18	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYG MSWLRQTPEKRLIEWVATMSGGGRDIYYPD SMK G RFTISRDN AKNNLYLQMSSLRSEDTALYYCARQY YDDWFAYWGQGTLVTVSA

4C10 murino	Variável da cadeia leve	33	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVSDDVA WYQQKPGQSPKLLIYYAFNRYTGVPDRFTGSGY GTDFTFTISTVQSEDLAVYFCQQDYRSPWTFGGG TKLEIKR
4C10 murino	Variável da cadeia pesada	28	QVQLKQSGPGLVQPSQNLSTCTVSGFSLTTYG VHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGSTDYNAAFISR LTISKDNARSQVFFKMNSLQVNDTAMYYCAREKS VYGNYVGAMDYWGQGSTVTVSS
7D3 murino	Variável da cadeia leve	44	DIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNDLH WYQQKSHESPRLLIKYVSQSSISGIPSRFSGSGSG TDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSDSWPLTFGAGT KLEIKR
7D3 murino	Variável da cadeia pesada	39	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCGASGFTFSSYG MSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRDIYYPDSVKG RLTISRDNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYCVRQY YDDWFAYWGQGTTLVTVSA
13F1 murino	Variável da cadeia leve	54	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRANSSVSSMHW YQQKPGSSPEPWIYAISNLAFGVPTRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYFCQQWSSRPPTFGGGTK LEIKR
13F1 murino	Variável da cadeia pesada	49	DVQLQESGPGLVKPSQSLSTCTVTGYSITSDYA WNWIRQFPGNQLEWMAYISYSGYTSYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARSLDY DYGTMDDYWGQGSTVTVSS
15H5 murino	Variável da cadeia leve	64	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQSINWLS WYQQKPGNIPKLLIYRASNLHTGVPSRFSGSGSG TGFTLTISSLQPDDIATYYCQQGQSYPWTFGGGT KLEIKR
15H5 murino	Variável da cadeia	59	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFRSYD MSWVRQTPEKILEWVATISGGGSYTTYQDSVKG RFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCASP

	pesada		GPYFDYWGGQTTLTVSS
14A6 murino	Variável da cadeia leve	74	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRANSSVSSMHW YQQKPGSSPEPWIYAINLAFGVPARFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYFCQQWNSRPPTFGGGTK LEIKR
14A6 murino	Variável da cadeia pesada	69	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYA WNWIRQFPGNQLEWMAYISYSGYTSYNPSLKSRI SITRDTSRNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARSLDY DYGTM DYWGQGT SVTVSS
22A5 murino	Variável da cadeia leve	84	DIVMTQSHKVMSTSVGDRVSITCKASQDVDNAVA WYQQNPGQSPKLLIKWASTRHHGVDPDRFTGSGS GTDFTLTISTVQSEDLADFFCQQYSTFPYTFGGG TKLEIKR
22A5 murino	Variável da cadeia pesada	79	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCSASGFSFSYYD MSWVRQTPEKGLEWVATISGGGRNTYFIDSVKG RFTISRDNVKNLYLLMSSLRSEDALYYCASP YEGAVDFWGGQGT SVTVSS
6E1 murino	Variável da cadeia leve	94	DIVLTQTPATLSVTPGDSVSLSCRASQSLSNLH WYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSG TDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSNSWPLTFGAGT KLEMKR
6E1 murino	Variável da cadeia pesada	89	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYG MSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRDYYLDSVKG RFTISRDNKNNLYLQMSSLRSEDALYYCVRQY YDDWFAYWGQGT LVNSA
5A8 murino	Variável da cadeia leve	104	NIVMTQTPKILFISAGDRVTITCKASQSVSNDVAW YQQKPGQSPKLLIYYAFTRYIGVPDRFTGSGYGT DFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGK LEIKR
5A8 murino	Variável da cadeia	99	QVQLQQSGDELVRPGTSVKMSCKAAGYTFTNNW IGWVKQRPGHGLEWIGDFYPGGGYTNYNEKFKG KATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARGY

	pesada		GTNYWYFDVWGAGTTVTVSS
7A4 murine	Variável da cadeia leve	114	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGY SFMNWFQQKPGQPPKLLIYRASNLSEGPARGSG SGSRTNFTLTINPVEADDVATYFCQQSNADPTFG GGTNLEIKRA
7A4 murine	Variável da cadeia pesada	109	QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGM NWKQAPGKGLKWMGWISGYTREPTYAADFKGR FAISLETSASTAYLQINDLKNEEDMATYFCARDVFD YWGQGTTLTVSS
7A4 quimérico	IgG1 da cadeia pesada de comprimento total	119	QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWKQAPGKGLKW MGWISGYTREPTYAADFKGRFAISLETSASTAYLQINDLKNEEDMATYF CARDVFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
7A4 quimérico	IgG4 da cadeia pesada de comprimento total	121	QIHLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWKQAPGKGLKW MGWISGYTREPTYAADFKGRFAISLETSASTAYLQINDLKNEEDMATYF CARDVFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT PREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
7A4 quimérico	Cadeia leve de comprimento	123	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGY SFMNWFQQKPGQPPKLLIYRASNLSEGPARGSG SGSRTNFTLTINPVEADDVATYFCQQSN ADPTFGGGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR

	nto total		EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13F1 quimérico	IgG1 da cadeia pesada de comprime nto total	125	DVQLQESGPGVLKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNQLE WMAYISYSGYTSYNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYC ARSLDYDYGTM DYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPPEPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
13F1 quimérico	IgG4 da cadeia pesada de comprime nto total	127	DVQLQESGPGVLKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNQLE WMAYISYSGYTSYNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYC ARSLDYDYGTM DYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
13F1 quimérico	Cadeia leve de comprime nto total	129	QIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRANSSVSMHWYQQKPGSSPEPWI YAINLAFGVPTRFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYFCQQWSSRPP TFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7A4 humaniza- do	Variável da cadeia pesada	131	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTNFGMNWVRQAPGQGLK WMGWISGYTREPTYAADFKGRFVISLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARDVFDYWGGQTLTVSS
7A4	Variável	133	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESDNYGYFSFMNWFQKPGQP

humaniza- do	da cadeia leve		PKLLIYRASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEANDTANYYCQQS NADPTFGQGKLEIK
13F1 humaniza- do	Variável da cadeia pesada	141	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDYAWNWRQPPGKGLE WMAYISYSGYTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARSLDYDYGTMDYWGGGLTVTVSS
13F1 humaniza- do	Variável da cadeia leve	143	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRANSSVSMHWYQQKPGQSPEPWI YAINLAFGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSRPP TFGQGKLEIK
7A4 humaniza- do -IgG1 (D265A)	Cadeia pesada completa	135	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTNFGMNWVRQAPGQGLK WMGWISGYTREPTYAADFKGRFVISLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARDVFDYWGGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
7A4 humaniza- do - IgG4 (F234A / L235A)	Cadeia pesada completa	137	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTNFGMNWVRQAPGQGLK WMGWISGYTREPTYAADFKGRFVISLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARDVFDYWGGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLG
7A4 humaniza- do	Cadeia leve	139	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESDNYGYSFMNWFQKPGQP PKLLIYRASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEANDTANYYCQQS NADPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK

do	completa		HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13F1 humaniza- do -IgG1 (D265A)	Cadeia pesada completa	145	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSSDYAWNWRQPPGKGLE WMAYISYSGYTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARSLDYDYGTMDYWGGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13F1 humaniza- do - IgG4 (F234A / L235A)	Cadeia pesada completa	147	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSSDYAWNWRQPPGKGLE WMAYISYSGYTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARSLDYDYGTMDYWGGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG
13F1 humaniza- do	Cadeia leve completa	149	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRANSSVSMHWYQQKPGQSPEPWI YAINLAFGVPARFSGSGSDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSRPP TFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR VQWVKDNLQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Região constante de IgG1 humano	Mutação de D265A	150	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF

			FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Região constante de IgG4 humano	Mutação dupla de F234A e L235A	151	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
7A4D humaniza- do	Variável da cadeia leve	152	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESDNYGYFSFMNWFQKPGQP PKLLIYRASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDTANYYCQQS NADPTFGQGKLEIK
7A4D humaniza- do	Cadeia leve completa	153	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESDNYGYFSFMNWFQKPGQP PKLLIYRASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDTANYYCQQS NADPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0077] Em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos anti-PD-1, que compreendem as CDRs da cadeia leve e CDRs da cadeia pesada de anticorpos 10D1, 4C10, 7D3, 13F1, 15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8 e/ou 7A4. O versado na técnica compreenderá que as CDRs da cadeia pesada e leve dos anticorpos aqui fornecidos podem ser selecionadas independentemente, ou misturadas e combinadas, para formar um anticorpo ou fragmento de ligação deste compreendendo qualquer CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve; e qualquer CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada a partir dos anticorpos aqui fornecidos. Deste modo, a invenção fornece anticorpos anti-PD-1 que compreendem uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 24, 34, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, e 115; uma CDR2 da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do

grupo que consiste em SEQ ID NOs: 25, 35, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, e 116; uma CDR3 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 26, 36, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107 e 117; uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 19, 29, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, e 110; uma CDR2 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 20, 30, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, e 111 e uma CDR3 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 21, 31, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 e 112. Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos anti-PD-1, compreendendo as regiões CDR da cadeia pesada e leve compreendendo as sequências de aminoácidos com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de homologia com a CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia leve ou pesada correspondente aqui fornecida. Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos anti-PD-1 compreendendo regiões de CDR da cadeia pesada e leve compreendendo sequências de aminoácidos com 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 substituições, deleções, ou inserções de aminoácido em relação a CDR1, CDR2 ou CDR3 da cadeia leve ou pesada correspondente aqui fornecida.

[0078] Em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos anti-PD-1, que compreendem uma cadeia leve variável de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em 10D1, 4C10, 7D3, 13F1,

15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8, 7A4 e 7A4D e uma cadeia pesada variável de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em 10D1, 4C10, 7D3, 13F1, 15H5, 14A6, 22A5, 6E1, 5A8, e 7A4. Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos aqui fornecidos compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de homologia com uma região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NOs: 23, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 133, 143 e 152. Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos aqui fornecidos compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NO: 23, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 133, 143, 152, ou uma variante das mesmas, em que a variante compreende 1, 2, 3, 4, 4, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições ou deleções de aminoácidos, ou uma combinação das mesmas. Em uma outra modalidade, as substituições de aminoácidos conservativas são substituições. Em uma outra modalidade, as substituições de aminoácidos melhoram as propriedades dos anticorpos tal como aqui fornecidos, por exemplo, através da remoção de um sítio de desamidação. Por exemplo, em uma modalidade, um resíduo de asparagina (Asn; N) é mutado. Em uma outra modalidade, o Asn é mutado para ácido aspártico (Asp; D). Em ainda uma outra modalidade, a Asn na posição 85 na região de estrutura 3 da região variável da cadeia leve é mutada para Asp. Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpo humanizado

7A4D, que compreende a mesma sequência de aminoácidos que o anticorpo humanizado 7A4 exceto com uma mutação na estrutura 3 (posição 85) da cadeia leve para remover o sítio de desamidação.

[0079] Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos aqui fornecidos compreendem uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 81%, pelo menos 82%, pelo menos 83%, pelo menos 84%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de homologia com uma região variável da cadeia leve de acordo com a SEQ ID NOs: 18, 28, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 131, e 141, ou 84. Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos aqui fornecidos compreendem uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de acordo com as SEQ ID NO: 18, 28, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 131, 141, ou uma variante das mesmas, em que a variante compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais substituições de aminoácidos, inserções ou deleções, ou uma combinação das mesmas. Em uma outra modalidade, as substituições de aminoácidos conservativas são substituições. Em uma outra modalidade, as substituições de aminoácidos melhoram as propriedades dos anticorpos tal como aqui fornecidos, por exemplo, através da remoção de um sítio de desamidação. Por exemplo, em uma modalidade, um resíduo de asparagina (Asn; N) é mutado. Em uma outra modalidade, o Asn é mutado para ácido aspártico (Asp; D).

[0080] Os anticorpos anti-PD-1 aqui divulgados tendo uma ou mais substituições, inserções, deleção ou combinação de aminoácidos na região de CDR ou da cadeia leve ou pesada

variável retêm a atividade biológica do anticorpo anti-PD-1 correspondente que não tem uma substituição, inserção ou deleção de aminoácidos. Assim, a variante de anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos retém a ligação a PD-1. A homologia percentual, tal como aqui utilizada, refere-se ao número de sequências de aminoácidos idênticas partilhadas por duas sequências de referência, divididas pelo número total de posições de aminoácidos, multiplicado por 100.

[0081] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos compreendem substituições de aminoácidos conservativas. O versado na técnica reconhecerá que uma substituição de aminoácidos conservativa é uma substituição de um aminoácido por outro aminoácido que tem propriedades estruturais ou químicas semelhantes, tais como, por exemplo, uma cadeia lateral semelhante. Exemplos de substituições conservativas são descritos na técnica, por exemplo, em Watson *et al.*, *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Publication Company, 4^a Ed. (1987).

[0082] O versado compreenderá que as cadeias pesadas variáveis leves e variáveis pesadas podem ser selecionadas independentemente, ou misturadas e combinadas, a partir dos anticorpos aqui fornecidos. Deste modo, a presente invenção fornece anticorpos anti-PD-1 compreendendo uma região variável da cadeia leve com, pelo menos 80% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 23, 33, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 133, 143 e 152; e uma região variável da cadeia pesada com, pelo menos, 80% de homologia com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 18, 28, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 131 e 141.

[0083] Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos que se ligam ao mesmo epítipo que qualquer um dos exemplos de anticorpos aqui divulgados. Assim, em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos que competem pela ligação a PD-1 com os anticorpos exemplificativos aqui fornecidos.

[0084] Os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos podem compreender ainda modificações da região Fc para alterar funções efetoras. As modificações de Fc podem ser inserções, deleções ou substituições de aminoácidos, ou podem ser modificações químicas. Por exemplo, as modificações da região Fc podem ser feitas para aumentar ou diminuir a ligação do complemento, para aumentar ou diminuir a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ou para aumentar ou diminuir a meia-vida do anticorpo. Algumas modificações de Fc aumentam ou diminuem a afinidade do anticorpo para um receptor Fcγ, tal como FcγRI, FcγRII, FcγRIII ou FcRn. Várias modificações de Fc foram descritas na técnica, por exemplo, em Shields et al., *J. Biol. Chem* 276; 6591 (2001); Tai et al. *Blood* 119; 2074 (2012); Spiekermann et al. *J Exp. Med* 196; 303 (2002); Moore et al. *mAbs* 2: 2; 181 (2010); Medzihradsky *Methods in Molecular Biology* 446; 293 (2008); Mannan et al. *Drug Metabolism and Disposition* 35; 86 (2007); e Idusogie et al. *J Immunol* 164; 4178 (2000). Em algumas modalidades, os padrões de glicosilação da região Fc são alterados. Em outras modalidades, a região Fc é modificada por peguilação (por exemplo, fazendo reagir o anticorpo ou fragmento do mesmo com polietilenoglicol (PEG)).

[0085] Em uma modalidade, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são imunoconjugados compreendendo um anticorpo anti-PD-1 ou um fragmento do mesmo e compreendendo

ainda um agente selecionado do grupo que inclui um agente terapêutico adicional, um agente citotóxico, uma molécula de imunoadesão e um agente de imagiologia. Em algumas modalidades, o agente de imagiologia é selecionado do grupo que consiste em um marcador radioativo, uma enzima, um marcador fluorescente, um marcador luminescente, um marcador bioluminescente, um marcador magnético e biotina. Em algumas modalidades, o agente de imagiologia é um radiomarcador selecionado do grupo que consiste em: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , 62 , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , e ^{153}Sm . Em algumas modalidades, o agente terapêutico ou o agente citotóxico é selecionado do grupo que inclui um agente quimioterapêutico, um agente imunossupressor, um agente imunoestimulador, um antimetabolito, um agente alquilante, um antibiótico, um fator de crescimento, uma citocina, um agente antiangiogênico, um agente antimitótico, uma antraciclina, uma toxina e um agente apoptótico. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é conjugada diretamente ao agente. Em outras modalidades, a proteína de ligação é conjugada com o agente através de um ligante. Ligantes adequados incluem, mas não estão limitados a, aminoácidos e ligantes polipeptídicos aqui divulgados. Os ligantes podem ser cliváveis ou não cliváveis.

[0086] Em uma modalidade, a presente invenção fornece anticorpos biespecíficos ou multiespecíficos específicos para PD-1 e pelo menos um outro antígeno ou epítipo. Os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos podem ser testados quanto à ligação a PD-1 utilizando os ensaios de ligação aqui fornecidos, ou qualquer outro ensaio de ligação conhecido na técnica.

[0087] Salvo indicação em contrário, a prática da presente invenção emprega biologia molecular convencional, biologia

celular, bioquímica e técnicas de imunologia que são bem conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, em: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição (Sambrook et al., 1989), *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., Eds., 1991); *Immunobiology* (C. A. Janeway e P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd e C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Phage display: a laboratory manual* (C. Barbas III et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); e *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow e D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999).

[0088] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para tratar um indivíduo para uma doença ou condição que responde ao aumento, estimulação ou elicitación de uma resposta imune. Tal como aqui utilizados, os termos "tratamento" ou "tratar" referem-se tanto a tratamento terapêutico como a medidas profiláticas ou preventivas. Os sujeitos em necessidade de tratamento incluem aqueles sujeitos que já têm a doença ou condição, bem como aqueles que podem desenvolver a doença ou condição e em quem o objetivo é prevenir, retardar ou diminuir a doença ou condição. Tal como aqui utilizado, o termo "sujeito" significa um mamífero, tal como um roedor, um felino, um canino, e um primata. De um modo preferido, um objeto de acordo com a invenção é um ser humano.

[0089] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz", tal como aqui utilizado, refere-se à quantidade de um composto ou composição que é necessária para fornecer um benefício terapêutico e/ou preventivo para o sujeito.

[0090] Em um aspecto, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno são úteis no tratamento de tumores sólidos ou não sólidos. Assim, em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para o tratamento de câncer. "Câncer", tal como aqui utilizado, refere-se a condição fisiológica em mamíferos que normalmente é caracterizada pelo crescimento de células desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluindo lipossarcoma, sarcoma osteogênico, angiossarcoma, endotheliosarcoma, leiomiossarcoma, cordoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliosarcoma, rabdomiossarcoma, fibrossarcoma, miossarcoma, condrossarcoma), tumores neuroendócrinos, mesotelioma, schwanoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais particulares de tais cânceres incluem câncer de células escamosas (por exemplo, câncer epitelial de células escamosas), linfoma de Hodgkin; linfoma não-Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeno/leucemia linfocítica crônica, micose fungoide, linfoma de células manto, linfoma folicular, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de zona marginal, leucemia de células pilosas e leucemia linfoplasmocitária), tumores de células precursoras de linfócitos, incluindo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B e leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores das células T e NK maduras, incluindo leucemias de células T periféricas, leucemia de células T adultas/linfomas de células T e leucemia linfocítica grande granular, histiocitose de células de Langerhans, neoplasias mieloides, tais como leucemias mieloides agudas, incluindo AML com maturação, AML sem diferenciação, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda e

leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicas e doenças mieloproliferativas crônicas, incluindo leucemia mielóide crônica, leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B, leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, câncer de pulmão incluindo câncer do pulmão de células pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma espinocelular de pulmão, carcinoma de pulmão de células pequenas, câncer do peritôneo, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou estomacal incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer do ovário, câncer do fígado, câncer da bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer do cólon, câncer retal, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma das glândulas salivares, câncer do rim ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer da tireóide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, câncer testicular, câncer esofágico, tumores do trato biliar, tumor de Ewing, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais, hepatoma, carcinoma de canal biliar, carcinoma de pulmão, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström, doença mielodisplásica, doença de cadeia pesada, tumores neuroendócrinos, Schwannoma e outros carcinomas.

[0091] Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são úteis no tratamento de doenças causadas por agentes infecciosos. Os agentes infecciosos incluem, mas não estão limitados a agentes bacterianos, micológicos, parasitários e virais. Exemplos de tais agentes infecciosos incluem o seguinte: estafilococos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Escherichia coli*, estreptococcaceae, neisseriaaceae, cocci, enterobacteriaceae, enterococcus, enterococcus resistente à vancomicina, criptococos, histoplasmoses, *aspergillus*, pseudomonadaceae, vibrionaceae, campylobacter, pasteuraceae, bordetella, francisella, brucella, legionellaceae, bacteroidaceae, bacilos gram-negativos, clostridium, corinebacterium, propionibacterium, bacilos gram-positivos, anthrax, actinomyces, nocardia, mycobacterium, treponema, borrelia, leptospira, micoplasma, ureaplasma, rickettsia, chlamydiae, candida, micoses sistêmicas, micoses oportunistas, protozoários, nematoides, trematoides, cestodes, adenovírus, herpesvírus (incluindo, por exemplo, vírus herpes simplex e vírus Epstein Barr e vírus herpes zoster), poxvírus, papovavírus, (incluindo, por exemplo, vírus da hepatite B e vírus da hepatite C), vírus do papiloma, ortomixovírus (incluindo, por exemplo, gripe A, influenza B e gripe C), paramixovírus, coronavírus, picornavírus, reovírus, togavírus, flavivírus, bunyaviridae, rhabdoviruses, rotavírus, vírus sincicial respiratório, vírus da imunodeficiência humana e retrovírus. Doenças infecciosas exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a candidíase, candidemia, aspergilose, pneumonia estreptocócica, condições da pele e da orofaringe por estafilococos, sepse gram negativa, tuberculose, mononucleose,

gripe, doença respiratória causada pelo vírus sincicial respiratório, malária, esquistossomose e tripanossomíase.

[0092] Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são úteis no tratamento de doenças mediadas por células T do tipo T auxiliar 2 (Th2), tais como, por exemplo, asma, alergia ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0093] Em uma modalidade, os anticorpos e fragmentos dos mesmos aqui fornecidos são úteis para a estimulação de uma resposta imune em um sujeito em necessidade do mesmo. Por exemplo, em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos dos mesmos podem ser administrados em conjunção com um antígeno de interesse com o objetivo de desencadear uma resposta imune ao referido antígeno. Um antígeno de interesse pode ser um antígeno associado a um agente patogênico, tal como um vírus ou bactéria. Assim, em uma modalidade, a presente invenção fornece uma vacina que compreende um anticorpo anti-PD-1 e um antígeno, em que a vacina induz uma resposta imune específica para o antígeno.

[0094] Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos modulam a função de células T reguladoras. As células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ são linfócitos que suprimem ou reduzem os efeitos das funções das células T efetoras. Os termos "célula T reguladoras" e "Treg" são aqui utilizados indiferentemente. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos impedem ou reverterem os efeitos inibitórios de células T reguladoras na produção de citocinas de células T efetoras. Por exemplo, em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 aqui fornecidos restauram a capacidade de produção de IFN γ para células T efetoras em contato com células T reguladoras.

[0095] Em uma modalidade, os anticorpos e os fragmentos dos mesmos aqui divulgados podem ser administrados ao indivíduo por pelo menos uma via selecionada de parenteral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-articular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitária, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intramiocárdica, intraóssea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intra-prostática, intrapulmonar, intrarretal, intrarrenal, intrarretiniana, intraspinal, intrasinovial, intratorácica, intratimpânica, intrauterina, intravesical, intravítreo, bolus, subconjuntival, vaginal, retal, bucal, sublingual, intranasal, intratumoral e transdérmica.

[0096] Em uma modalidade, os anticorpos e os fragmentos dos mesmos aqui fornecidos podem ser administrados a um sujeito em necessidade do mesmo em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em uma modalidade, os anticorpos e os fragmentos dos mesmos podem ser administrados a um sujeito antes, durante e/ou após a administração ao sujeito do agente terapêutico adicional. Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterapêutico, um agente radioterapêutico, citocina, um anticorpo ou um fragmento do mesmo, ou qualquer outro terapêutico adicional que é indicado para a doença a ser tratada. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-1 e o agente terapêutico adicional exibem sinergia terapêutica quando administrados em conjunto, quer concomitante quer sequencialmente. Em uma modalidade, o anticorpo anti-PD-1 e o agente terapêutico adicional são administrados em formulações separadas. Em uma outra modalidade, o anticorpo anti-PD-1 e o

agente terapêutico adicional são administrados na mesma formulação. Em uma modalidade, os anticorpos anti-PD-1 e os fragmentos aqui fornecidos aumentam o efeito de modulação imune de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em uma outra modalidade, o um ou mais agentes terapêuticos adicionais aumenta o efeito do anticorpo anti-PD-1 ou fragmento do mesmo.

[0097] A presente invenção fornece anticorpos isolados e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos e ácidos nucleicos que codificam tais anticorpos e fragmentos, bem como composições compreendendo tais anticorpos, fragmentos e ácidos nucleicos isolados. O termo "isolado" refere-se a um composto de interesse (por exemplo, um anticorpo ou um ácido nucleico) que foi separado do seu ambiente natural. A presente invenção fornece ainda composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos ou fragmentos isolados dos mesmos, ou ácidos nucleicos que codificam tais anticorpos ou fragmentos, e compreendendo ainda um ou mais carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem, por exemplo, excipientes, diluentes, materiais de encapsulação, agentes de enchimento, tampões, ou outros agentes.

[0098] O uso do singular inclui o plural, a menos que especificamente indicado de outra forma. A palavra "um" ou "uma" significa "pelo menos um" a menos que especificamente indicado de outra forma. A utilização de "ou" significa "e / ou" a menos que indicado de outra forma. O significado da expressão "pelo menos um" é equivalente ao significado da frase "um ou mais". Além disso, a utilização do termo "incluindo" bem como outras formas, tais como "inclui" e "incluído", "não é limitativa. Além disso, termos tais como "elemento" ou "componente" abrangem ambos os elementos ou componentes compreendendo uma unidade e

elementos ou componentes que compreendem mais do que uma unidade a menos que especificamente indicado de outra forma.

[0099] Embora a invenção anterior tenha sido descrita em detalhes à título de ilustração e exemplo para fins de clareza de compreensão, estará facilmente evidente aos versados na técnica, à luz dos ensinamentos desta invenção, que determinadas alterações e modificações podem ser feitas na mesma, sem se desviar do espírito ou escopo das reivindicações anexas. Os exemplos seguintes são fornecidos a título de ilustração apenas e não como forma de limitação. Os versados na técnica reconhecerão facilmente uma variedade de parâmetros não críticos que poderiam ser alterados ou modificados para produzir resultados essencialmente semelhantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1 Imunização de camundongos e produção de anticorpos de camundongos contra PD-1 humana

[00100] Para gerar anticorpos contra a PD-1 humana, cDNAs que codificam a estrutura de leitura aberta do domínio extracelular de hPD-1 fundido com um marcador de histidina (hPD-1-HisTag, SEQ ID NO: 1), Fc de camundongo (hPD-L1-mFc, SEQ ID NO: 13), e marcador de Fc humano (hPD-1-hFc, SEQ ID NO: 5) foram obtidos por PCR e subclonados no vetor de expressão pcDNA3. 1 (Invitrogen CAT #: V-790), respectivamente. Após expressão transiente em células 293 de estilo livre, purificou-se hPD-1-HisTag com coluna NTA (GE Healthcare), hPD-1-mFc e hPD-1-hFc com coluna de Proteína G (GE Healthcare).

[00101] Para imunizar camundongos necessários para a produção de linhagens de células de hibridoma, misturaram-se 100 µg de proteína de fusão Fc de camundongo PD-1 humana e/ou um adjuvante completo de Freund na mesma quantidade e administrou-se a

mistura através de uma injeção subcutânea a cada cinco camundongos BALB/c com 7 semanas de idade. Após duas semanas, o antígeno (metade da quantidade previamente injetada) foi misturado com um adjuvante de Freund incompleto utilizando o mesmo método descrito acima, e a mistura foi administrada a cada camundongo por injeção subcutânea. Após uma semana, o reforço final foi realizado, e o sangue foi coletado da cauda de cada camundongo após três dias para obter soro. Em seguida, o soro foi diluído a 1/1000 com PBS, e foi realizado um ELISA para analisar se o título do anticorpo que reconhece PD-1-mFc humano aumentou. Posteriormente, foram selecionados camundongos em que foi obtida uma quantidade suficiente do anticorpo e foi realizado um processo de fusão celular nos camundongos selecionados.

[00102] Três dias antes de uma experiência de fusão celular, uma mistura de 50 µg de PBS e proteína de fusão PD-1-mFc humana foi administrada através de uma injeção intraperitoneal para cada camundongo. Cada camundongo imunizado foi anestesiado e o seu baço localizado no lado esquerdo do corpo foi então extraído e triturado com uma malha para isolar células que foram misturadas com um meio de cultura (RPMI1640) para preparar uma suspensão de células de baço. A suspensão foi centrifugada para coletar uma camada celular. As 1×10^8 obtidas de células do baço foram misturados com $1,5 \times 10^7$ de células de mieloma (Sp2/0), e a mistura foi centrifugada para precipitar as células. O precipitado foi disperso lentamente e tratado com PEG Hybri-Max (Sigma Inc., CAT#: 7181). As células misturadas foram distribuídas em placas de 96 poços a 0,1 ml por poço e incubadas a 37°C, incubadora com 5% de CO₂. No dia 1, as células foram alimentadas pela adição de mais 0,1 ml de meio contendo soro e

HAT mais 2 × metotrexato para cada poço. No dia 3 e dia 7, 0,1 ml de meio de cada poço foi substituído por 0,1 ml de meio HT fresco. O rastreio ocorreu tipicamente entre os dias 9-14.

Exemplo 2 - Seleção de células de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais contra a proteína PD-1 humana com base em análise de ELISA e FACS.

[00103] A análise de ligação de ELISA foi conduzida com base na proteína PD-1-hFc humana. Revestiram-se placas de 96 poços (Costar, Cat No.: 9018) com 100 µL de PD1-hFc 2 µg/ml (CrownBio) em tampão de revestimento (PBS, Hyclone, Cat N° SH30256. 01B) de um dia para o outro a 4°C. Os poços foram aspirados e os sítios de ligação não específicos foram bloqueados por adição de 200 µL de tampão de bloqueio com 1% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA, Roche, Cat No: 738328) e incubação durante 1 hora a 37°C. Depois de as placas serem lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% (v/v) de Tween20 (Sigma, Cat No.: P1379), adicionou-se 100 µL/poço de diluições adequadas de sobrenadante de hibridoma em tampão de bloqueio e incubou-se durante 1 hora. As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL/cavidade de IgG de cabra anti-Camundongo (H + L) (Thermo, Cat No: 31432) em tampão de bloqueio durante 60 minutos. Depois de as placas terem sido lavadas, foram adicionados 100 µL poço de solução de substrato (TMB (eBioscience, Cat No: 00-4201-56) e as placas foram incubadas durante 2 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 100 µL/poço de solução de parada (H2SO4 2N) para parar a reação. Os sinais colorimétricos foram desenvolvidos e lidos a 450 nm usando um Auto Plate SpectraMax Plus (Fornecedor: Molecular Devices; Modelo: MNR0643; Programa: SoftMax Pro v5.4). Através deste método, as linhagens de células de hibridoma

que produzem anticorpos altamente especificamente se ligando à proteína PD-1 humana foram repetidamente selecionadas.

[00104] A análise de bloqueio do ligando com base em ELISA foi conduzida bloqueando a PD-L1-mFc humana biotinilada da ligação a PD-1-hFc humana. O antígeno PD-1-mFc (CrownBio) foi suspenso em tampão PBS (Hyclone, Cat No.: SH30256. 01B) (2 ug/ml, 100 uL/poço) e revestido na placa de 96 poços (costar, Cat No. : 9018) 4°C durante a noite. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem: PBS+0,05% de Tween 20 (Sigma, Cat No. : P1379). adicionou-se a cada poço 200 ul de tampão de bloqueio (PBS + BSA a 1% (Roche, Cat No.: 738328)), incubou-se a 37°C durante 1 hora e lavadas 3 vezes. Várias concentrações (diluições adequadas de sobrenadante de hibridoma em PBS) foram adicionadas aos poços (100 µL/poço) do anti-PD-1 Abs e incubadas a 37°C durante 1 hora. O ligando foi adicionado (0,1 ug/mL de PDL-1-mFc-biotina, 100 µL/poço), incubado a 37°C durante 2 hs, e lavados 3 vezes. O anticorpo secundário foi adicionado (Avidin HRP eBioscience Cat No: E07418-1632, 1: 500, 100 ul/poço), incubado a 37 °C durante 0,5 hora e lavado 3 vezes. TMB (Sigma, Cat No. : T0440, 100 ul/poço) foi adicionado e incubado durante 3 min à TA. Para parar a reação, 2N H2SO4 (100 ul/poço), foi adicionado. Os sinais colorimétricos foram desenvolvidos e lidos a 450 nm usando um Auto Plate SpectraMax Plus (Fornecedor: Molecular Devices; Modelo: MNR0643; Programa: SoftMax Pro v5. 4).

[00105] A análise de ligação celular de anticorpos foi realizada com base na linhagem de células hPD-1-293T. 2×10^5 de células 293T-PD-1 foram usadas para cada reação, colocando-as em cada poço de placas de cultura de 96 poços. As células foram incubadas com o anticorpo indicado (20 ug/ml com a diluição de

1/5), a 4°C durante 1 h. As células foram lavadas três vezes com tampão FACS. Um anticorpo secundário (PE de cabra anticumundongo: 1: 200; PE de camundongo anti-humano: 1: 10) foi adicionado às células a 100 ul/poço, e incubado a 4°C durante 40 min. As células foram lavadas três vezes com tampão FACS e analisadas por FACS Array.

[00106] A análise de bloqueio do ligando com base em FACS foi conduzida para determinar os anticorpos do hibridoma anti-PD-1 no bloqueio da ligação PD-L1 e PD-L2 humana biotinilada às células hPD-1 293T utilizando um ensaio de citometria de fluxo. As células 293T expressando PD-1 foram suspensas em tampão FACS (PBS com soro fetal de vitelo a 3%). Várias concentrações dos anticorpos de hibridoma de ensaio foram adicionadas à suspensão de células e incubados a 4°C durante 60 minutos em placas de 96 poços. A proteína PD-L1 marcada com biotina ou proteína PD-L2 marcada com Biotina foi adicionada aos poços e incubada a 4°C durante 60 minutos. As placas foram lavadas 3 vezes, e foi adicionado anticorpo antibiotina PE de camundongo (Biolgend, cat # 409004). As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando FACS Array. Os resultados do estudo estão representados na **Figura 1A** (PD-L1) e na **Figura 1B** (PD-L2). Os anticorpos monoclonais anti-PD-1 bloquearam a ligação de PD-L1 ou PD-L2 a células 293T transfectadas com PD-1 humana, medida pela intensidade fluorescente média (MFI) de coloração. Estes dados demonstram que os anticorpos anti-PD-1 bloqueiam a ligação do ligando PD-L1 e PD-L2 à superfície da célula PD-1.

Exemplo 3 - Subclonagem para obter clones de Anticorpos Monoclonais e purificação de anticorpos anti-hPD-1

[00107] A subclonagem baseia-se no procedimento de diluição limitada e é concebida para obter clones de hibridoma individuais que produzem anticorpos monoclonais. Cada um dos hibridomas foi submetido a várias rodadas (4 rodadas) de diluição limitante. Para cada ciclo de subclonagem, os clones foram testados por análises de bloqueio com bases em ELISA e FACS.

[00108] A purificação de anticorpos foi conduzida para um total de vinte e dois anticorpos de hibridoma anti-hPD-1. As células de hibridoma foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO; Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.) contendo 10% de soro de vitela fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 2% de L-glutamina, e 1% de solução ajustada de NaHCO_3 . As células de hibridoma selecionadas foram então adaptadas em meio de cultura isenta de soro e o anticorpo foi purificado a partir do sobrenadante utilizando a coluna Protein-G (GE Healthcare). Após lavagem com PBS, os anticorpos ligados foram eluídos com glicina 0,1 M pH 3,0, seguido de neutralização de pH usando 2,0 M de Tris. Foram utilizados concentradores centrífugos Ultra-15 (Amicon) para troca de tampão e concentração de anticorpos.

Exemplo 4 - Caracterização dos anticorpos murinos anti-hPD-1 purificados nas atividades de ligação e bloqueio do ligando com base nas análises ELISA e FACS

[00109] Os anticorpos de hibridoma purificados foram ainda caracterizados com base nas análises ELISA e FACS. Os métodos usados foram semelhantes aos descritos acima no Exemplo 2, exceto que, nestes casos, os anticorpos purificados foram

medidos em quantidade e concentração, e os resultados foram utilizados para calcular os valores de EC50 e IC50. As tabelas a seguir, **Tabelas 1-5**, mostram os resultados de 10 anticorpos.

Tabela 1. EC50 de ligação com base em ELISA de 10 anticorpos anti-PD-1 murinos

ng/ml	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	5A8	7A4
EC50	13,35	19,38	7,07	15,67	24,36	17,18	13,25	17,33	11,25	9,32

Tabela 2. Bloqueio com base em ELISA IC50 de 10 anticorpos anti-PD-1 murinos

ng/ml	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	5A8	7A4
IC50	873,2	1114,8	923	961,2	982,0	1409	1464,3	701,0	1128,7	698,8

Tabela 3. A EC50 de ligação com base em FACS de 10 anticorpos anti-PD-1 murinos

ng/ml	15H5	22A5	14A6	6,00E+01	7D3	10D1	4C10	13F1	5A8	7A4
EC50	45,37	77,45	NA	49,09	52,66	NA	108,9	30,79	NA	38,93

Tabela 4. IC50 de Bloqueio de PD-L1 com base em FACS de 10 anticorpos murinos anti-PD-1 selecionados.

ng/ml	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	5A8	7A4
IC50	35,64	56,22	21,13	26,85	38	36,9	83,32	19,86	28,22	28,85

Tabela 5. IC50 de Bloqueio de PD-L2 baseado em FACS de 10 anticorpos murinos anti-PD-1 selecionados.

ng/ml	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	5A8	7A4
IC50	63,04	210,1	91,98	113,7	140,5	150	250,7	52,93	18,84	4,45

Exemplo 5: A análise de Biacore dos anticorpos anti-PD-1 murinos

[00110] Para caracterizar mais as características de ligação dos anticorpos, 10 anticorpos de hibridoma foram perfilados utilizando Biacore (Biacore 3000, GE) para elucidar a cinética de ligação e calcular as constantes de ligação de equilíbrio. Este ensaio foi realizado pelo método de captura, utilizando o kit de captura de anticorpos de camundongos (BR-1008-38, GE). Após diluição de Fc mAb anticamundongo a 25 µg/ml em tampão de imobilização de pH 5,0, a imobilização foi conduzida com os parâmetros mostrados na **Tabela 6** a uma taxa de fluxo de 5 µl/min. As execuções cinéticas foram feitas por 1) injeção de ligando durante 0,5-1 min típico a uma taxa de fluxo de 10 µl/min; 2) injeção de analitos de escolha durante 3 min típicos seguido de dissociação em tampão de corrida (1X PBS-P20) durante 5-10 minutos típicos a uma taxa de fluxo de 30 µl/min; e 3) injeção de solução de regeneração 10 mM de Glicina pH 1, 7 durante 1-2 min típicos a uma taxa de fluxo de 10 µl/min.

Tabela 6. Parâmetros Biacore.

Evento	Injeção	Condições
Ativação	EDC/NHS (mistura 1:1)	7 minutos
Imobilização	Fc mAb anti-humano diluído	4 minutos para alcançar nível de Imobilização de ~ 7000 RU
Desativação	Etanolamina-	7 minutos

	HCl	
--	-----	--

[00111] Os resultados do estudo são mostrados nas **Tabela 7**. Cada um dos anticorpos anti-PD1 humanos apresentou uma taxa de associação (k_a) no intervalo de $1,11E + 051/\text{Ms}$ a $8,40E + 051/\text{Ms}$; uma taxa de dissociação (k_d) no intervalo de $2,83E-05 \text{ 1/s}$ a $7,55E-05 \text{ 1/s}$; uma constante de associação de equilíbrio (K_A) no intervalo de $1,60E + 10 \text{ 1/M}$ a $5,44E + 10 \text{ 1/M}$; e uma afinidade (K_D) no intervalo de $1,84E-11 \text{ M}$ a $6,23E-11 \text{ M}$ ($0,0184 \text{ nM}$ a $0,0623 \text{ nM}$).

Tabela 7. Valores de K_D de anticorpos anti-PD-1 de hibridoma.

	$k_a \text{ (1/Ms)}$	$k_d \text{ (1/s)}$	$K_A \text{ (1/M)}$	$K_D \text{ (M)}$
10D1	8.40E+05	5.24E-05	1.60E+10	6.23E-11
14A6	1.51E+06	4.52E-05	3.33E+10	3.00E-11
22A5	1.49E+06	2.88E-05	5.17E+10	1.93E-11
4C10	7.91E+05	2.63E-05	3.01E+10	3.32E-11
7A4	1.96E+06	4.82E-05	4.06E+10	2.46E-11
6E1	1.11E+06	2.83E-05	3.92E+10	2.55E-11
13F1	1.41E+06	3.92E-05	3.60E+10	2.78E-11
15H5	2.00E+06	3.67E-05	5.44E+10	1.84E-11
5A8	1.29E+06	7.55E-05	1.70E+10	5.87E-11
7D3	1.14E+06	2.83E-05	4.02E+10	2.49E-11

Exemplo 6: Reatividade cruzada entre espécies e entre moléculas similares

[00112] Para avaliar a reatividade cruzada das espécies dos anticorpos, os receptores de PD-1 de macaco cinomólogo e de camundongo foram clonados por PCR e foram geradas células 293T-PD-1 transfectadas de forma estável. Os anticorpos foram testados quanto à ligação ao receptor de cinomólogo usando proteínas com base em ELISA. Os resultados do estudo mostraram que os anticorpos se ligam com afinidade igual a PD-1 humana e cinomóloga e ligação em bloco de hPD-L1/Fc e hPD-L2/Fc a PD-1

cinomóloga com eficácia semelhante em comparação com PD-1 humana. Nenhum dos anticorpos selecionados ligou PD-1 de camundongo com afinidade detectável em qualquer dos ensaios utilizados. Nenhuma reação cruzada com CTLA4, ICOS e CD28 humana (ver **Table 8**).

Exemplo 7: Efeito dos anticorpos de hibridoma anti-PD-1 sobre a produção de citocinas em uma reação de linfócitos mistos.

[00113] Utilizou-se uma reação mista de linfócitos para demonstrar o efeito do bloqueio da via PD-1 em células efetoras de linfócitos. As células T no ensaio foram testadas quanto à proliferação, secreção de IFN- γ e secreção de IL-2 na presença ou ausência de um anticorpo monoclonal murino anti-PD-1 humana. No ensaio, as células T CD4 + humanas foram purificadas a partir de PBMC utilizando uma seleção negativa de CD4 + (Miltenyi Biotech, cat # 130-091-155). As células dendríticas maduras (DC) foram derivadas de culturas de monócitos purificados (Miltenyi, Mo-DC Generation Toolbox, cat # 130-093-568) com Meio de Diferenciação de Mo-DC durante 7 dias; em seguida, induziu-se maturação DC com Mo-Dc Maturation durante 2 dias. Cada cultura continha 10^5 de células T purificadas e 10^4 de células dendríticas alogeneicas em um volume total de 200 μ l. Adicionou-se anticorpo monoclonal anti-PD-1 4C10, 5A8, 6E1, 7D3, 7A4, 10D1, 13F1, 14A6, 15H5 ou 22A5 a cada cultura a diferentes concentrações de anticorpo. Nenhum anticorpo ou um anticorpo de controle de isotipo foi utilizado como controle negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37°C. Ao fim de 5 dias, 50 μ l de meio foram coletados para a medição de IL-2 e IFN- γ . Os níveis de IFN- γ e IL-2 no fluido de cultura foram

medidos utilizando um kit EIA hIFN- γ ELISA (R&D, cat # DY285) e kit IL-2 ELISA (eBioscience). Os resultados do estudo são fornecidos na **Figura 2** (secreção de IL-2) e **Figura 3** (secreção de IFN- γ) e mostram que os anticorpos monoclonais anti-PD-1 humana promovem a proliferação de células T, secreção de IFN- γ e secreção de IL-2 de uma forma dependente da concentração. Em contraste, as culturas contendo o anticorpo de controle de isotipo não apresentaram um aumento de proliferação das células T e de secreção de IFN- γ ou IL-2.

Exemplo 8: Características de 10 anticorpos murinos anti-hPD-1

[00114] As características de 10 anticorpos monoclonais anti-PD1 que foram purificados e caracterizados são resumidas na **Tabela 8**. Estes anticorpos ligaram-se firmemente a PD-1 (com constantes de dissociação no intervalo de 20 uM a 3 nM) e eram capazes de bloquear a interação com PD-L1 e PD-L2 com valores variáveis de IC50. Cada um dos anticorpos induziu a produção de IL2 e IFN γ . Nenhum dos 10 anticorpos teve reação cruzada com CTLA4, ICOS ou CD28. Cada um dos anticorpos ligou PD-1 cinomóloga. Cada um dos anticorpos, quando adicionados em solução agiu como antagonistas de receptor, potencializou em última análise as respostas de células T (ver Exemplo 5).

Tabela 8. Resumo de características caracterizadas de 10 anticorpos murinos anti-hPD-1.

o.	Abs	KD selecionado (Biacore)	ELISA de EC50 de ligação (ng/ml)	FACS a 20ug/ml	ELISA de EC50 de bloqueio (ug/ml)	FACS de EC50 de Bloqueio de PD-L1 (ng/ml)	FACS de EC50 de Bloqueio de PD-L2 (ng/ml)	IL2 de ativação de células T	FN-g de ativação de células T	Interação com CTLA4, ICOS CD28	Interação com cyno-PD-1
1	15H5	1.84E-11	13,35	+++	873,2	35,64	63,04	+++	++	-	+++

2	22A5	1,93E-11	19,38	+++	1114,8	56,22	210,10	+++	++	-	+++
3	14A6	3,00E-11	7,07	+++	923	21,13	91,98	+++	+++	-	+++
4	6E1	2,55E-11	15,67	+++	961,2	26,85	113,70	+++	++	-	+++
5	7D3	2,49E-11	24,36	+++	982	38	140,50	++	+++	-	+++
6	10D1	6,23E-11	17,18	+++	1409	36,9	150,00	+++	+++	-	+++
7	4C10	3,32E-11	13,25	+++	1464,3	83,32	250,70	+++	+++	-	+++
8	13F1	2,78E-11	17,33	+++	701	19,86	52,93	+++	++++	-	+++
9	5A8	5,87E-11	11,25	+++	1128,7	28,22	18,84	+++	+++	-	+++
10	7A4	NA	9,32	+++	698,8	28,85	4,45	++++	+++	-	+++

Exemplo 9: Clonagem e humanização de sequências de cDNA de anticorpo anti-PD-1

[00115] Clonagem de cDNAs de imunoglobulina

[00116] Utilizou-se o RNA total isolado a partir da linhagem de células de hibridoma produzindo o anticorpo hPD-1 por RNeasy Mini Kit (Qiagen, CAT #: 74104) como molde para sintetizar o cDNA de primeira cadeia com a Transcriptase Reversa SuperScript® II (Life Technology, CAT #: 18064 -14) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de cDNA foi então submetido a PCR em uma mistura de reação de 50 µl de volume utilizando iniciadores de IgG de camundongos degenerados (Kettleborough CA, et al, European Journal of Immunology 23: 206-211 (1993), Strebe N, et al, Antibody Engineering 1: 3-14 (2010)). A reação foi realizada em um S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, CAT#: 184-2000) com 30 ciclos de: 94°C, 1,5 minutos para a desnaturação; 50°C, 1 minuto de recozimento; e 72°C, 1 minuto para a síntese. No final do 30º ciclo, a mistura de reação foi incubada durante mais 7 minutos a 72°C para extensão.

[00117] A mistura de PCR foi submetida a eletroforese em um gel de agarose a 1%/Tris-Borato contendo 0,5 µg/ ml de brometo

de etídio. Os fragmentos de DNA com os tamanhos esperados (aproximadamente 400 pb para a cadeia pesada e a cadeia leve) foram excisados do gel e purificados. 3 µl de produto de PCR purificado foram clonados no vetor pMD-18T (Takara, CAT #: D101A) e transformados em One Shot® TOP10, E. coli Quimicamente Competente (Invitrogen, CAT #: C4040-03). Os clones foram rastreados por PCR de colônias utilizando iniciadores M13 diretos e inversos universais, e 10 clones positivos de cada reação foram escolhidos para a sequenciação de DNA em ambas as direções utilizando iniciadores M13 para frente e M13 reversos.

[00118] As sequências da região variável dos anticorpos 4C10 (SEQ ID NOs: 28, 33), 5A8 (SEQ ID NOs: 99, 104), 6E1 (SEQ ID NOs: 89, 94), 7D3 (SEQ ID NOs: 39, 44), 7A4 (SEQ ID NOs: 109, 114), 10D1 (SEQ ID NOs: 18, 23), 13F1 (SEQ ID NOs: 49, 54), 14A6 (SEQ ID NOs: 69, 74), 15H5 (SEQ ID NOs: 59, 64) e 22A5 (SEQ ID NOs: 79, 84) foram amplificadas a partir dos clones de hibridoma correspondentes. Estes anticorpos apresentaram funções desejadas, tais como, bloqueio da ligação de PD-1 a PD-L1 e ativação de células T potencializada e liberação de citocinas.

[00119] Construção e expressão de anticorpo de 7A4 e 13F1 quiméricos

[00120] Cadeias leves de 7A4 e 13F1 quiméricos (SEQ ID NOs: 123 e 129, respectivamente) foram construídos ligando os cDNAs clonados por PCR de regiões VL de camundongos a kapa humana e IgG1, respectivamente. Cadeias pesadas de IgG1 de 7A4 e 13F1 quiméricos (SEQ ID NOs: 119 e 125, respectivamente) foram construídos ligando os cDNAs clonados por PCR de regiões de VH de camundongo à região constante de IgG1 humano. Cadeias pesadas de IgG4 de 7A4 e 13F1 quiméricos (SEQ ID NOs: 121 e 127, respectivamente) foram construídos ligando os cDNAs clonados por

PCR das regiões de VH de camundongo à região constante de IgG4 humano. As extremidades 5' das sequências de cDNA de camundongo foram modificados utilizando iniciadores de PCR concebidos para adicionar uma sequência líder tanto à cadeia leve quanto à cadeia pesada.

[00121] Células Freestyle 293 (200 mL a 10^6 /mL) foram transfectadas com 100µg de cada um dos plasmídeos de expressão de cadeia pesada e leve quiméricos e cultivadas durante 6 dias. O anticorpo quimérico no sobrenadante foi então purificado com coluna Protein-G (GE Healthcare). A ligação dos anticorpos quiméricos a PD-1 foi medida por ELISA e Biacore como descrito acima nos Exemplos 2 e 5, e mostrou-se que se liga a PD-1 com afinidade comparável à do anticorpo progenitor murino. A **Tabela 9** mostra a EC50 de ligação de cada um dos anticorpos anti-PD-1 quiméricos como medido por ELISA. A **Tabela 10** mostra a IC50 de bloqueio de PD-L1 de cada um dos anticorpos anti-PD-1 quiméricos como medido por ELISA. A **Tabela 11** mostra a EC50 de ligação de cada um dos anticorpos anti-PD-1 quiméricos como medido por FACS. A **Tabela 12** mostra a IC50 de bloqueio de PD-L1 de cada um dos anticorpos anti-PD-1 quiméricos como medido por FACS.

Tabela 9. A EC50 de ligação com base em ELISA de anticorpos anti-PD-1 quiméricos

ng/ml	15H5 hlgG4	22A5 hlgG4	14A6 hlgG4	6E1 hlgG4	7D3 hlgG4	10D1 hlgG4	4C10 hlgG4	13F1 hlgG4	7A4 hlgG4
EC50(ug/ml)	81,8	41,3	64,6	32,54	51,7	58,8	94,56	58,73	62

Tabela 10. A IC50 de ligação com base em ELISA de anticorpos anti-PD-1 quiméricos

ng/ml	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	7A4
-------	------	------	------	-----	-----	------	------	------	-----

	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4
IC50	1367,0	1010,9	823,4	868,6	948,1	1034,5	977,6	856,2	871,1

Tabela 11. A EC50 de ligação com base em FACS de anticorpos anti-PD-1 quiméricos

	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	7A4
ng/ml	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4
EC50	243,6	145,3	103,4	143,1	130,9	218,8	220,6	113,1	91,6

Tabela 12. A IC50 de bloqueio de PD-L1 com base em FACS de anticorpos anti-PD-1 quiméricos

	15H5	22A5	14A6	6E1	7D3	10D1	4C10	13F1	7A4
ng/ml	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4	hlgG4
IC50	100,5	84,26	61,37	54,01	NA	40,33	129	52,13	70,55

[00122] Foram utilizadas reações de linfócitos mistos como descrito acima no Exemplo 7 para determinar o efeito dos anticorpos anti-PD-1 quiméricos na secreção de IL-2 (**Figura 4**) e na secreção de IFN- γ (**Figura 5**) de células T. Cada um dos anticorpos monoclonais anti-PD-1 quiméricos promoveu a secreção de IL-2 e a secreção de IFN γ de uma forma dependente da concentração no ensaio MLR. Em contraste, o anticorpo de controle de isotipo (hIgG4) não provocou secreção de IL-2 ou secreção de IFN γ a qualquer concentração testada.

[00123] Concepção de humanização de anticorpos

[00124] Os anticorpos 7A4 e 13F1 foram humanizados utilizando uma abordagem de enxerto de CDR (Patente US N°. 5.225.539, incorporada neste documento em sua totalidade por referência). As sequências de cadeias da cadeia variável de cadeias leves e de cadeias pesadas do anticorpo 7A4 e 13F1 murino foram

comparadas com as disponíveis no banco de dados de proteínas do Laboratório de Investigação para Bioinformática Estrutural (RCSB) pesquisando a base de dados NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi>. O modelo de 7A4 e 13F1 foi gerado respectivamente com base na estrutura de VH e VL com a homologia de sequências mais elevada.

[00125] Os anticorpos humanos de molde a serem enxertados com as regiões determinantes complementares (CDRs) no VH e VL do anticorpo 7A4 e 13F1 de camundongo foram selecionados a partir de linhagens germinativas de anticorpos humanos com uma sequência de aminoácidos com elevada homologia com o anticorpo 7A4 e 13F1 de camundongo, IMGT/Domain Gap Alinhagemr banco de dados de estrutura 3D, <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>. Para 7A4, o modelo de VH humano selecionado foi uma combinação de IGHV2-5*10 e IGHJ4*01, e o modelo de VL humano selecionado foi uma combinação de IGKV1-33*01 e IGKJ2*01. Para 13F1, o modelo de VH humano selecionado foi uma combinação de IGHV3-21*04 e IGHJ4*01, e o modelo de VL humano selecionado foi uma combinação de IGKV7-3*01 e IGKJ2*01.

[00126] As sequências de aminoácidos CDR dos anticorpos humanos modelo acima mencionados foram substituídas pela sequência de aminoácidos de CDRs do anticorpo 7A4 e 13F1 de camundongo. Adicionalmente, as estruturas do anticorpo humano VH e VL de molde acima mencionado foram enxertados com as sequências de aminoácidos necessárias de VH e VL de anticorpo 7A4 e 13F1 de camundongo para fornecer um anticorpo funcional humanizado. Como para VH e VL de 7A4 e 13F1, vários sítios de aminoácidos estruturais do anticorpo humano modelo acima mencionado foram retromutados às sequências de aminoácidos correspondentes nos anticorpos 7A4 e 13F1 de camundongo. Para a

região variável da cadeia leve do anticorpo 7A4 humanizado, o aminoácido na posição 40 foi mutado de Tyr (Y) para Phe (F) e o aminoácido na posição 72 foi mutado de Gly (G) para Arg (R); e para a região variável da cadeia pesada do anticorpo 7A4 humanizado, o aminoácido na posição 2 foi mutado de Val (V) para Ile (I), o aminoácido na posição 46 foi mutado de Glu (E) para Lys (K) e o aminoácido na posição 70 foi mutado de Phe (F) para Ile (I). Para a região variável da cadeia leve do anticorpo 13F1 humanizado, o aminoácido na posição 45 foi mutado de Leu (L) para Pro (P) e o aminoácido na posição 70 foi mutado de Phe (F) para Tyr (Y); e para a região variável da cadeia pesada do anticorpo 13F1 humanizado, o aminoácido na posição 26 foi mutado de Gly (G) para Tyr (Y), o aminoácido na posição 48 foi mutado de Ile (I) para Met (M), o aminoácido na posição 49 foi mutado de Gly (G) para Ala (A), o aminoácido na posição 67 foi mutado de Val (V) para Ile (I) e o aminoácido na posição 71 foi mutado de Val (V) para Arg (R).

[00127] As sequências de aminoácidos das cadeias leves variáveis e pesadas variáveis do anticorpo 13F1 humanizado foram designadas SEQ ID NOs: 143 e 141, respectivamente. As sequências de base dos DNAs que codificam as sequências de aminoácidos foram concebidas (SEQ ID NO: 140 e 142, respectivamente). As sequências de aminoácidos das cadeias leves variáveis e pesadas variáveis do anticorpo 7A4 humanizado foram designadas SEQ ID NOs: 133 e 131, respectivamente. As sequências de base dos DNAs que codificam as sequências de aminoácidos foram concebidas (SEQ ID NO: 130 e 132, respectivamente).

[00128] IgG1 e IgG4 dos anticorpos humanizados 7A4 e 13F1 foram produzidos (h13F1-IgG1, h13F1-IgG4, h7A4-IgG1 e h7A4-IgG4). A região constante IgG1 carrega a mutação D265A (Clynes

R, et al., Nature Medicine 6: 443-446 (2000)) enquanto que a região constante de IgG4 tem mutação dupla F234A e L235A (Xu D, et al, Cellular Immunology 200: 16-26 (2000)). As sequências da região constante são divulgadas em SEQ ID NOS: 150 e 151. As sequências completas de aminoácidos da cadeia leve e pesada para h13F1-IgG1 (SEQ ID NOs: 149 e 145), h13F1-IgG4 (SEQ ID NOs: 149 e 147), h7A4-IgG1 (SEQ ID NOs: 139 e 135), e h7A4-IgG4 (SEQ ID NOs: 139 e 137) são fornecidas na Tabela 3 acima. Para remover o potencial sítio de desamidação na cadeia leve de 7A4, o Asn85 é mutado para Asp (h7A4D). A região variável da cadeia leve (SEQ ID NO: 152) e as sequências de aminoácidos leves completas (SEQ ID NO: 153) também são fornecidas acima na Tabela 3.

[00129] Construção e expressão dos anticorpos 7A4, 7A4D e 13F1 humanizados

[00130] O DNA que codifica a cadeia leve e a cadeia pesada dos anticorpos 7A4, 7A4D e 13F1 humanizados foi sintetizado e clonado para o vetor de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen, CAT: # V-790). Células Freestyle 293 (200 mL a 10^6 /mL) foram transfectadas com 100µg de cada um dos plasmídeos de expressão de cadeia pesada e leve humanizados e cultivadas durante 6 dias. O anticorpo humanizado no sobrenadante foi então purificado com coluna Protein-G (GE Healthcare).

Exemplo 10: Caracterização de anticorpos humanizados anti-PD-1 em atividade de ligação e especificidade e atividade de bloqueio de ligando (PD-L1)

[00131] Após a geração e purificação de anticorpos 13F1-hIgG1, 13F1-hIgG4, 7A4-IgG1 e 7A4-hIgG4 humanizados, determinou-se a ligação e a especificidade dos anticorpos com base na ligação com base em ELISA e nas análises de bloqueio de PD-1, bem como

nas análises de bloqueio de PD-L1 e ligação com base em FACS. Os métodos usados foram semelhantes aos descritos acima nos Exemplos 2 e 4.

[00132] Nos ensaios de ligação com base em ELISA, os anticorpos 13F1 humanizados hu-13F1-hIgG1 e hu-13F1-hIgG4 exibiram ligação semelhante a PD-1 em comparação com o anticorpo quimérico 13F1-quimérico (**Figura 6A**, painel superior); e anticorpos 7A4 humanizados hu-7A4-D265A-hIgG1 e 7A4-huIgG4 exibiram ligação semelhante a PD-1 em comparação com os anticorpos 7A4 quiméricos (**Figura 6B**, painel superior). Em contraste, o anticorpo de controle de isotipo hIgG4 não exibiu ligação de PD-1. Os painéis inferiores da **Figura 6A** e da **Figura 6B** mostram a EC50 para cada um dos anticorpos testados, calculada a partir dos dados de ligação de ELISA, e demonstram que os anticorpos 13F1 e 7A4 humanizados exibiram ligação de PD-1.

[00133] De forma semelhante, nos ensaios de ligação com base em FACS, os anticorpos 13F1 humanizados hu-13F1-hIgG1 e hu-13F1-hIgG4 (**Figura 7A**, painel superior) e anticorpos 7A4 humanizados hu-7A4-D265A-hIgG1 e 7A4-huIgG4 (**Figura 7B**, painel superior) exibiram ligação a PD-1. A EC50 calculada a partir dos dados de ligação de FACS para os anticorpos 13F1 e 7A4 humanizados é mostrada na **Figura 7A** e na **Figura 7B**, respectivamente.

[00134] A **Figura 8** mostra os resultados dos ensaios de bloqueio de ligandos com base em ELISA para anticorpos 13F1 humanizados e 7A4 humanizados. Como mostrado na **Figura 8A** e na **Figura 8B**, o 13F1 os anticorpos 13F1 e 7A4 humanizados, respectivamente, exibiram atividade semelhante de bloqueio do ligando em relação ao anticorpo quimérico correspondente. A

quantificação da IC50 para cada um dos anticorpos humanizados e quiméricos é mostrada na **Figura 8C**.

[00135] A **Figura 9** mostra que cada um dos anticorpos humanizados 13F1 e 7A4 humanizado bloqueou a ligação de PD-L1 como medido por ensaio de bloqueio de ligando com base em FACS. O painel inferior da **Figura 9** fornece a IC50 para cada um dos anticorpos humanizados.

Exemplo 11: Análise cinética Biacore dos anticorpos anti-PD-1 humanizados 13F1, 7A4 e 7A4D

[00136] Para caracterizar as características de ligação dos anticorpos humanizados, a ligação cinética entre PD-1 e anticorpos PD-1 foi medida por Biacore3000 e gravadas com uma taxa de coleta de dados de 1 Hz. A IgG anti-camundongo de coelho policlonal (GE, BR-1008-38) foi diluída com 10 mM de acetato de sódio pH 5,0 e imobilizada em células de referência e de fluxo de experiência de um chip biossensor CM5 para cerca de 15000 RU utilizando um kit de acoplamento de amina (GE, BR10050). No início de cada ciclo, o anticorpo de teste diluído (1,5 µg/mL) foi injetado sobre a célula de fluxo da experiência durante 1 minuto para ser capturado. As séries de analitos de PD-1 foram preparadas diluindo os estoques com tampão de execução até 100 nM seguido por diluição em série 2X no mesmo tampão até 0,78 nM. Os analitos foram injetados em série ao longo das células de fluxo de referência e experimentais durante 3 minutos a uma taxa de fluxo de 30 µL/minuto. Em seguida, deixou-se passar o tampão de execução (PBS com P20 a 0,05%) durante 10 minutos a uma taxa de fluxo de 30 µL/minuto. No final de cada ciclo, a superfície do biossensor foi regenerada com 3 minutos de injeção de tampão

Glicina-HCl pH 1,7 10 mM a uma taxa de fluxo de 10 µL/minuto. Para cada injeção de amostra de analito (isto é, cada ciclo), as respostas de ligação obtidas a partir da superfície do biossensor experimental foram duplamente referenciadas por subtração de respostas registradas simultaneamente a partir da superfície de referência seguida de subtração adicional das respostas de uma única amostra de tampão de execução referenciada. As constantes de associação e de velocidade de dissociação (k_a e k_d) foram determinadas simultaneamente pela aplicação de sensogramas de referência dupla de toda a série de titulação ao modelo de Langmuir (1: 1) usando o software Biaevaluation 4.0. A constante de dissociação, KD , foi calculada a partir das constantes de velocidade determinadas pela relação $KD = k_d/k_a$. Como mostrado nas **Figuras 10 e 17A**, os anticorpos anti-PD-1 humanizados 13F1, 7A4, e 7A4D ligaram a PD-1 humana com elevada afinidade. As curvas de ligação de Biocore são mostradas nas **Figuras 10 e 17A**, painel superior, e os dados de ligação quantificados são resumidos nas **Figuras 10 e 17A**, painel inferior. A **Figura 17B** indica a IC_{50} de bloqueio da ligação de PD-L1 a células 293T-PD1 por anticorpo 7A4D-hIgG4.

Exemplo 12: Efeito de anticorpos anti-PD-1 humanizados na produção de citocinas em uma reação de linfócitos mistos (MLR)

[00137] Foram utilizadas reações de linfócitos mistos (MLR) para demonstrar a capacidade dos anticorpos humanizados para bloquear a via PD-1 em células efetoras de linfócitos. As células T no ensaio foram testadas quanto à secreção de $IFN\gamma$ e IL-2 na presença ou ausência de anticorpos anti-PD-1. As células T $CD4^+$ humanas foram purificadas a partir de PBMC humano utilizando um kit de isolamento de seleção de $CD4$ negativo

(Miltenyi Biotech, cat # 130-091-155). As células dendríticas imaturas (DC) foram derivadas de monócitos isolados a partir de PBMC humanos utilizando o Mo-DC Generation Toolbox (Miltenyi, cat # 130-093-568). As células foram cultivadas com meio de diferenciação Mo-DC durante 7 dias e foram então induzidas a serem DC maduras com meio de maturação Mo-Dc durante 2 dias. Para configurar o MLR, 10^5 de células T purificadas e 10^4 de células alogênicas maduras DC em um volume total de 200 μ l foram adicionadas a cada poço. O anticorpo de teste foi ensaiado em um intervalo de concentrações de 20 μ g/ml a 0,002 μ g/ml. Nenhum anticorpo ou um anticorpo de controle de isotipo (hIgG4) foi utilizado como controle negativo. As células foram cultivadas durante 5 dias a 37°C. No 6º dia, os níveis de IFN- γ e IL-2 no meio de cultura foram medidos utilizando o kit IL-2 ELISA (eBioscience) e hIFN- γ ELISA kit (R&D, cat#DY285). Para anticorpos 13F1 humanizados, os resultados são mostrados na **Figura 11** (IL-2) e na **Figura 12** (produção de IFN- γ). Cada um dos anticorpos 13F1 humanizados promoveu a produção de IL-2 e IFN γ de uma forma dependente da concentração. Da mesma forma, os anticorpos 7A4 e 7A4D humanizados promovem a produção de IL-2 (**Figuras 13 e 18**) e IFN γ (**Figuras 14 e 19**) de uma forma dependente da concentração. As culturas contendo o anticorpo de controle de isotipo não mostraram increase na secreção de IFN- γ e IL-2. Assim, os resultados do estudo mostraram que os anticorpos PD-1 humanizados bloqueiam a via PD-1, estimulando respostas imunes de células T.

Exemplo 13: A resposta humana da retirada de células T ao desafio do toxoide do tétano é aumentada pelo anticorpo anti-PD-1 humanizado

[00138] Para investigar se o acionamento do receptor de células T específico do antígeno foi modulado bloqueando a via PD-1/PD-L1 com anticorpos anti-PD-1, utilizou-se o ensaio de retirada de células T humanas utilizando o antígeno tetânico toxoide (TT) para estimular células T de memória pré-existentes no sangue de doadores imunizados TT saudáveis. Para este fim, as PBMC novas recentemente coletadas (amostras coletadas em menos de 1 ano) de doadores imunizados com TT foram colocadas em placas de fundo redondo de 96 poços (costar, cat # 3799) a 4×10^5 células/poço utilizando RPMI1640 (Invitrogen, cat # A10491-01) suplementado com 80 U/ml de penicilina, 80 g/ml de estreptomicina e 30% de soro autólogo. Anticorpos 13F1 ou 7A4 humanizados foram adicionados a várias concentrações e estimulados com 0,1 ug/ml de SEB e 1 ug/ml de TT (Astarte Biologies). Após cocultura durante 7 dias a 37° C, 5% de CO₂, o sobrenadante foi colhido e a concentração de IFN- γ foi medida. Os resultados do estudo são mostrados na **Figura 15**, e demonstram que, em comparação com o antígeno TT sozinho, o bloqueio de PD-L1 com anticorpos anti-PD-1 resultou em uma secreção aumentada de IFN- γ pelas células T de memória.

Exemplo 14: Efeito do anticorpo anti-PD-1 humanizado sobre a ativação de células T autólogas

[00139] Neste exemplo, examinou-se o efeito de bloquear a via PD-/PD-L1 pelo anticorpo anti-PD-1 humanizado na ativação de células T. As células T CD4 + humanas purificadas (Mitenyi Biotech, cat # 130-091-155) foram ativadas com anticorpo solúvel anti-CD3 (R & D, cat # MAB100) 1 μ g/ml na presença de células dendríticas derivadas de monócitos autólogos (DCs). Após três

dias de ativação na presença ou ausência de anticorpo anti-PD-1 titulado, o meio de cultura foi colhido e a concentração de IFN γ foi medida com ELISA. Os resultados são mostrados na **Figura 16** e indicam que o bloqueio de PD-L1 por anticorpos anti-PD-1 potencializou a secreção de IFN- γ pelas células T.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo que se liga a PD-1 **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende:

(i) uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo as SEQ ID NOs: 34, 35 e 36, respectivamente, e uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo as SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente;

(ii) uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo as SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, respectivamente, e uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo as SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente;

(iii) uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo as SEQ ID NOs: 65, 66 e 67, respectivamente, e uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo as SEQ ID NOs: 60, 61 e 62, respectivamente;

(iv) uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo as SEQ ID NOs: 105, 106 e 107, respectivamente, e uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo as SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, respectivamente; ou

(v) uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo as SEQ ID NOs: 115, 116 e 117, respectivamente, e uma sequência de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo as SEQ ID NOs: 110, 111 e 112, respectivamente;

em que o fragmento do mesmo é selecionado a partir do grupo que consiste em um scFv, um fragmento Fab, um fragmento Fab' e um fragmento F(ab)'.

2. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve

compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 34, 35 e 36, respectivamente; e uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 29, 30 e 31, respectivamente.

3. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, respectivamente; e uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, respectivamente.

4. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 65, 66 e 67, respectivamente; e uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 60, 61 e 62, respectivamente.

5. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 105, 106 e 107, respectivamente; e uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, respectivamente.

6. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 115, 116 e 117, respectivamente; e uma CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia pesada

compreendendo uma sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 110, 111 e 112, respectivamente.

7. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo é quimérico ou humanizado.

8. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende:

(i) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 33 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 28;

(ii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 54 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 49;

(iii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 64 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 59;

(iv) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 104 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 99;

(v) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 114 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 109;

(vi) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 143 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 141; ou

(vii) uma região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO: 152 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO: 131.

9. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve de acordo com as SEQ ID NOs: 133 ou 152 e uma região variável de cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 131.

10. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo compreende uma região variável de cadeia leve de acordo com a SEQ ID NO: 143 e uma região variável de cadeia pesada de acordo com a SEQ ID NO: 141.

11. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

12. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo é ligado ou conjugado a um agente terapêutico.

13. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico é uma droga citotóxica, um isótopo radioativo, um imunomodulador ou um anticorpo.

14. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo possui uma afinidade por PD-1 de 1 nM a 0,01 nM.

15. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo possui uma afinidade por PD-1 de 1 nM ou menos.

16. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou

fragmento do mesmo possui uma afinidade por PD-1 de 0,1 nM ou menos.

17. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo possui uma EC50 de ligação de 5 ng/mL a 1000 ng/mL.

18. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo bloqueia a ligação de PD-1 a PD-L1.

19. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo bloqueia a ligação de PD-1 a PD-L1 ou PD-L2 a uma IC50 de 5 ng/mL a 1000 ng/mL.

20. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento aumenta a ativação das células T conforme medido pela produção de citocinas inflamatórias.

21. Anticorpo isolado ou fragmento do mesmo, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo aumenta a produção de IL-2 e IFN γ de células T.

22. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, e um carreador farmacologicamente aceitável.

23. Polinucleotídeo isolado **caracterizado** pelo fato de que codifica o anticorpo ou fragmento do mesmo, conforme definido na reivindicação 1, em que:

(i) a cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 32 e a cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 27;

(ii) a cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 53 e a cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 48;

(iii) a cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 63 e a cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 58;

(iv) a cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 103 e a cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 98; ou

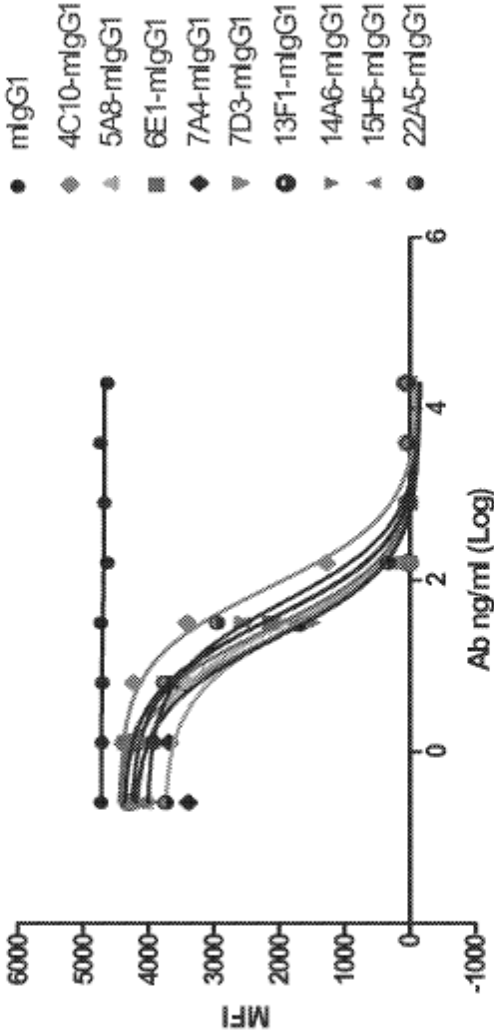
(v) a cadeia leve compreende a SEQ ID NO: 113 e a cadeia pesada compreende a SEQ ID NO: 108.

24. Vetor de expressão **caracterizado** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo isolado, conforme definido na reivindicação 23.

25. Uso de um anticorpo ou fragmento do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21, **caracterizado** por ser na fabricação de um medicamento ou composição farmacêutica para tratar câncer ou uma doença infecciosa em um paciente em necessidade do mesmo, preferencialmente em que o câncer é selecionado do grupo que consiste em linfoma, leucemia, melanoma, glioma, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer ósseo, câncer de ovário, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer retal, câncer testicular, câncer salivar, câncer de tireóide, câncer do timo, câncer epitelial, câncer de cabeça ou pescoço, câncer gástrico, câncer pancreático ou uma combinação dos mesmos; ou em que a doença infecciosa é selecionada a partir do grupo que consiste em candidíase, candidemia, aspergilose, pneumonia estreptocócica, condições de pele e de orofaringe estreptocócicas, sepse gram negativa, tuberculose, mononucleose, influenza, doença respiratória causada pelo Vírus Sincicial Respiratório, malária, esquistossomose e tripanossomíase.

FIGURA 1A

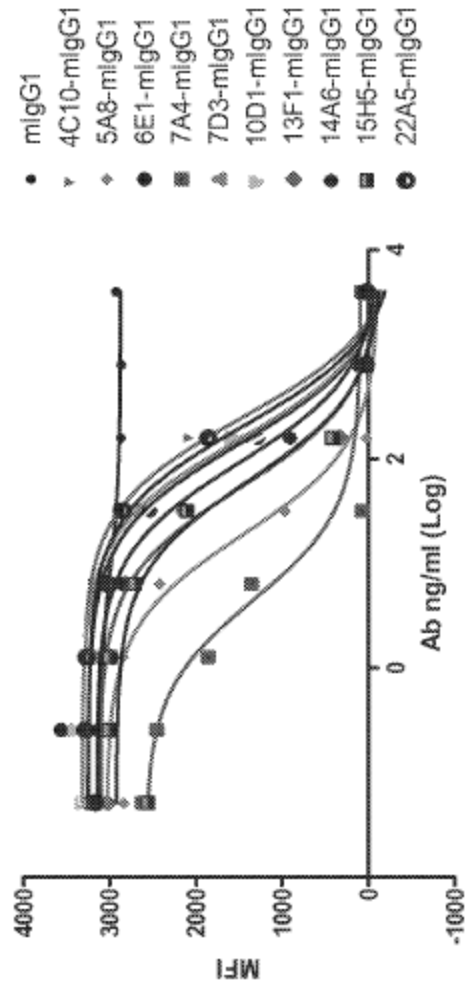
BLOQUEIO DE LIGAÇÃO DE PDL1 A CÉLULAS 293T-PD1 POR Abs ANTI-PD1



ng/ml	mIgG1	4C10-mIgG1	5A8-mIgG1	6E1-mIgG1	7A4-mIgG1	7D3-mIgG1	13F1-mIgG1	14A6-mIgG1	15H5-mIgG1	22A5-mIgG1
IC50		83.32	28.22	26.85	28.85	38	19.86	21.13	35.64	56.22

FIGURA 1B

BLOQUEIO DE LIGAÇÃO DE PDL2 A CÉLULAS 293T-PD1 POR Abs ANTI-PD1



ng/ml	mlgG1	4C10-mlgG1	5A8-mlgG1	6E1-mlgG1	7A4-mlgG1	7D3-mlgG1	10D1-mlgG1	13F1-mlgG1	14A6-mlgG1	15H5-mlgG1	22A5-mlgG1
IC50		250.7	18.84	113.7	4.449	140.5	150	52.93	91.98	63.04	210.1

FIGURA 2

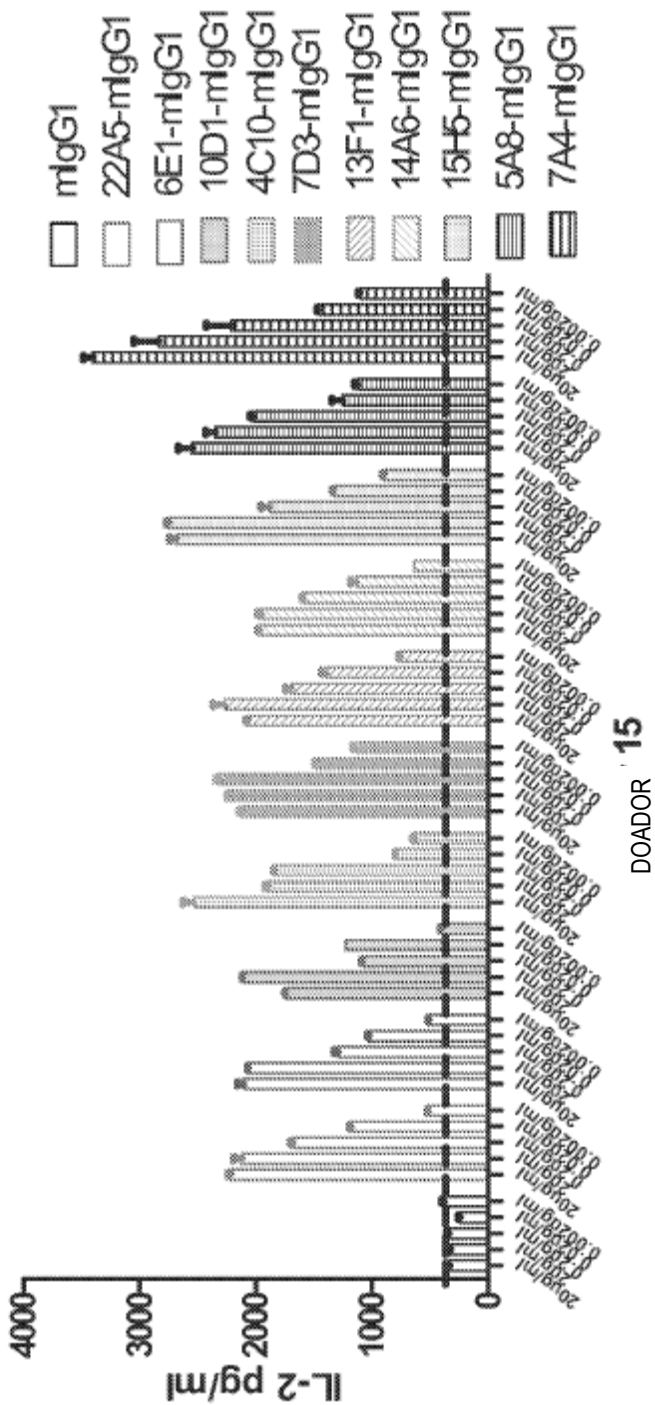


FIGURA 3

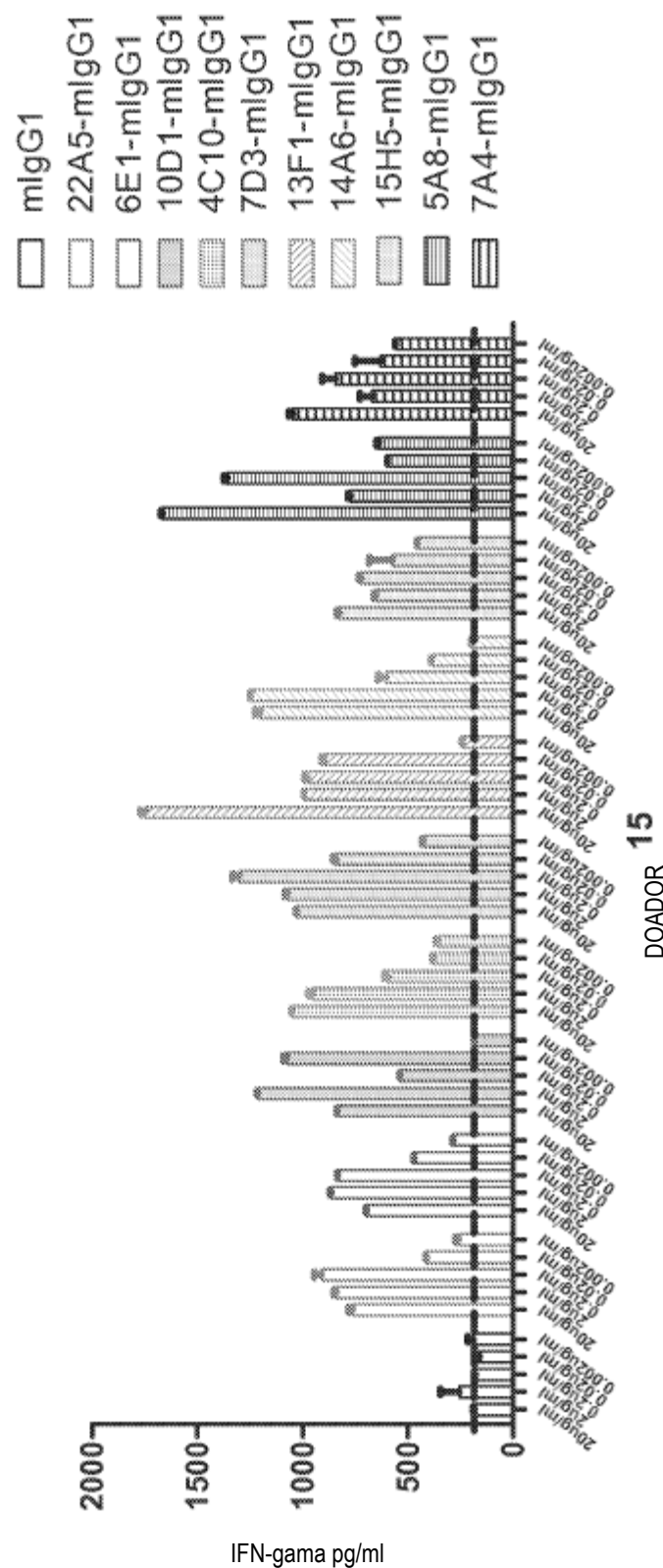


FIGURA 4

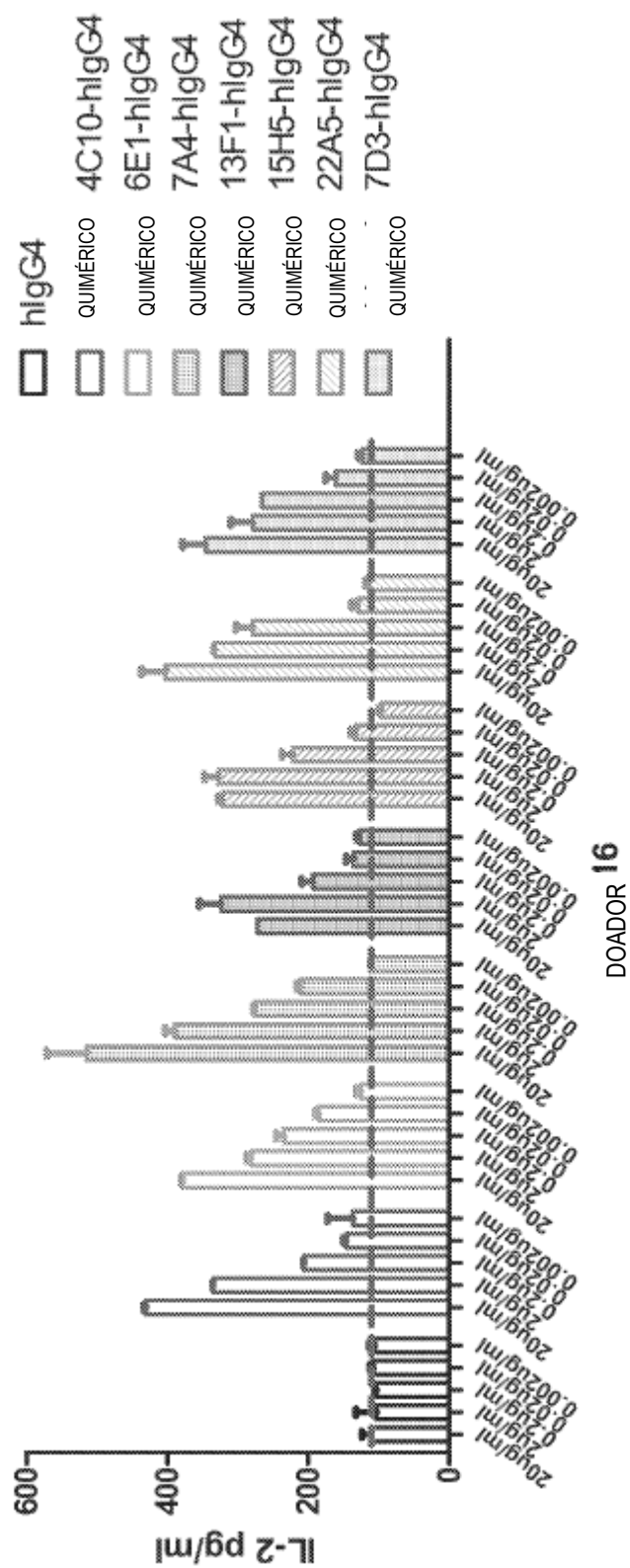


FIGURA 5

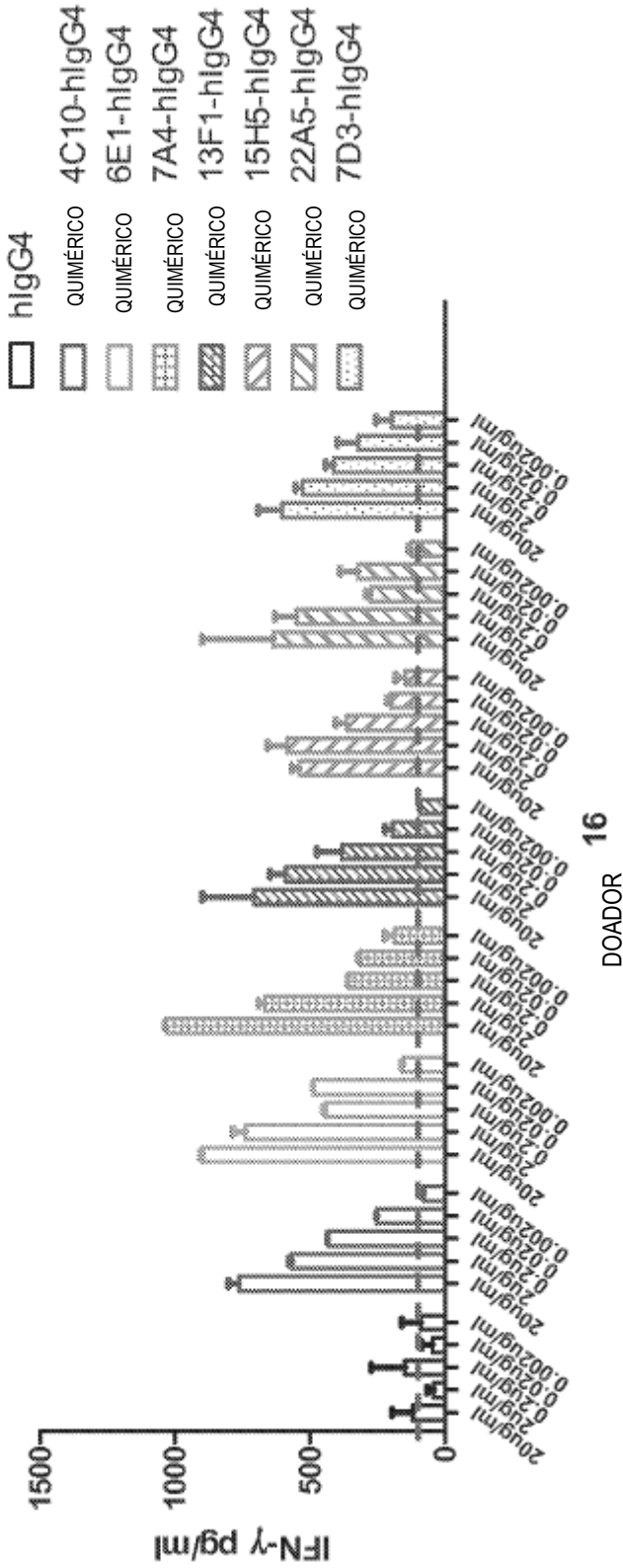


FIGURA 6

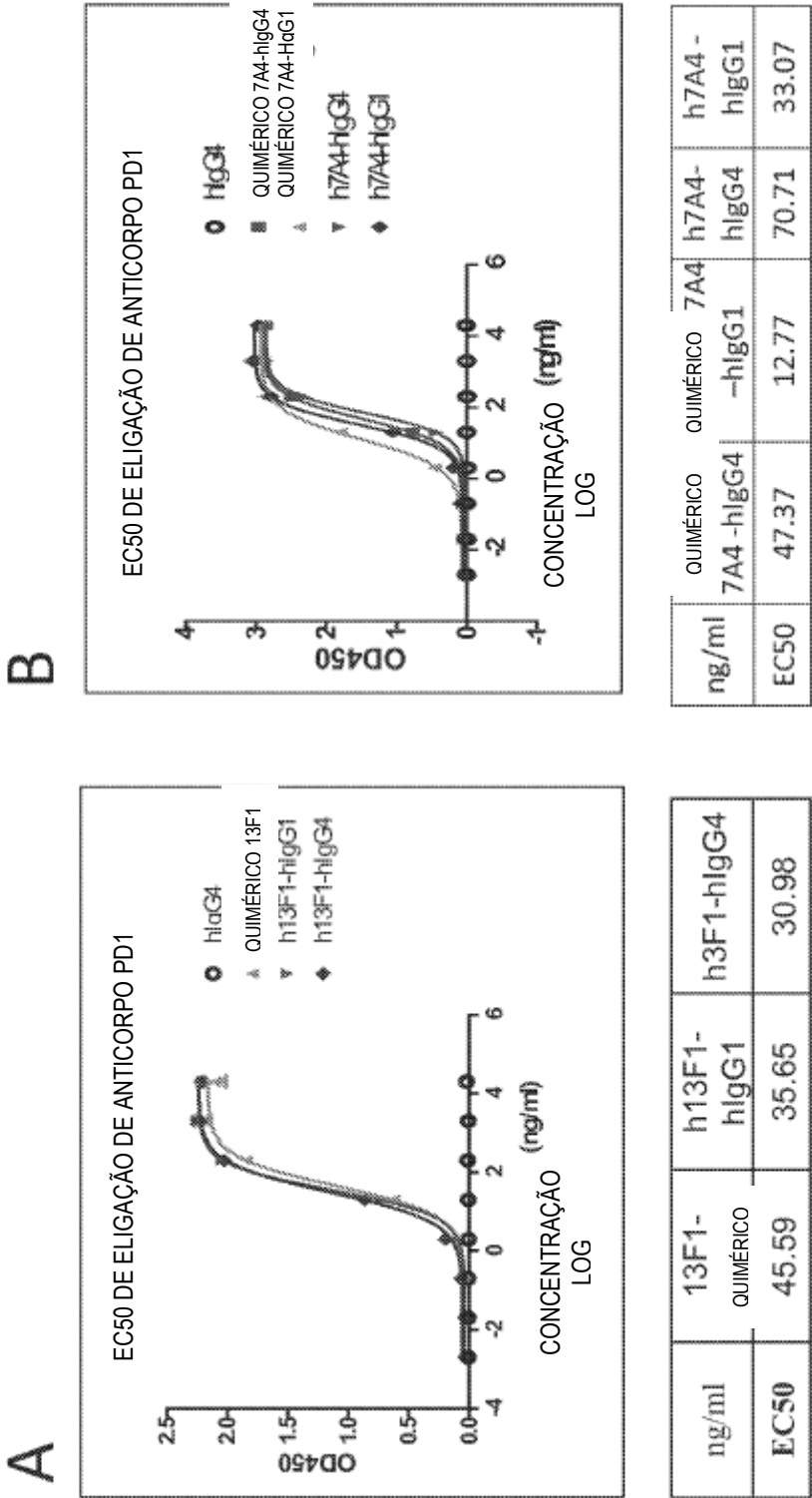
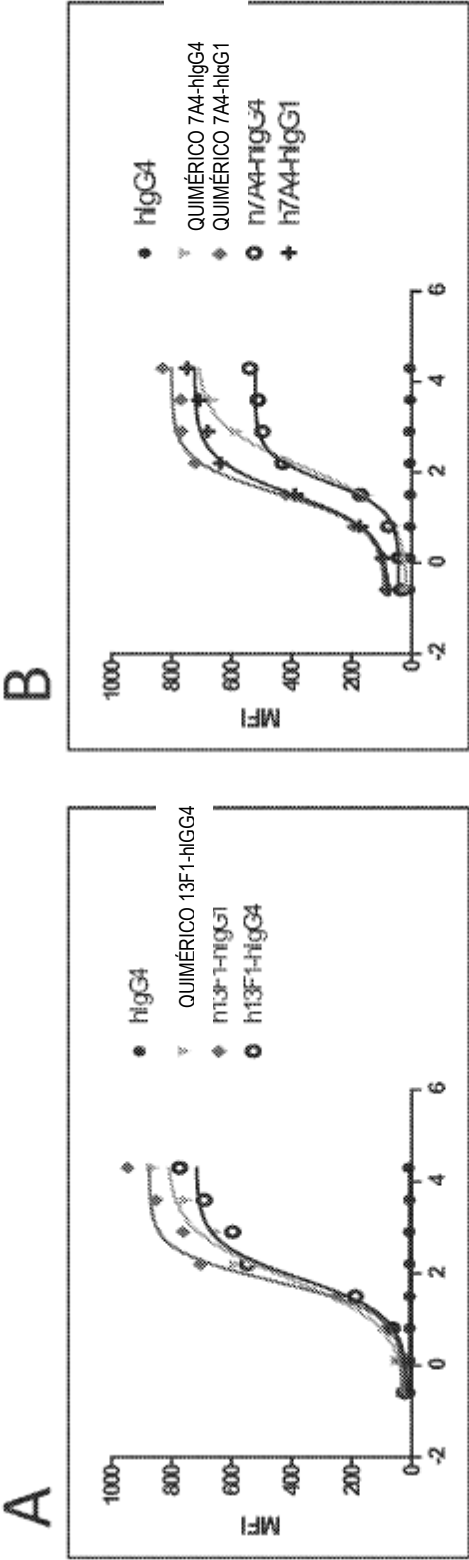


FIGURA 7



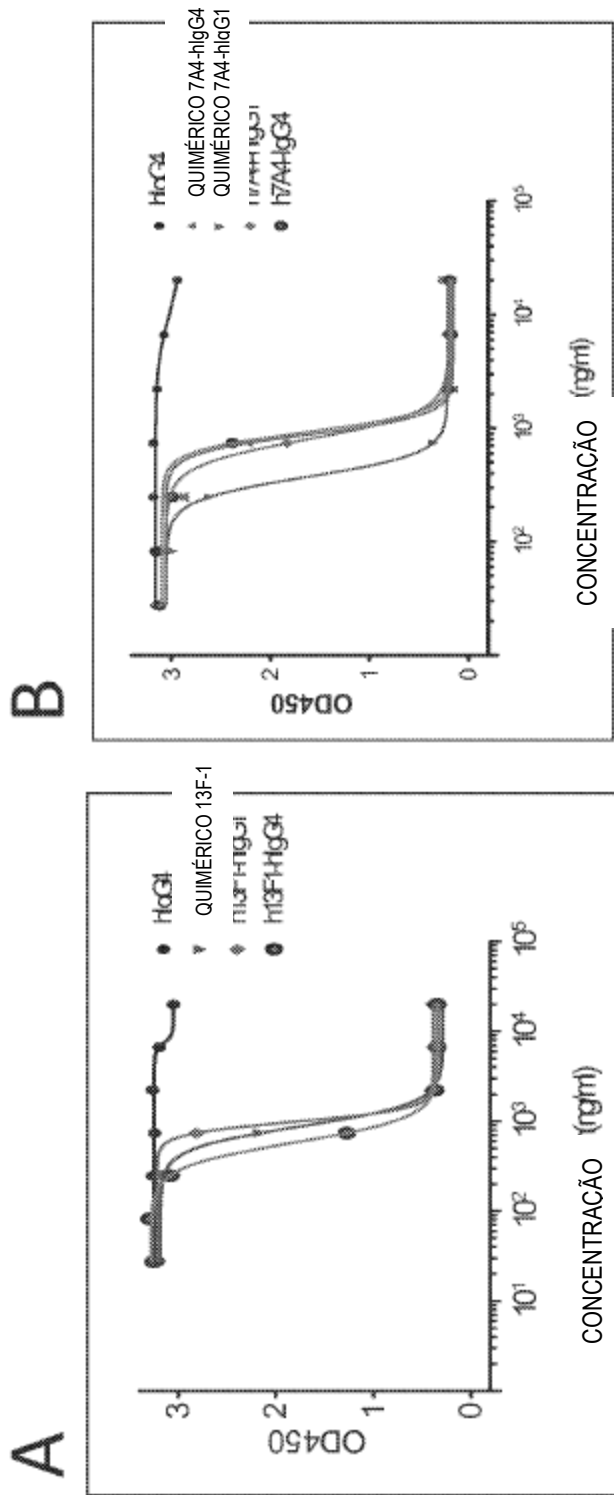
CONCENTRAÇÃO DE Ab (log) (ng/ml)

ng/ml	QUIMÉRICO 13F1-hlgG4	h13F1-hlgG1	h3F1-hlgG4
EC50	81.48	66.83	76.26

CONCENTRAÇÃO DE Ab (log) (ng/ml)

ng/ml	QUIMÉRICO 7A4-hlgG4	QUIMÉRICO 7A4-hlgG1	h7A4-hlgG4	h7A4-hlgG1
EC50	137.3	33.73	62.14	33.2

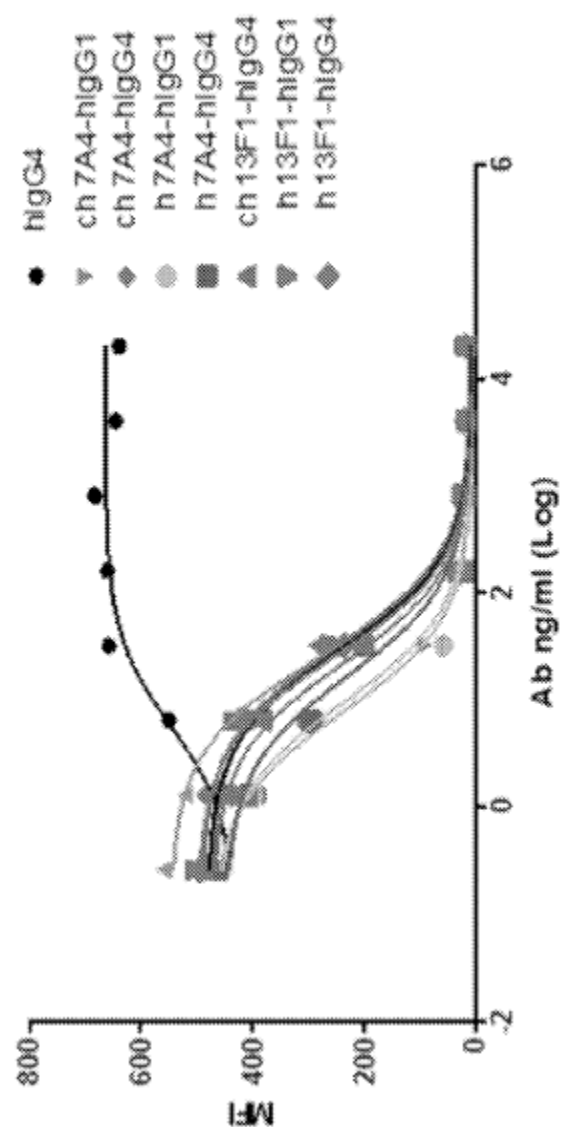
FIGURA 8



C

ng/ml	Ch13F1	h13F1-hIgG1	h13F1-hIgG4	Ch 7A4-hIgG1	7A4-hIgG1	7A4-hIgG4
IC50	878.4	985.4	579.0	355.8	763.0	885.8

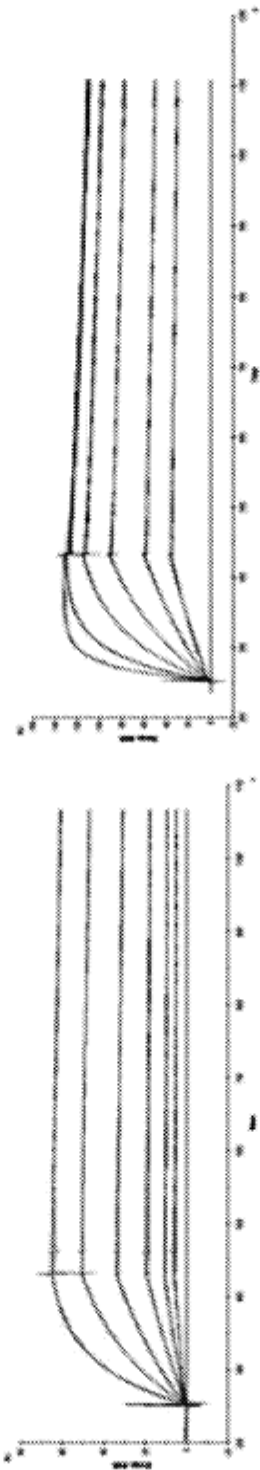
FIGURA 9



ng/ml	hlgG4	h7A4-hlgG1	h7A4-hlgG4	h13F1-hlgG1	h13F1-hlgG4
IC50	NA	7.606	16.85	29.46	25.97

FIGURA 10

h7A4-hIgG1



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	QUI 2
h13F1-hIgG4	6.87E+05	1.19E-04	5.78E+09	1.73E-10	0.0667
h7A4-hIgG1	2.09E+06	2.12E-04	9.82E+09	1.02E-10	0.322

FIGURA 11

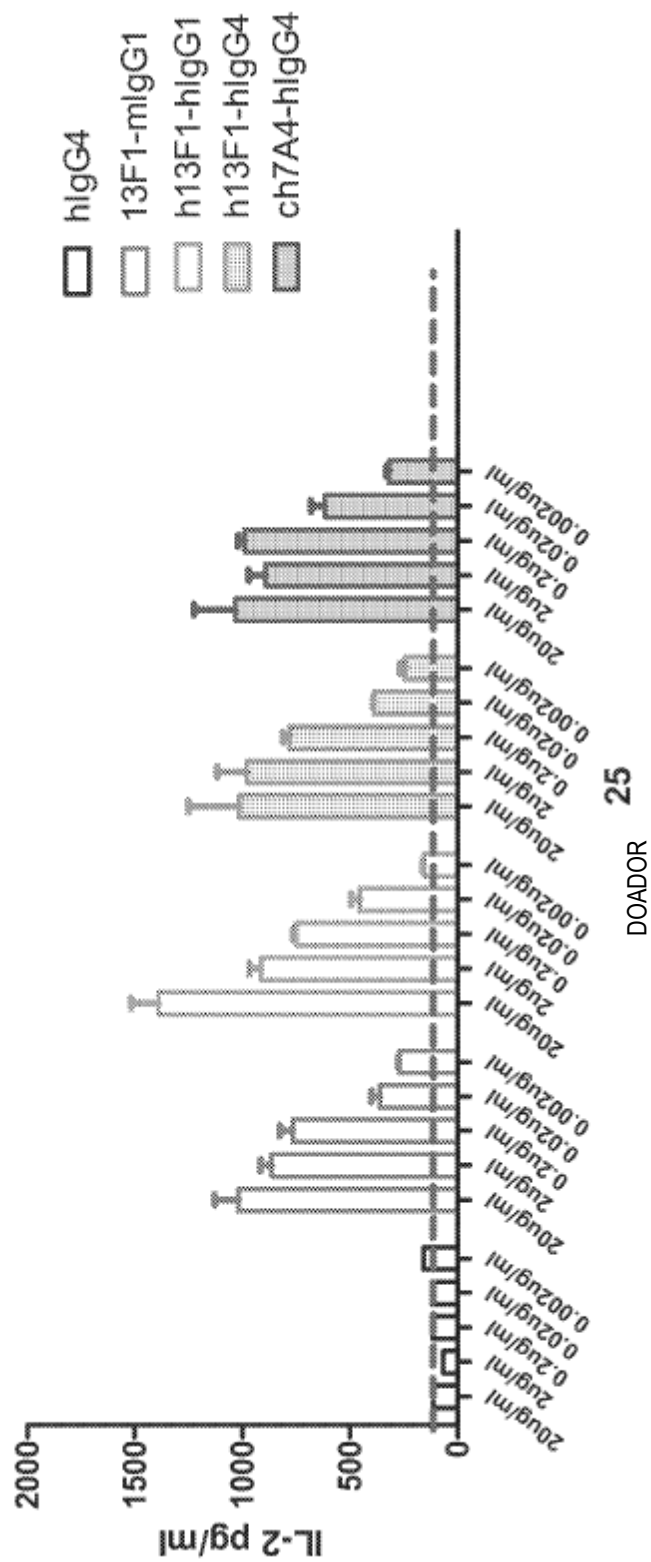


FIGURA 12

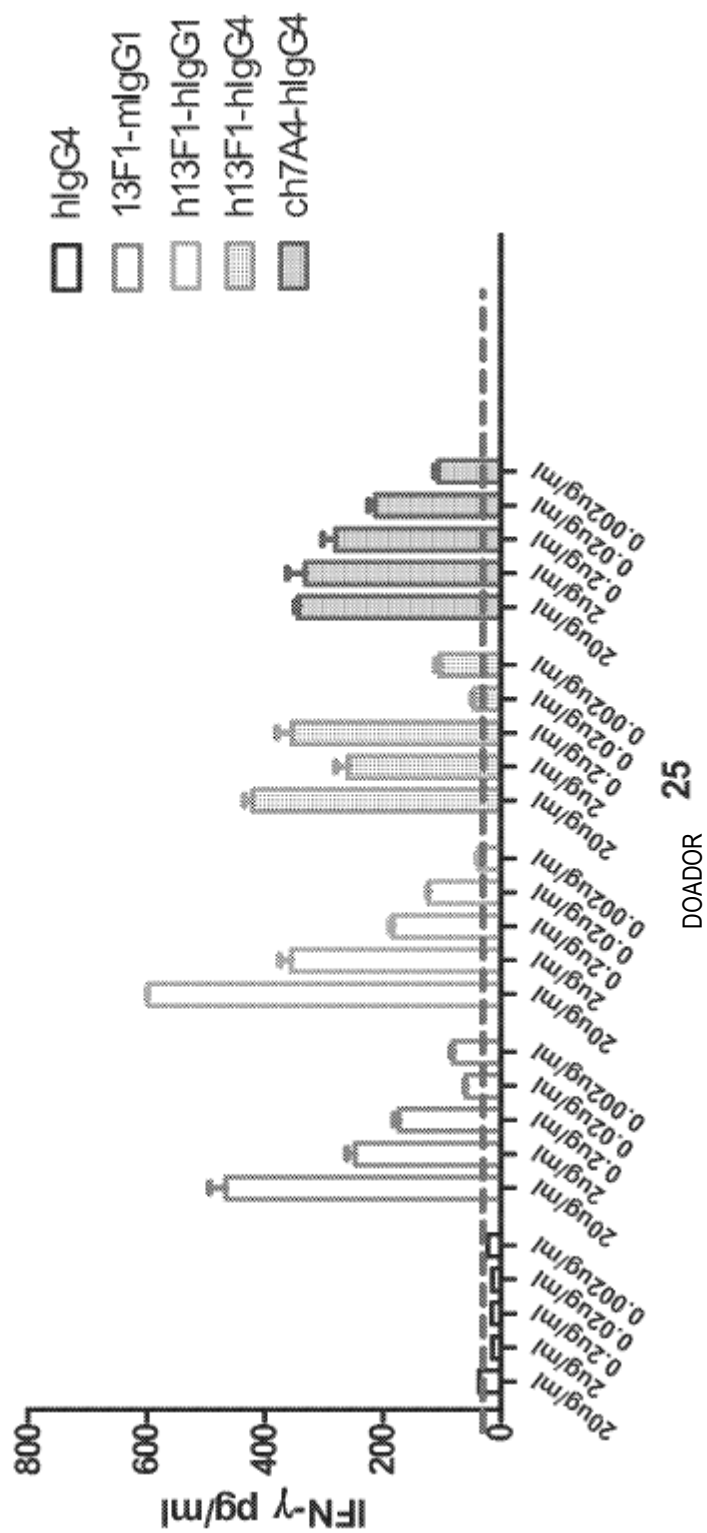


FIGURA 13

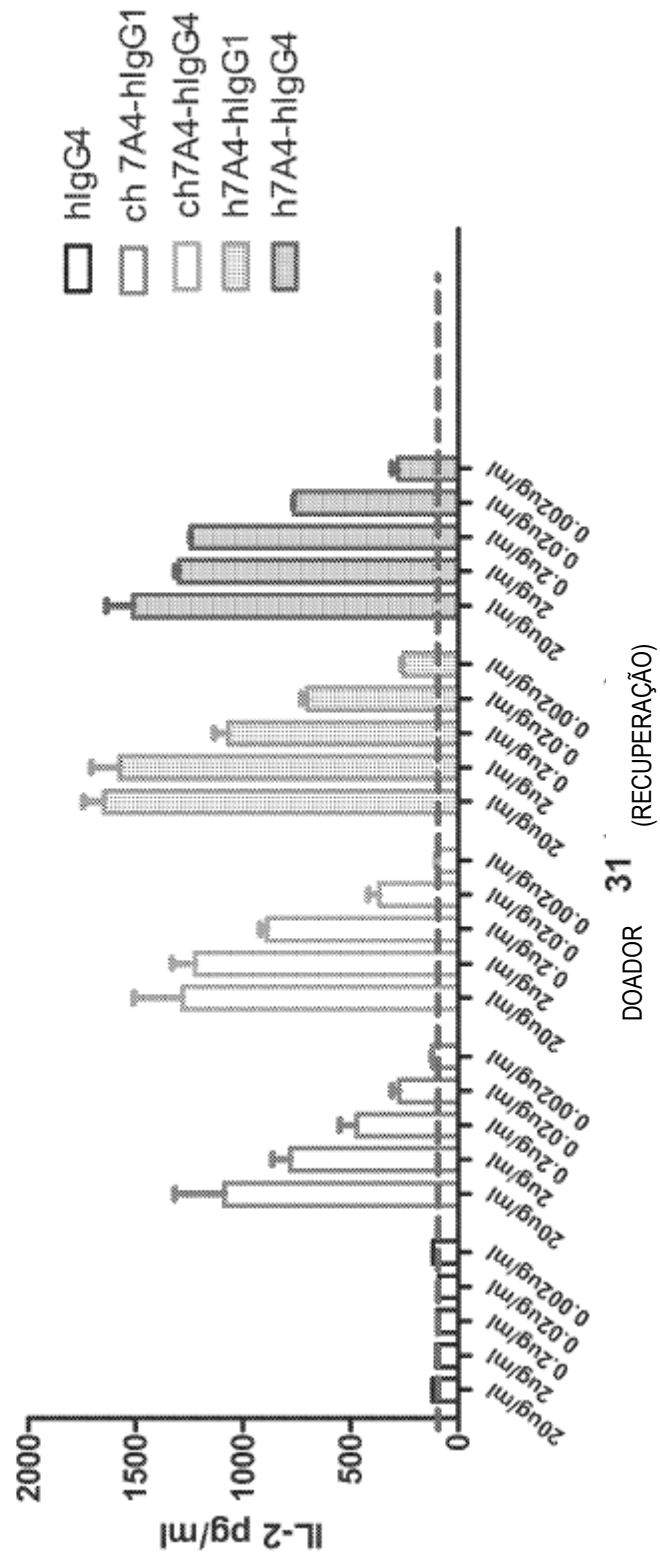


FIGURA 14

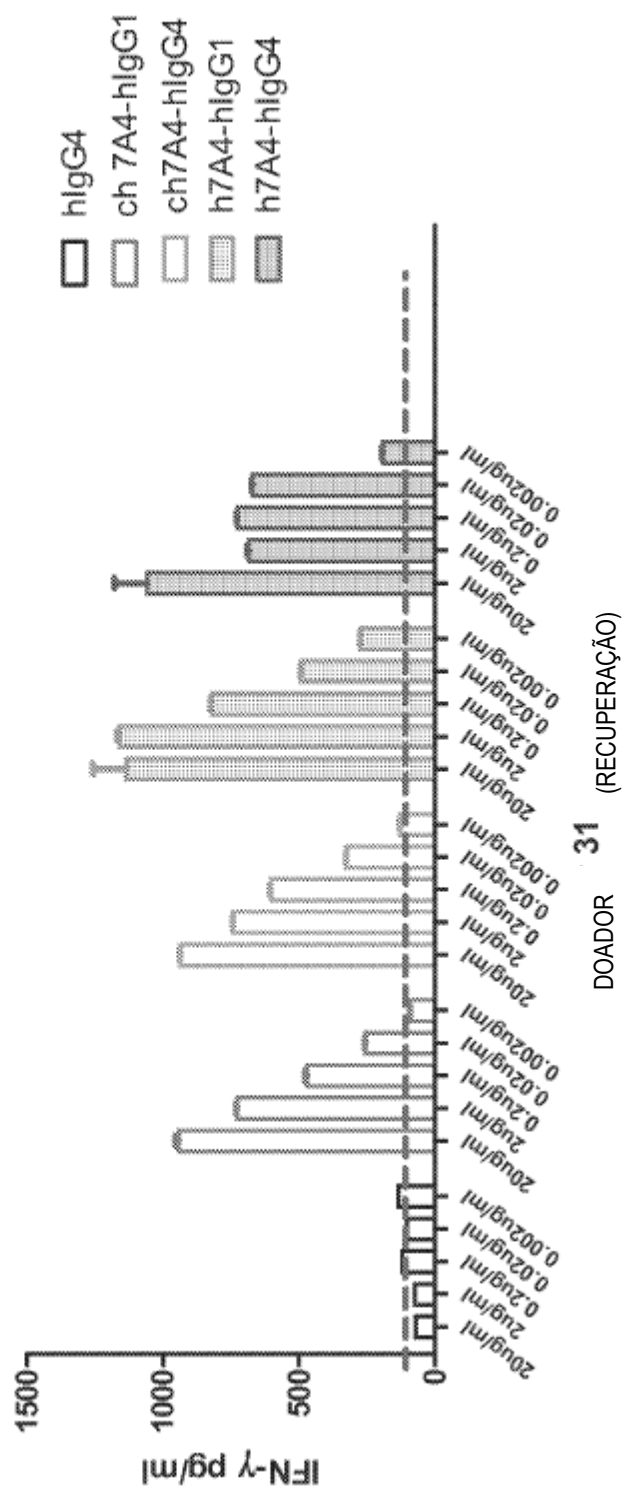


FIGURA 15

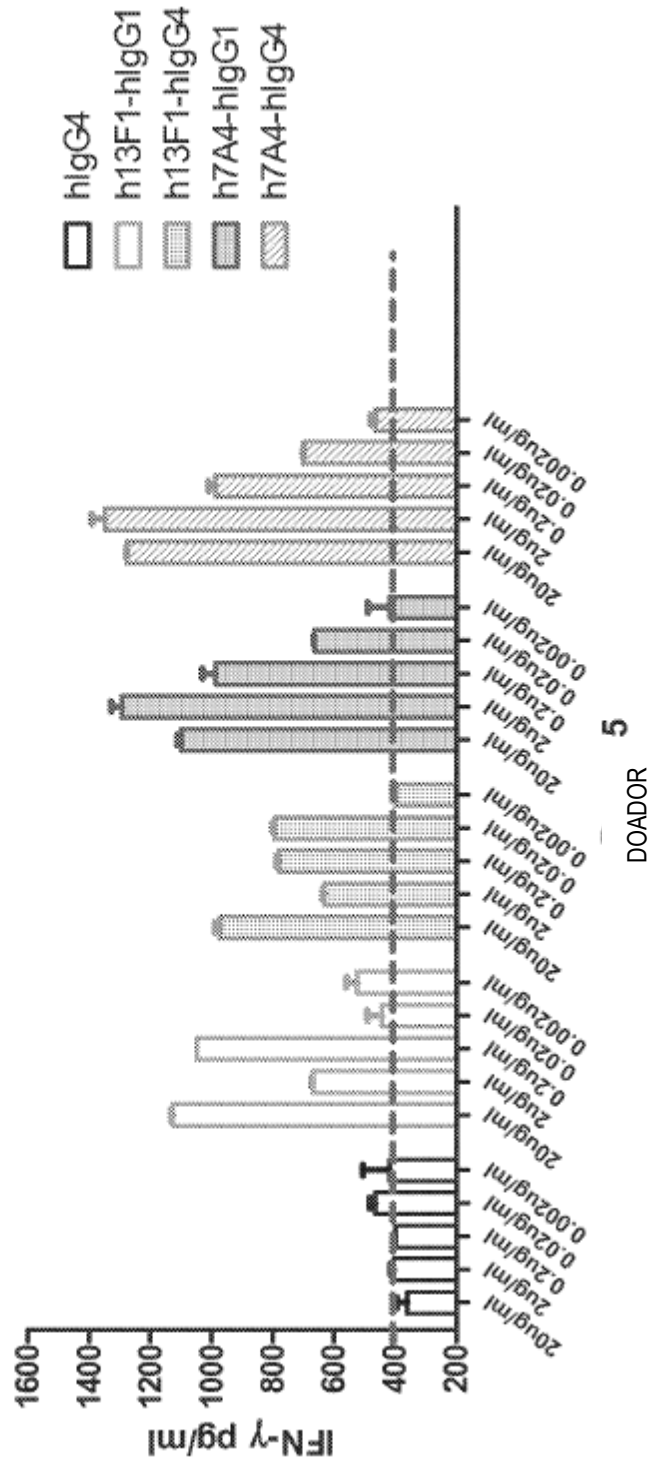


FIGURA 16

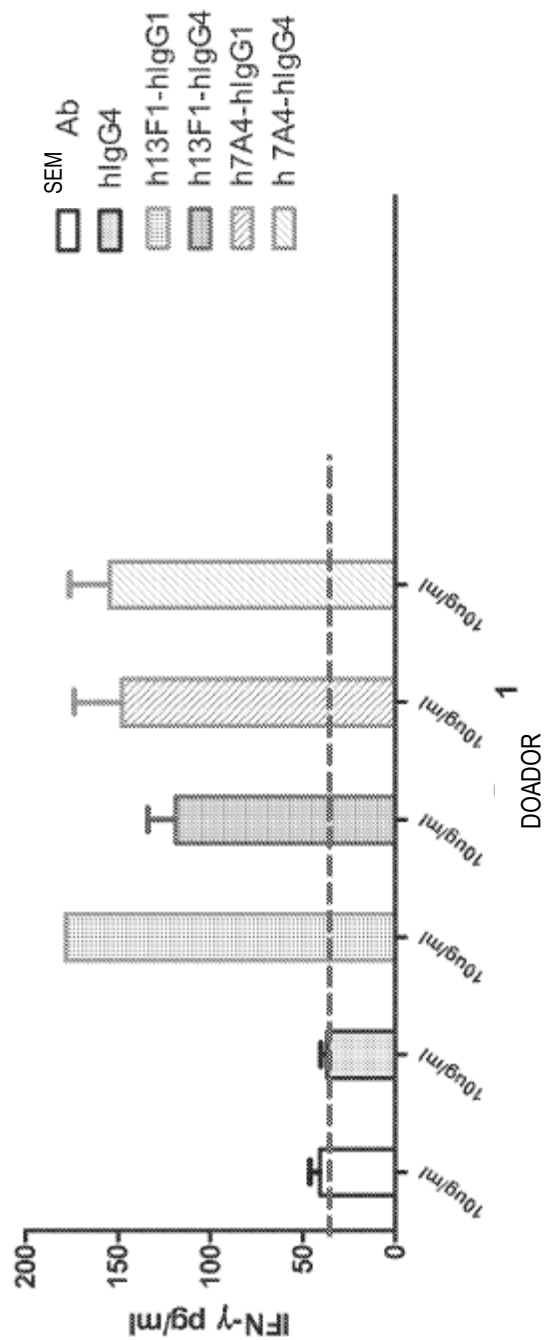
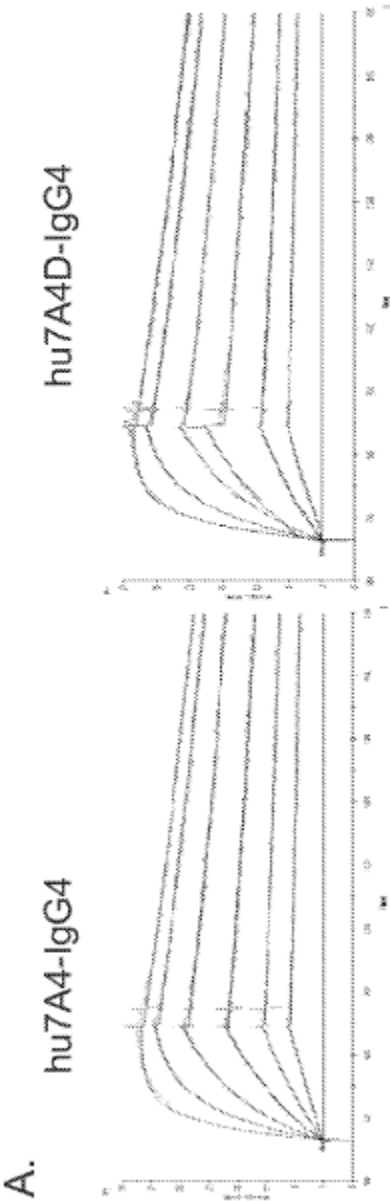


FIGURA 17



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	QUI2
h7A4-hIgG4	1.46E+06	4.98E-04	2.93E+09	3.42E-10	0.0552
h7A4D-hIgG4	1.36E+06	5.32E-04	2.55E+09	3.91E-10	0.0549

B.

ANTICORPO	RI OQIUFIO RASFADO FM FACS
7A4D-hIgG4	IC50 (ng/ml) 25.8

FIGURA 18

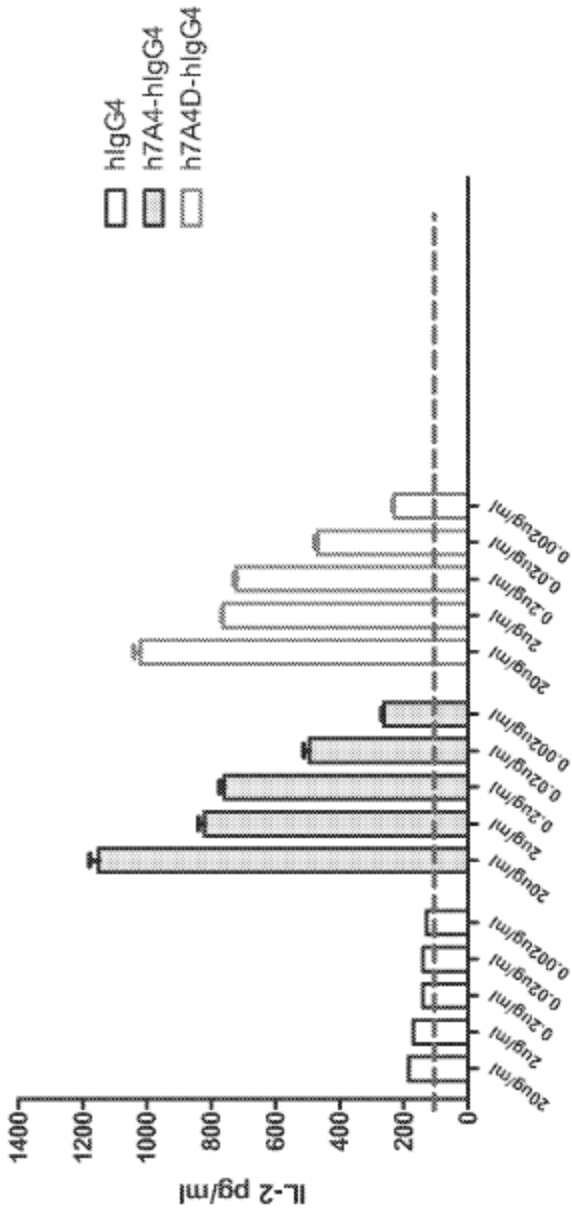


FIGURA 19

