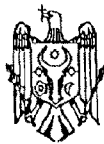




MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3370768 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/395 (2006.01.01)
C12N 15/13 (2006.01.01)
C07K 16/18 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
C07K 16/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0896 (22) Data de depozit: 2016.11.01 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16862773.5, 2016.11.01 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3370768, 2018.09.12 (31) Numărul cererii prioritare: 201562250095 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.11.03 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2022, 2022.07.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 02/2022, 2022.01.12 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 10/2018, 2018.10.31
(71) Solicitant: JANSSEN BIOTECH, INC., US (72) Inventatori: VERONA Raluca, US; POWERS Gordon, US; SABINS Nina Chi, US; DEANGELIS Nikki A., US; SANTULLI-MAROTTO Sandra, US; WIEHAGEN Karla R., US; WU Sheng-Jiun, US; FERRANTE Catherine, US; UBANI Enrique-Zudaire, US (73) Titular: JANSSEN BIOTECH INC., US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Anticorpi care se leagă specific la PD-1 și utilizări ale lor

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la anticorpi care se leagă specific la PD-1, TIM-3 sau PD-1 și TIM-3, polinucleotide care codifică anticorpii sau fragmentele, și metode de producere și utilizare a celor anterioare.

2

Secvențe: 312
Revendicări: 15
Figuri: 22

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

54) Antibodies specifically binding pd-1 and their uses**(57) Abstract:**

1
The present invention relates to
antibodies specifically binding PD-1,
polynucleotides encoding the antibodies or
fragments, and methods of making and using

2
the foregoing.
Sequences: 312
Claims: 15
Fig.: 22

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****LISTĂ DE SECVENȚE**

5 Această aplicație conține o listă de secvențe depusă prin EFS-Web. Fișierul text ASCII, creat pe 28 octombrie 2016, este denumit JBI5071WOPCT_ST25.txt și este de dimensiune 418 kilobytes.

DOMENIUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la anticorpi care se leagă specific la PD-1, polinucleotide care codifică anticorpii sau fragmentele, și metode de realizare și utilizare ale celor anterioare.

BAZELE INVENȚIEI

Sistemul imunitar este strâns controlat de o rețea de liganzi și receptori costimulatori și coinhibitori. Aceste molecule furnizează semnale secundare pentru activarea celulelor T și furnizează o rețea echilibrată de semnale pozitive și negative pentru a maximiza răspunsurile imune împotriva infecției și tumorilor, în timp ce limitează autoimunitatea (Wang și colab., (Epub Mar. 7, 2011) J Exp Med 208(3):577-92; Lepenies și colab., (2008) Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 8:279-288).

Terapia punctului de control imun, ținerea căilor coinhibitoare în celulele T pentru a promova răspunsuri imune antitumorale, a condus la avansări în îngrijirea clinică a pacienților cu cancer.

PD-1 este o moleculă a punctului de control imun negativ care suprimă funcțiile celulelor CD4⁺ și CD8⁺T în micromediul tumoral (TME). Angajamentul PD-1 cu liganzii săi (PD-L1 și PD-L2) determină anergia și epuizarea celulelor T în tumori prin inhibarea multiplelor căi în aval ale semnalizării receptorului celulei T, conducând la o supraviețuire scăzută a celulei T, creștere și proliferare, funcții efectoare compromise, și metabolism alterat. Studiile preclinice au demonstrat că, blocarea căii PD-1 poate inversa epuizarea celulelor T și stimularea imunității antitumorale.

Calea PD-1 contribuie prin urmare la subreglarea funcțiilor celulei T în (TME) și evaziunea tumorilor prin distrugere imună. În TME, celulele T epuizate, în plus față de exprimarea nivelurilor ridicate de PD-1, exprimă alți inhibitori receptori incluzând CTLA-4, TIM-3, LAG-3, CD244, TIGIT și CD160 (vezi de exemplu, Pauken & Wherry; 2015, Trends in Immunology 36(4): 265-276).

TIM-3 este un receptor transmembranar care este exprimat pe celulele CD4⁺ Th1 (ajutătoare T 1) și celulele T CD8⁺ citotoxice care secretă IFN-γ. TIM-3 nu este exprimat în general pe celulele T naive ci mai degrabă suprareglat pe celulele T activate, efectoare. TIM-3 are un rol în reglarea imunității și toleranței *in vivo* (vezi Hastings și colab., (2009) Eur J Immunol 39(9):2492-501).

Anticorpii PD-1 au fost descriși de exemplu în: brevetele S.U.A. numerele 5.897.862 și 7.488.802, și în publicațiile de brevet internațional numerele WO2004/004771, WO2004/056875, WO2006/121168, WO2008/156712, WO2010/029435, WO2010/036959, WO2011/110604, WO2012/145493, WO2014/194302, WO2014/206107, WO2015/036394, WO2015/035606, WO2015/085847, WO2015/112900, WO2014/179664, WO2015/112800, și WO2015/112805.

Anticorpii TIM-3 au fost descriși de exemplu în: Monney și colab., Nature (2002) 415(6871):536-41, și în publicațiile de brevet internațional numerele WO2011/155607, WO2013/006490 și WO2015/117002.

Combinații cu anticorp TIM-3 și un anticorp PD-L1 au fost evaluate în de exemplu publicația de brevet internațional nr. WO2011/159877.

În timp ce anticorpii anti-PD-1/PD-L1 demonstrează răspuns clinic încurajator la pacienții cu multiple tumori solide, ratele de răspuns sunt încă destul de scăzute, de aproximativ 15% - 20% la pacienții pretratați (Swaika și colab., (2015) Mol Immunol. doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.009). BORCH TH și colab., „Reorienting the immune system in the treatment of cancer by using anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies“, drug discovery today, septembrie 2015, vol. 20, nr. 9, paginile 1127-1134 revizuieste utilizarea de anticorpi anti-PD-1 și anti-PD-L1 pentru a trata cancerul, prin reorientarea sistemului imunitar. LOTE H și colab., „PD-1 and PD-L1 blockade in gastrointestinal malignancies“, Cancer Treatment Reviews, septembrie 2015, vol. 41, nr. 10, ISSN 0305-7372, paginile 893-903 revizuieste utilizarea de anticorpi anti-PD-1 în cancerul gastrointestinal. FAGHFURI E și colab., „Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma“, Expert Review of Anticancer Therapy, ianuarie 2015, vol. 15, nr. 9, ISSN 1744-8328, paginile 981-93, descrie că nivolumab și pembrolizumab sunt doi anticorpi anti-PD-1 aprobați de FDA pentru tratarea melanomului malign. MCDERMOTT J și JIMENO A „Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer“, Drugs of Today, ianuarie 2015, vol. 51, nr. 1, ISSN 1699-3993, pagina 7, revizuieste Pembrolizumab (un anticorp anti-PD-1) și utilizarea sa în tratarea cancerului. MOREIRA DA SILVA R, „Nivolumab: Anti-PD-1 monoclonal antibody cancer immunotherapy“, Drugs of the Future, ianuarie 2014, vol. 39, nr. 1, ISSN 0377-8282, paginile 15-24, descrie anticorpul anti-PD-1 nivolumab și utilizarea

sa în terapia cancerului. WANG C și colab, „In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates“, Cancer Immunology Research, septembrie 2014, vol. 2, nr. 9, paginile 846-856, caracterizează nivolumab.

Prin urmare, există o necesitate pentru noi agenți terapeutici care să inhibe activitatea imunosupresivă a inhibitorilor punctului de control cum ar fi PD-1 și TIM-3, pentru a fi utilizați pentru imunoterapia cancerului și tratamentul altor afecțiuni care ar beneficia de ameliorarea unui răspuns imun, cum ar fi infecțiile cronice.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

Invenția este stabilită în setul anexat de revendicări.

În particular, invenția furnizează un anticorp antagonistic izolat care se leagă specific la PD-1 sau la o porțiune care se leagă la antigen a acestuia, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56.

Invenția furnizează de asemenea o compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul sau porțiunea care se leagă la antigen al invenției și un purtător acceptabil farmaceutic.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă care codifică anticorpul VH, anticorpul VL sau anticorpul VH și anticorpul VL al invenției.

Invenția furnizează de asemenea un vector cuprinzând polinucleotida care codifică anticorpul VH, anticorpul VL sau anticorpul VH și VL al invenției.

Invenția furnizează de asemenea o celulă gazdă cuprinzând vectorul invenției.

Invenția furnizează de asemenea o metodă pentru producerea anticorpului sau porțiunii care se leagă la antigen al invenției, cuprinzând cultivarea celulei gazdă a invenției în condițiile în care anticorpul este exprimat, și recuperarea anticorpului produs de celula gazdă.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul sau porțiunea care se leagă la antigen al invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul sau porțiunea care se leagă la antigen al invenției pentru utilizare într-o metodă de amplificarea a unui răspuns imun la un subiect, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic de anticorp izolat conform invenției către subiectul care are nevoie de aceasta pentru un timp suficient pentru a ameliora răspunsul imun.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1A prezintă că expresia suprafeței TIM-3 este ridicată în tumori după tratamentul cu anticorpi anti-PD-1. Șoarecii balb/c cu tumori stabilite de carcinom de colon CT26 au fost tratați bisăptămânal cu anticorpi anti-PD-1 sau vehicul. Tumorile au fost recoltate în ziua 22 și expresia TIM-3 a fost evaluată pe celulele T care se infiltrează în tumoare utilizând citometrie de flux. MFI: intensitate fluorescență medie. PBS: control

Figura 1B prezintă că expresia suprafeței TIM-3 este ridicată pe limfocitele infiltrate în tumoare (TIL) după tratamentul cu anticorpi anti-PD-1. Șoarecii balb/c cu tumori stabilite de carcinom de colon MC38 au fost tratați bisăptămânal cu anticorpi anti-PD-1 sau vehicul. Intensitatea fluorescență geometrică medie (gMFI) a expresiei TIM-3 pe populația CD8 TIL totală este prezentată la animalele tratate cu vehicul (PBS) sau tratate cu anticorp anti-PD-1 (PD-1). $p=0,003$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorp anti-PD-1.

Figura 1C prezintă frecvența relativă a celulelor CD8 TIM-3⁺ a TIL-urilor CD8⁺ totale în tumorile MC38 recoltate de la șoarecii tratați cu vehicul (PBS) sau anticorp anti-PD-1 (PD-1). $p=0,045$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorp anti-PD-1.

Figura 2A prezintă că expresia suprafeței CD137 (gMFI) este ridicată pe TIL-urile din tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-PD-1 (grup PD-1) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,005$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorp anti-PD-1. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 2B prezintă că frecvența relativă a celulelor CD8 CD 137⁺ din total TIL-uri CD8⁺ este ridicată în tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-PD-1 (grup PD-1) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0475$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-PD-1. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 3A prezintă că expresia suprafeței OX40 (gMFI) este ridicată pe TIL-uri în tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-PD-1 (grup PD-1) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0013$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-PD-1. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 3B prezintă că frecvența relativă a celulelor CD8 OX40⁺ din total TIL-uri CD8⁺ este ridicată în tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-PD-1 (grup PD-1) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,03$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-PD-1.

Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 4A prezintă că expresia suprafeței GITR (gMFI) este ridicată pe TIL-urile din tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-PD-1 (grup PD-1) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0004$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-PD-1. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 4B prezintă că frecvența relativă a celulelor CD8 GITR⁺ din total TIL-uri CD8⁺ este ridicată în tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-PD-1 (grup PD-1) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0015$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-PD-1. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 5 prezintă că tratamentul cu anticorpi anti-TIM-3 după tratamentul cu anticorpi anti-PD-1, induce suplimentar răspunsul imun specific antigenului. Anticorpii au fost testați în testul CMV utilizând PBMC de la donatori pozitivi CMV, în care răspunsurile imune specifice antigenului au fost induse cu grupuri pp65 de peptide. Celulele au fost tratate timp de 5 zile cu anticorp anti-PD-1 PD1B244, restimulate, și tratate timp de 24 ore cu anticorp anti-TIM-3 TM3B105. Răspunsul imun a fost determinat prin măsurarea creșterii secreției de IFN- γ . IgG2s Iso: IgG2sigma izotip control. CMV: mostră tratată cu peptide p65 citomegalovirus în absența anticorpilor.

Figura 6 prezintă secvențele HCDR1 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și secvența genului HCDR1.

Figura 7 prezintă secvențele HCDR2 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și secvența genului HCDR2.

Figura 8 prezintă secvențele HCDR3 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și prima secvență a genului HCDR3.

Figura 9 prezintă secvențele HCDR3 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și a doua secvență a genului HCDR3.

Figura 10 prezintă secvențele LCDR1 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și secvența genului LCDR1.

Figura 11 prezintă secvențele LCDR2 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și secvența genului LCDR2.

Figura 12 prezintă secvențele LCDR3 ale anticorpilor anti-PD-1 selectați și secvența genului LCDR3.

Figura 13 prezintă secvențele HCDR1 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați și secvența genului HCDR1. Secvența genului a fost determinată prin generarea modelelor moleculare pentru toate Fv (perechi VH/VL) în MOE (CCG, Montreal) utilizând un protocol implicit pentru modelarea anticorpului. Pentru regiunile CDR care au diferite lungimi, aceste modele structurale au fost aliniate pe baza regiunilor conservate structural și au fost identificate pozițiile CDR-urilor echivalente structural.

Figura 14 prezintă secvențele HCDR2 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați și secvența genului HCDR2. Secvența genului HCDR2 a fost generată cum s-a descris pentru Figura 10.

Figura 15 prezintă secvențele HCDR3 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați și prima secvență a genului HCDR3. Secvența genului HCDR3 a fost generată cum s-a descris pentru Figura 10.

Figura 16 prezintă secvențele LCDR1 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați și secvența genului LCDR1. Secvența genului LCDR1 a fost generată cum s-a descris pentru Figura 10.

Figura 17 prezintă secvențele LCDR2 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați și secvența genului LCDR2. Secvența genului LCDR2 a fost generată cum s-a descris pentru Figura 10.

Figura 18 prezintă secvențele LCDR3 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați și secvența genului LCDR3. Secvența genului LCDR3 a fost generată cum s-a descris pentru Figura 10.

Figura 19A prezintă că expresia suprafeței TIGIT (gMFI) este ridicată pe TIL-uri în tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-TIM-3 (grup TIM-3) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0181$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-TIM-3. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 19B prezintă că frecvența relativă a celulelor CD8 TIGIT⁺ din total TIL-uri CD8⁺ este ridicată în tumorile MC38 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-TIM-3 (grup TIM-3) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0475$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-TIM-3. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 20A prezintă că expresia suprafeței TIGIT (gMFI) este ridicată pe TIL-urile din tumorile CT26 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-TIM-3 (grup TIM-3) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p<0,001$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-TIM-3. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 20B prezintă că frecvența relativă a celulelor CD8 TIGIT⁺ din total TIL-uri CD8⁺ este ridicată în tumorile CT26 de carcinom de colon la animalele tratate cu anticorpi anti-TIM-3 (grup TIM-3) în comparație cu grupul tratat cu vehicul (PBS). $p=0,0105$ vehicul vs grupurile tratate cu anticorpi anti-TIM-3. Fiecare punct reprezintă un șoarece. Datele sunt reprezentative pentru cel puțin 2 experimente independente.

Figura 21 prezintă suprareglarea expresiei de TIM-3 pe celulele T periferice în PBMC-urile pacienților cu melanom de la pacienții tratați cu melanom naiv stimulați cu grupuri de peptidă antigen de melanom (NY-ESO, gp100, MART-1) în prezența sau absența anticorpilor care blochează funcționarea anti-PD-1 sau anti-TIM-3. Expresia de TIM-3 a fost determinată prin citometrie de flux pe celulele restimulate în ziua 6.

Figura 22A prezintă că tratamentul cu TM3B403 crește frecvența celulelor NK activate în PBMC-urile umane stimulate IL-2. IgG2s: Izotip control. Activarea celulelor NK a fost evaluată ca procentaj (%) din CD69 care exprimă celulele în PBMC-urile stimulate.

Figura 22B prezintă că tratamentul cu TM3B403 crește frecvența celulelor NK activate în PBMC-urile umane stimulate IL-2. IgG2s: Izotip control. Activarea celulelor NK a fost evaluată ca procentaj (%) din CD25 care exprimă celulele în PBMC-urile stimulate.

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

Trebuie să se înțeleagă că terminologia utilizată aici este numai în scopul descrierii realizărilor particulare și nu intenționează a fi limitativă. În afară de cazul când se definește altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație ca cea înțeleasă în mod obișnuit de către cineva având calificare obișnuită în domeniul căruia invenția îi aparține.

Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practică pentru testarea din prezenta invenție, materiale și metode exemplificative sunt descrise aici. În descrierea și revendicarea prezentei invenții, va fi utilizată următoarea terminologie.

Așa cum s-a utilizat în această descriere și revendicările anexate, formele la singular „o”, „un”, și forma articulată include referiri plurale în afară de cazul când conținutul dictează clar altfel. Astfel, de exemplu, referința la „o celulă” include o combinație de două sau mai multe celule, și altele asemenea.

„Legare specifică” sau „se leagă specific” sau „se leagă” se referă la o legare a anticorpului la un antigen sau un epitop din antigen cu afinitate mai mare decât pentru alți antigeni. De obicei, anticorpul se leagă la antigenul sau epitopul din antigen cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de aproximativ 1×10^{-8} M sau mai mică, de exemplu aproximativ 1×10^{-9} M sau mai mică, aproximativ 1×10^{-10} M sau mai mică, aproximativ 1×10^{-11} M sau mai mică, sau aproximativ 1×10^{-12} M sau mai mică, de obicei cu K_D care este de cel puțin o sută de ori mai mică decât K_D său pentru legare la un antigen nespecific (de exemplu, BSA, caseină). Constanta de disociere poate fi măsurată utilizând proceduri standard. Anticorpii care se leagă specific la antigenul sau epitopul din antigen pot avea totuși, reticularitate cu alți antigeni înrudiți, de exemplu cu același antigen de la alte specii (omologi), cum ar fi uman sau de maimuță, de exemplu *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), *Pan troglodytes* (cimpanzeu, chimp) sau *Callithrix jacchus* (marmoset comun, marmoset). În timp ce un anticorp monospecific se leagă specific la un antigen sau un epitop, un anticorp bispecific se leagă specific la doi antigeni distincți sau la doi epitopi distincți.

„Anticorpi” sunt înțeleși într-un sens larg și includ molecule de imunoglobulină incluzând anticorpi monoclonali incluzând anticorpi murini, umani, umanizați și himerici, fragmente cu legare la antigen, anticorpi bispecifici sau multispecifici, anticorpi dimerici, tetramericici sau multimerici, anticorpi monocatenari, anticorpi de domeniu și orice altă configurație modificată a moleculei de imunoglobulină care cuprinde un situs de legare al antigenului de specificitate necesară. „Anticorpii cu lungime completă” sunt constituiți din două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfură precum și multimeri ai acestora (de exemplu IgM). Fiecare lanț greu este constituit dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (VH) și o regiune constantă a lanțului greu (constituită din domenii CH1, balama CH2 și CH3). Fiecare lanț ușor este constituit dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) și o regiune constantă a lanțului ușor (CL). Regiunile VH și VL poate fi subdivizate suplimentar în regiuni de hipervariabilitate, denumite regiuni determinante de complementaritate (CDR), intercalate cu regiuni cadru (FR). Fiecare VH și VL este compusă din trei regiuni CDR și patru segmente FR, dispuse de la terminalul amino la terminalul carboxi în următoarele ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, și FR4.

„Regiunile determinante de complementaritate (CDR)” sunt „situri de legare la antigen” într-un anticorp. Regiunile CDR pot fi definite utilizând diferiți termeni: (i) regiunile determinante de complementaritate (regiunile CDR), trei în VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) și trei în VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3) sunt pe baza variabilității secvenței (Wu și Kabat, (1970) J Exp Med 132:211-50; Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) „regiunile hipervariabile”, „HVR”, sau „HV”, trei în VH (H1, H2, H3) și trei în VL (L1, L2, L3) se referă la regiunile domeniilor variabile ale unui anticorp care sunt hipervariabile în structură cum s-a definit de către Chotia și Lesk (Chotia și Lesk, (1987) Mol Biol 196:901-17). Baza de date internațională ImunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>) furnizează o numerotare și definire standardizate ale situsurilor de legare la antigen. Corespondența între regiunile CDR, HV-uri și delimitările IMGT este descrisă în Lefranc și colab., (2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77. Termenii „CDR”, „HCDR1”, „HCDR2”, „HCDR3”, „LCDR1”, „LCDR2” și „LCDR3” așa

cum s-au utilizat în acest document includ regiuni CDR definite prin oricare dintre metodele descrise *mai sus*, Kabat, Chotia sau IMGT, în afară de cazul când se declară altfel explicit în specificație.

Imunoglobulina poate fi asignată la cinci clase majore, IgA, IgD, IgE, IgG și IgM, depinzând de domeniul constant al lanțului greu al secvenței de aminoacizi. IgA și IgG sunt subclasificate suplimentar ca izotipuri IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4. Lanțurile usoare ale anticorpilor oricăror specii de vertebrate pot fi asignate la unul din două tipuri clar distincte, și anume kapa (κ) și lambda (λ), pe baza secvențelor de aminoacizi ale domeniilor lor constante.

„Fragmentele de anticorp” sau „porțiunea care se leagă la antigen” se referă la o porțiune a unei molecule de imunoglobulină care reține proprietățile de legare la antigen ale anticorpului parental cu lungime completă. Exemple de porțiuni de legare la antigen sunt regiunile determinante de complementaritate ale lanțului greu (HCDR) 1, 2 și 3, regiunile determinante de complementaritate ale lanțului ușor (LCDR) 1, 2 și 3, o regiune variabilă a lanțului greu (VH), o regiune variabilă a lanțului ușor (VL), fragmente Fab, F(ab')₂, Fd și Fv precum și anticorpi de domeniu (dAb) constând fie dintr-un domeniu VH sau fie dintr-un domeniu VL. Domeniile VH și VL pot fi legate împreună printr-un liant sintetic pentru a forma diferite tipuri de concepții de anticorpi monocatenari unde domeniile VH/VL se pot împerechea intramolecular, sau intermolecular în acele cazuri când domeniile VH și VL sunt exprimate prin construcții separate de anticorpi monocatenari, pentru a forma un situs monovalent de legare la antigen, cum ar fi Fv monocatenar (scFv) sau diacorpul; descrise de exemplu în publicațiile de brevet internațional numerele WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 și WO1992/01047.

„Anticorpul monoclonal” se referă la o populație de anticorpi cu o singură compoziție de aminoacizi în fiecare lanț greu și în fiecare lanț ușor, cu excepția alterărilor posibile bine cunoscute cum ar fi îndepărtarea lizinei C-terminale de lanțul greu al anticorpului. Anticorpii monoclonali se leagă de obicei la un epitop antigenic, cu excepția faptului că anticorpii monoclonali multispecifici se leagă la doi sau mai mulți antigeni sau epitopi distincți. Anticorpii monoclonali bispecifici se leagă la doi epitopi antigenici distincți. Anticorpii monoclonali pot avea glicozilare eterogenă în populația de anticorpi. Anticorpii monoclonali pot fi monospecifici sau multispecifici, sau monovalenți, bivalenți sau multivalenți. Un anticorp multispecific, cum ar fi un anticorp bispecific sau un anticorp trispecific este inclus în termenul anticorp monoclonal.

„Anticorpul izolat” se referă la un anticorp sau fragment de anticorp care este substanțial fără alți anticorpi având diferite specificități antigenice (de exemplu, un anticorp izolat care se leagă specific la PD-1 este substanțial fără anticorpi care se leagă specific la antigeni alții decât PD-1). Un anticorp izolat care se leagă specific la TIM-3 este substanțial fără anticorpi care se leagă specific la antigeni alții decât TIM-3. În cazul anticorpilor PD-1/TIM-3 bispecifici, anticorpul bispecific se leagă specific atât la PD-1 cât și la TIM-3, și este substanțial fără anticorpi care se leagă specific la antigeni alții decât PD-1 și TIM-3. „Anticorpul izolat” cuprinde anticorpi care sunt izolați la o puritate mai ridicată, cum ar fi anticorpii care sunt 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% puri.

„Anticorpii umanizați” se referă la anticorpi în care cel puțin o CDR este derivată din specii neumane și regiunile cadru variabile sunt derivate din secvențe de imunoglobulină umană. Anticorpii umanizați pot include mutații introduse intenționat în regiunile cadru astfel încât cadrul poate să nu fie o copie exactă a imunoglobulinei umane exprimate sau a secvenței genetice a liniei germinative.

„Anticorpul uman” se referă la un anticorp având regiunile variabile ale lanțului greu și ușor în care atât cadrul cât și toate cele 6 regiuni CDR sunt derivate din secvențe de origine umană. Dacă anticorpul conține o regiune constantă sau o porțiune de regiune constantă, regiunea constantă este de asemenea derivată din secvențe de origine umană.

Anticorpul uman cuprinde regiuni variabile ale lanțului greu sau ușor care sunt „derivate din” secvențe de origine umană dacă regiunile variabile ale anticorpului sunt obținute de la un sistem care utilizează imunoglobulina liniei germinative umane sau gene de imunoglobulină rearanjate. Astfel de exemple de sisteme sunt bibliotecile de gene de imunoglobulină umană afișate pe bacteriofagi, și animalele non-umane transgenice cum ar fi șoarecii sau șobolanii care poartă loci de imunoglobulină umană cum s-a descris aici. „Anticorpul uman” poate conține diferențe de aminoacizi în comparație cu imunoglobulina liniei germinative umane sau cu genele de imunoglobulină rearanjate din cauza de exemplu, mutațiilor somatice care apar natural sau introducerii intenționate de substituții în cadrul sau situsul de legare la antigen, sau a ambelor. De obicei, „anticorpul uman” este cel puțin aproximativ 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identic în secvența de aminoacizi cu o secvență de aminoacizi codificată de imunoglobulina liniei germinative umane sau de genele de imunoglobulină rearanjate. În unele cazuri, „anticorpul uman” poate conține secvențe cadru consens derivate din analize de secvențe ale cadrului uman, de exemplu cum s-a descris în Knappik și colab., (2000) J Mol Biol 296:57-86, sau HCDR3 sintetic încorporat în bibliotecile de gene de imunoglobulină umană afișate pe bacteriofagi, de exemplu

cum s-a descris în Shi și colab., (2010) J Mol Biol 397:385-96, și în publicația de brevet internațional nr. WO2009/085462.

Anticorpul uman derivat din secvențe de imunoglobulină umană pot fi generați utilizând sisteme cum ar fi regiuni CDR sintetice care încorporează afișarea pe bacteriofagi și/sau cadre sintetice, sau pot fi supuși la mutagenеза *in vitro* pentru a îmbunătăți proprietățile anticorpului, conducând la anticorpi care nu sunt exprimați de repertoriul liniei germinale a anticorpului uman *in vivo*.

„Recombinant” se referă la anticorpi și alte proteine care sunt preparate, exprimate, create sau izolate prin mijloace recombinante.

„Epitop” se referă la o porțiune a unui antigen la care un anticorp se leagă specific. Epitopii constau de obicei din grupări de suprafață active chimic (cum ar fi polare, nepolare sau hidrofobe) de radicali cum ar fi catene laterale de aminoacizi sau polizaharide și pot avea caracteristici structurale tridimensionale specifice, precum și caracteristici de încărcare specifice. Un epitop poate fi compus din aminoacizi contigui și/sau discontigui care formează o unitate spațială conformațională. Pentru un epitop discontiguu, aminoacizi din diferite porțiuni ale secvenței liniare a antigenului vin în imediata proximitate în spațiul tridimensional prin plierea moleculei de proteină. „Epitopul” anticorpului depinde de metodologia utilizată pentru a identifica epitopul.

„Multispecific” se referă la un anticorp care se leagă specific la cel puțin doi antigeni distincți sau la doi epitopi distincți din antigeni, de exemplu trei, patru sau cinci antigeni sau epitopi distincți.

„Bispecific” se referă la un anticorp care se leagă specific la doi antigeni distincți sau la doi epitopi distincți din același antigen. Anticorpul bispecific poate avea reticularitate cu alți antigeni înrudiți, de exemplu cu același antigen de la alte specii (omologi), cum ar fi uman sau maimuță, de exemplu *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno), *Pan troglodytes* (cimpanzeu, chimp) sau *Callithrix jacchus* (marmoset comun, marmoset), sau se poate lega la un epitop care este partajat între doi sau mai mulți antigeni distincți.

„Varianta” se referă la o polipeptidă sau o polinucleotidă care diferă de o polipeptidă de referință sau de o polinucleotidă de referință prin una sau mai multe modificări de exemplu, substituții, inserții sau deleții.

„Vectorul” se referă la o polinucleotidă capabilă să fie duplicat într-un sistem biologic sau care poate fi deplasată între astfel de sisteme. Polinucleotidele vectoriale conțin de obicei elemente, cum ar fi originile de replicare, semnalul de poliadenilare sau markeri de selecție, care funcționează pentru a facilita duplicarea sau întreținerea acestor polinucleotide într-un sistem biologic. Exemple de astfel de sisteme biologice pot include o celulă, virus, animal, plantă, și sisteme biologice reconstituite utilizând componente biologice capabile de duplicarea unui vector. Polinucleotida cuprinzând un vector poate fi ADN sau moleculă de ARN sau un hibrid al acestora.

„Vectorul de expresie” se referă la un vector care poate fi utilizat într-un sistem biologic sau într-un sistem biologic reconstituit pentru a direcționa translația unei polipeptide codificată printr-o secvență de polinucleotidă prezentă în vectorul de expresie.

„Polinucleotida” se referă la o moleculă sintetică cuprinzând o catenă de nucleotide legată covalent cu un eșafodaj de zahăr-fosfat sau altă chimie covalent echivalentă. ADNc este un exemplu tipic al unei polinucleotide.

„Polipeptida” sau „proteina” se referă la o moleculă care cuprinde cel puțin două reziduuri de aminoacid legate printr-o legătură peptidică pentru a forma o polipeptidă. Polipeptidele mici de mai puțin de 50 aminoacizi pot fi referite ca „peptide”.

PD-1 se referă la proteina 1 umană a morții celulei programate, PD-1. PD-1 este de asemenea cunoscută ca CD279 sau PDCD1. Secvența de aminoacizi a PD-1 umane mature (fără secvență semnal) este prezentată în **SEQ ID NO: 1**. Domeniul extracelular se întinde pe reziduurile 1-150, domeniul transmembranar se întinde pe reziduurile 151-171 și domeniul citoplasmatic se întinde pe reziduurile 172-268 din **SEQ ID NO: 1**. Prin specificația, „domeniul extracelular al PD-1 uman”, „huPD1-ECD” se referă la proteina având secvența de aminoacizi a reziduurilor 1-149 din **SEQ ID NO: 1**, și prezentată în **SEQ ID NO: 2**. „PD-1” în specificație se referă la PD-1 umană matură, în afară de cazul când se declară explicit contrariul.

TIM-3 se referă la receptorul 2 celular al virusului uman al hepatitei A, denumit de asemenea HAVCR2. Secvența de aminoacizi a TIM-3 uman matur (fără secvență semnal) este prezentată în **SEQ ID NO: 138**. Domeniul extracelular se întinde pe reziduurile 1-181, domeniul transmembranar se întinde pe reziduurile 182-202 și domeniul citoplasmatic se întinde pe reziduurile 203-280 din **SEQ ID NO: 138**. Prin specificație, „domeniul extracelular al TIM-3 uman”, „huTIM-3-ECD” se referă la proteina având secvența de aminoacizi din reziduurile 1-179 din **SEQ ID NO: 138**, și prezentată în **SEQ ID NO: 89**. TIM-3 în specificație se referă la TIM-3 matură umană, în afară de cazul când se declară explicit contrariul.

„În combinație cu“ înseamnă că doi sau mai mulți agenți terapeutici sunt administrați unui subiect împreună într-un amestec, concomitent ca agenți singuri sau secvențial ca agenți singuri în orice ordine.

„Supraexprimă“, „supraexprimată“ și „supraexprimare“ sunt utilizați interschimbabil și se referă la o mostră cum ar fi o celulă canceroasă, celulă malignă sau țesut canceros care are niveluri măsurabile mai ridicate de PD-1, TIM-3, PD-L1, PD-L2 sau ligand TIM-3 în comparație cu o mostră de referință. Supraexprimarea poate fi cauzată de amplificarea genetică sau prin transcripția sau translația crescute. Expresia și supraexprimarea proteinei în mostră pot fi măsurate utilizând teste bine cunoscute utilizând de exemplu ELISA, imunofluorescența, citometria de flux sau radioimunotestarea pe viu sau celule lizate. Expresia și supraexprimarea unei polinucleotide în mostră pot fi măsurate de exemplu utilizând hibridizarea fluorescență *in situ*, colorarea Southern, sau tehnici PCR. O proteină sau o polinucleotidă este supraexprimată când nivelul proteinei sau polinucleotidei în mostră este de cel puțin 1,5 ori mai ridicat sau semnificativ statistic în comparație cu mostra de referință. Selecția mostrei de referință este cunoscută.

„Mostră“ se referă la o colecție de fluide, celule, sau țesuturi similare izolate de la un subiect, precum și fluide, celule, sau țesuturi prezente la un subiect. Exemple de mostre sunt fluidele biologice cum ar fi sângele, serul și fluidele serosale, plasma, limfaticile, urine, saliva, fluidul cistic, picăturile lacrimale, fecalele, sputa, secrețiile mucozale ale țesuturilor și organelor secretoare, secrețiile vaginale, fluidele ascite cum ar fi cele asociate cu tumorile nesolide, fluidele pleurale, pericardiale, peritoneale, abdominale și ale altor cavități corporale, fluidele colectate prin lavaj bronhial, soluții lichide puse în contact cu un subiect sau sursă biologică, de exemplu, mediu de cultură celular și al unui organ incluzând mediul condiționat celular sau al organului, fluide de lavaj și altele asemenea, biopsii de țesut, aspirații cu ac fin sau țesut tumoral rezecat chirurgical.

O „celulă canceroasă“ sau o „celulă tumorală“ se referă la o celulă canceroasă, precanceroasă sau transformată, fie *in vivo*, *ex vivo*, sau în cultură de țesut, care are modificări fenotipice spontane sau induse. Aceste modificări nu implică în mod necesar absorbția de nou material genetic. Deși transformarea poate apare dintr-o infecție cu un virus transformant și încorporând un nou acid nucleic genomic, absorbția de acid nucleic exogen sau poate apare de asemenea spontan sau după expunerea la un carcinogen, mutând prin urmare o genă endogenă. Transformarea/cancerul este exemplificată prin modificări morfologice, imortalizarea celulelor, controlul creșterii aberante, formarea de foci, proliferare, malignitate, modularea nivelurilor marker specifice tumorale, invazivitatea, creșterea tumorii în gazde animale adecvate cum ar fi șoareci nuzi, și altele asemenea, *in vitro*, *in vivo*, și *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (Ed. a 3-a 1994)).

„Aproximativ“ înseamnă într-un interval de eroare acceptabil pentru valoarea particulară după cum a fost determinată de cineva având calificare obișnuită în domeniu, că va depinde parțial de cum este măsurată sau determinată valoarea, adică, de limitările sistemului de măsurare. În afară de cazul când se declară explicit altfel, în exemple sau în altă parte din specificație în contextul unui test, rezultat sau realizare particulare, „aproximativ“ înseamnă într-o deviație standard a practicii în domeniu, sau un interval de până la 5%, oricare este mai mare.

„Anticorp PD-1/TIM-3 bispecific“, „anticorp PD-1/TIM-3“, „anticorp anti-PD-1/TIM-3 bispecific“ sau „anticorp anti-PD-1/TIM-3“ se referă la o moleculă cuprinzând cel puțin un domeniu de legare specifică care se leaga la PD-1 și cel puțin un domeniu de legare specifică care se leaga la TIM-3. Domeniile de legare specifică la PD-1 și TIM-3 sunt de obicei perechi VH/VL. Anticorpul anti-PD-1/TIM-3 bispecific poate fi monovalent în termenii legării sale fie la PD-1 sau fie la TIM-3.

„Valent“ se referă la prezența unui număr specificat de situsuri de legare specifice pentru un antigen într-o moleculă. Ca atare, termenii „monovalent“, „bivalent“, „tetravalent“, și „hexavalent“ se referă la prezența unuia, a două, a patru și a șase situsuri de legare, respectiv, specifice pentru un antigen într-o moleculă.

„Un antigen specific celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺“ se referă la o celulă T CD4⁺ sau CD8⁺ activată de un antigen specific, sau epitop imunostimulator al acestuia.

„CD137“ (denumit de asemenea membru al superfamiliei de receptori de factori de necroză tumorală 9, TNFRSF9, 4-1BBL) se referă la o moleculă CD137 umană având secvența de aminoacizi prezentată în SEQ ID NO: 281.
SEQ ID NO: 281

MGNSCYNIVATLLLVLFNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA
GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGG
ELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPAD
LSPGASSVTPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

„TIGIT“ (denumit denumit de asemenea imunoreceptor al celulei T cu domenii Ig și ITIM) se referă la molecula TIGIT umană având secvența de aminoacizi prezentată în SEQ ID NO: 301.

SEQ ID NO: 301

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHI
SPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEH
GARFQIPLLGAMAAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEW

5 SPSAPSPPGSCVQAEAAAGLCGEQGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSTFTETG

„Agonist“ se referă la o moleculă care, când este legată la o proteină celulară, induce cel puțin o reacție sau activitate care este indusă de un ligand natural al proteinei. Molecula este un agonist când cea cel puțin o reacție sau activitate este indusă cu cel puțin aproximativ 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, sau 100% mai mult decât cea cel puțin o reacție sau activitate indusă în absența agonistului (*de exemplu*, control negativ), sau când inducerea este semnificativă statistic în comparație cu inducerea în absența agonistului. Agonistul poate fi un anticorp, un ligand solubil, sau o micromoleculă. Un exemplu de agonist este un anticorp agonistic care se leagă specific la o moleculă care activează celula T.

15 „Antagonist“ se referă la o moleculă care, când este legată la o proteină celulară, suprimă cel puțin o reacție sau activitate care este indusă de un ligand natural al proteinei. O moleculă este un antagonist când cea cel puțin o reacție sau activitate este suprimată cu cel puțin aproximativ 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, sau 100% mai mult decât cea cel puțin o reacție sau activitate suprimată în absența antagonistului (*de exemplu*, control negativ), sau când suprimarea este semnificativă statistic în comparație cu suprimarea în absența antagonistului. Antagonistul poate fi un anticorp, un ligand solubil, o micromoleculă, un ADN sau ARN cum ar fi ARNsi. Exemple de antagoniști sunt un anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1, un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3, un anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonist sau un anticorp antagonist care se leagă la o moleculă care inhibă celule T. O reacție sau activitate tipică care este indusă de legarea PD-1 la receptorul său PD-L1 sau PD-L2 poate fi proliferarea redusă a celulelor CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului sau producția redusă de interferon- γ de către celulele T, conducând la supresia răspunsurilor imune împotriva de exemplu tumorii. O reacție sau activitate tipică care este indusă de legarea TIM-3 la receptorul său, cum ar fi galectin-9, poate fi proliferarea redusă a celulelor CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, producția redusă de IFN- γ de către celulele T, sau expresia redusă a suprafeței CD137 pe celulele CD4⁺ sau CD8⁺, conducând la supresia răspunsurilor imune împotriva de exemplu tumorii. În mod similar, o reacție sau activitate tipică care este indusă de o moleculă care inhibă celula T este imunosupresivă. Prin urmare, un anticorp PD-1 antagonist care se leagă specific la PD-1, un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3, un anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonist, sau un anticorp antagonist care se leagă specific la o moleculă care inhibă celula T induce răspunsuri imune prin inhibarea căilor inhibitoare.

35 „Subiect“ include orice om sau animal non-uman. „Animal non-uman“ include toate vertebratele, de exemplu, mamifere și non-mamifere, cum ar fi primatelor non-umane, oile, câinii, pisicile, caii, vacile puii, amfibienii, reptilele, etc. Exceptând când se specifică altfel, termenii „pacient“ sau „subiect“ sunt utilizați interschimbabil.

40 Numerotarea reziduurilor de aminoacizi în regiunea constantă a anticorpului prin specificație este în conformitate cu indicele EU cum s-a descris în Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Ed. a 5-a Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), în afară de cazul când se declară explicit altfel.

Codurile convenționale de aminoacizi dintr-o literă și din trei litere sunt utilizate aici așa cum se arată în Tabelul 1.

45 **Tabelul 1.**

Aminoacid	Cod din trei litere	Cod dintr-o literă
Alanină	Ala	A
Arginină	Arg	R
Asparagină	Asn	N

Aminoacid	Cod din trei litere	Cod dintr-o literă
Aspartat	Asp	D
Cisteină	Cys	C
Glutamat	Gln	E
Glutamină	Glu	Q
Glicină	Gly	G
Histidină	His	H
Izoleucină	Ile	I
Lizină	Lys	K
Metionină	Met	M
Fenilalanină	Phe	F
Prolină	Pro	P
Serină	Ser	S
Treonină	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozină	Tyr	Y
Valină	Val	V

Anticorpi antagonistici care se leagă specific la PD-1

PD-1, după angajarea ligandului, suprimă funcțiile celulei T prin multiple mecanisme (Pauken & Wherry (2015) Trends in Immunology 36(4): 265-276). Angajamentul PD-1 inhibă direct semnalizarea receptorului celulei T (TCR) prin colocalizarea cu TCR și inducerea ulterioară de defosforilare a moleculelor de semnalizare proximală TCR, inhibarea căii Ras/MEK/ERK conducând la inhibarea progresului ciclului celular și proliferarea celulelor T, inhibarea creșterii celulei și supraviețuirii și reprogramării metabolismului celulei T prin supresia căii PI3K/AKT, conducând la suprareglarea factorului de transcripție BATF, și modularea dezvoltării, întreținerii și funcționării celulelor T reglatoare. PD-1 a fost de asemenea propus pentru a crește motilitatea celulei T și pentru a limita durata de interacțiune între celulele T și celulele țintă, reducând prin urmare extinderea activării celulelor T (Honda și colab., (2014) Immunity 40(2):235-47).

Tumorile au cooptat calea PD-1 pentru a subregla funcționarea celulei T în micromediul tumoral (TME) și pentru a evita distrugerea imună. În TME, în condițiile persistenței antigenului și inflamației, celule T devin epuizate, sau disfuncționale, și își pierd progresiv funcțiile lor efectoare și capacitatea proliferativă. Celulele T epuizate exprimă niveluri ridicate de PD-1, adesea împreună cu alți inhibitori ai receptorului cum ar fi TIM-3 sau LAG-3 (Pauken & Wherry (2015) Trends in Immunology 36(4): 265-276). Unul dintre liganzii PD-1, PD-L1, este de asemenea suprareglat în diferite tumori. Expresia PD-L1 are loc pe celulele canceroase însele și/sau infiltrând celule imune, incluzând macrofagele asociate tumorii, celule dendritice, fibroblaste și celule T activate (Chen și colab., 2012 Clin Cancer Res 18(24):6580-7). În această setare, se presupune că angajamentul PD-1 limitează răspunsurile anti-tumorale ale celulei T și conduce la evaziunea imună. Studii recente au arătat că o frecvență și nivel de expresie al PD-1 mai ridicat au loc pe limfocitele care se infiltrează în tumoare (TIL-uri) în multiple tumori solide. Important, aceste TIL-uri PD-1⁺ sunt alterate funcțional, după cum s-a evidențiat prin proliferarea și funcțiile efectoare mai scăzute (Pauken & Wherry; 2015, Trends in Immunology 36(4): 265-276) Aceste date susțin ipoteza că PD-1 mediază supresia imună în TME.

Epuizarea celulei T în tumori este reversibilă, cel puțin parțial, prin blocarea căii PD-1. S-a arătat că anticorpii anti-PD-1/PD-L1 ameliorează funcționarea celulei T și conduc la imunitate antitumorală îmbunătățită într-un număr de modele tumorale preclinice. Anticorpii PD-1/PD-L1 au prezentat de asemenea răspunsuri clinice încurajatoare în multiple tumori solide, cu 20-40% rată globală de răspuns (ORR) în melanom, 10-24% în cancerul pulmonar nonmicrocelular (NSCLC), 12-31% în carcinomul cu celule renale (RCC), 24-52% în cancerul la vezică, și 20% în cancerul la cap și gât (Swaika și colab., (2015) Mol Immunol 67(2 Pt A):4-17).

Invenția furnizează un anticorp antagonistic izolat care se leagă specific la PD-1 sau la o porțiune care se leagă la antigen a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56.

SEQ ID NO: 82, 83, 84, 85, 86, 87 și 88 reprezintă secvențele genurilor HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 de variante maturate de afinitate ale anticorpilor antagonistici care se leagă specific la PD-1 având secvențe HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 similare, și două grupuri de secvențe HCDR3 similare. Anticorpul din gen se leagă la PD-1 cu K_D mai mică de aproximativ 1×10^{-7} M, cum ar fi mai mică de aproximativ 1×10^{-8} M, de exemplu mai mică de aproximativ 1×10^{-9} M, sau de exemplu mai mică de aproximativ 1×10^{-10} M. Anticorpul au secvențele de aminoacizi HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 ale anticorpilor PD1B114, PD1B149, PD1B160, PD1B162, PD1B164, PD1B11, PD1B183, PD1B184, PD1B185, PD1B187, PD1B71, PD1B177, PD1B70, PD1B175, PD1B194, PD1B195, PD1B196, PD1B197, PD1B198, PD1B199, PD1B200, PD1B201 și PD1B244 cum s-a descris aici.

SEQ ID NO: 82

$X_1YX_2IX_3$,

în care

X_1 este S sau D;

X_2 este V sau A; și

X_3 este H sau S.

SEQ ID NO: 83

GIIPX₄X₅ TANY AQKFQG,

în care

X_4 este Y sau F; și

X_5 este G sau D.

SEQ ID NO: 84

PGLAAAYDTGX₆LDY,

în care

X_6 este N sau S.

SEQ ID NO: 85

GX₇X₈X₉X₁₀ TGX₁₁LDY,

în care

X_7 este T sau Y;

X_8 este L sau V;

X_9 este D sau R;

X_{10} este R sau A; și

X_{11} este H sau M.

SEQ ID NO: 86

RASQSVX₁₂X₁₃ YLA,

în care

X_{12} este S, R sau D; și

X_{13} este S sau N.

SEQ ID NO: 87

DASX₁₄RAT,

în care

X_{14} este N, D, Y, S sau T.

SEQ ID NO: 88

QQRX₁₅X₁₆WPL T,

în care

X_{15} este S, N, G, E, D, W sau A; și

X_{16} este N, Y, E sau A.

În unele realizări, anticorpul anyagonistic izolat care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia are una, două, trei, patru sau cinci din următoarele proprietăți:

a) ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului într-o manieră dependentă de doză, în care activarea este măsurată utilizând un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) cum s-a descris în Exemplul 1;

b) se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C;

c) se leagă la PD-1 uman cu K_D de mai puțin de aproximativ 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C;

d) se leagă la PD-1 de cynomolgus cu K_D de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C, sau

e) se leagă la PD-1 de cynomolgus cu K_D de mai puțin de aproximativ 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

Exemple de astfel de anticorpi sunt anticorpul PD-1 PD1B196 și PD1B244 cum s-a descris aici.

În unele realizări, anticorpul antagonist ic izolat care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului într-o manieră dependentă de doză, în care activarea este măsurată utilizând un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) cum s-a descris în Exemplul 1, și se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul antagonist ic izolat care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului într-o manieră dependentă de doză, în care activarea este măsurată utilizând un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) cum s-a descris în Exemplul 1, și se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 10 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul antagonist ic izolat care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului într-o manieră dependentă de doză, în care activarea este măsurată utilizând un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) cum s-a descris în Exemplul 1, și se leagă la PD-1 de cynomolgus cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul antagonist ic izolat care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului într-o manieră dependentă de doză, în care activarea este măsurată utilizând un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) cum s-a descris în Exemplul 1, și se leagă la PD-1 de cynomolgus cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 10 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

Activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului poate fi evaluată prin măsurarea proliferării crescute a celulelor T într-un test de Reacție Amestecată de Limfocite (MLR), într-un test de secreție crescută de interferon- γ (IFN- γ) în MLR, într-un test de secreție crescută de TNF- α în MLR, într-un test de secreție crescută de IFN- γ într-un antigen citomegalovirus (CMV test) sau într-un test de secreție crescută de TNF- α în CMV utilizând protocoalele cunoscute și pe cele descrise în Exemplul 1. Anticorpul invenției ameliorează activarea T CD4⁺ sau CD8⁺ specifică antigenului când funcționalitatea măsurată a celulei T este crescută de către anticorpul invenției într-o manieră dependentă de doză.

Afinitatea unui anticorp la PD-1 uman sau de cynomolgus poate fi determinată experimental utilizând orice metodă adecvată. Astfel de metode pot utiliza instrumente ProteOn XPR36, Biacore 3000 sau KinExA, teste de legare ELISA sau competitive cunoscut celor calificați în domeniu. Afinitatea măsurată a unui anticorp particular/interacțiunea PD-1 pot varia dacă sunt măsurate în diferite condiții (de exemplu, osmolaritate, pH). Astfel, măsurătorile de afinitate și alți parametri ai legării (de exemplu, K_D , K_{on} , K_{off}) sunt făcute de obicei în condiții standardizate și cu un tampon standardizat, cum ar fi tamponul descris aici. Cei calificați în domeniu vor aprecia că eroarea internă pentru măsurătorile de afinitate, utilizând de exemplu Biacore 3000 sau ProteOn (măsurată ca deviație standard, SD) poate fi de obicei între 5-33% pentru măsurători în limitele tipice de detecție. Prin urmare termenul „aproximativ” în contextul K_D reflectă deviația standard tipică în test. De exemplu, SD tipică pentru o K_D de 1×10^{-9} M este până la $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ M.

Anticorpul antagonist ic care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia al invenției cuprinde HCDR1, HCDR2 și HCDR3 conținute într-o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48, în care HCDR1, HCDR2 și HCDR3 sunt definite de către Chotia, Kabat, sau IMGT.

Anticorpul antagonist ic care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia al invenției cuprinde LCDR1, LCDR2 și LCDR3 conținute într-o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56, în care LCDR1, LCDR2 și LCDR sunt definite de către Chotia, Kabat, sau IMGT.

Anticorpul antagonist ic care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia al invenției cuprinde HCDR1, HCDR2 și HCDR3 din SEQ ID NO: 10, 14 și respectiv 17.

Anticorpul antagonist ic care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia al invenției cuprinde LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 23, 26 și respectiv 32.

Anticorpul antagonist ic care se leagă specific la PD-1 sau porțiunea de legare la antigen a acestuia al invenției cuprinde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 10, 14, 17, 23, 26 și respectiv 32.

În unele realizări, anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, opțional mai puțin de aproximativ 10 nM, de exemplu mai puțin de aproximativ 1 nM cum ar fi mai puțin de aproximativ 500 pM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia se leagă la PD-1 de cynomolgous cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, opțional mai puțin de aproximativ 10 nM, de exemplu mai puțin de aproximativ 1 nM cum ar fi mai puțin de aproximativ 500 pM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56.

În unele realizări, VH și VL sunt codificate prin secvențele de polinucleotide din SEQ ID NO: 196 și respectiv 197.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG4, cuprinzând opțional o substituție S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG4/κ, cuprinzând opțional substituția S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 și este un izotip IgG4, cuprinzând opțional substituția S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 și este un izotip IgG4/κ cuprinzând substituția S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul cuprinde un lanț greu (HC) din SEQ ID NO: 72 și un lanț ușor (LC) din SEQ ID NO: 73.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG2, cuprinzând opțional substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG2/κ, cuprinzând opțional substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 și este un izotip IgG2/κ, cuprinzând opțional substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 și este un izotip IgG2/κ cuprinzând substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG1.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG3.

În unele realizări, anticorpul este un anticorp bispecific, cum ar fi un anticorp PD-1/TIM-3 bispecific.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei tumori solide.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui melanom.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer pulmonar.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului pulmonar nonmicrocelular (NSCLC).

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui NSCLC scuamos.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui NSCLC non-scuamos.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui adenocarcinom la plămân.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom cu celule renale (RCC).

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui mezoteliom.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom nazofaringeal (NPC).

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer colorectal.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la prostată.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la prostată rezistent la castrare.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la stomac.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer ovarian.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer gastric.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer hepatic.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer pancreatic.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la tiroidă.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom cu celule scuamoase de cap și gât.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom de esofag sau tract gastrointestinal.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la sân.

5 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer al trompei uterine.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la creier.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer uretral.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei endometrioze.

10 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer de col uterin.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei leziuni metastatice a cancerului.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei malignități hematologice.

15 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui limfom non-Hodgkin.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei leucemii limfocitare cronice.

20 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer, în combinație cu un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer, în combinație cu un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 146 și VL din SEQ ID NO: 156.

25 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer, în combinație cu un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 145 și VL din SEQ ID NO: 155.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer, în combinație cu un anticorp antagonist care se leagă specific la TIM-3 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 172 și VL din SEQ ID NO: 173.

30 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului, cum ar fi o tumoră solidă, în combinație cu un inhibitor FGFR.

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului, cum ar fi o tumoră solidă, în combinație cu un vaccin.

35 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului, cum ar fi o tumoră solidă, în combinație cu un anticorp agonistic care se leagă specific la GITR (SEQ ID NO: 271).

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului, cum ar fi o tumoră solidă, în combinație cu un anticorp agonistic care se leagă specific la CD 137 (SEQ ID NO: 281).

40 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului, cum ar fi o tumoră solidă, în combinație cu un anticorp agonistic care se leagă specific la OX-40 (SEQ ID NO: 279).

În unele realizări, anticorpul este un anticorp bispecific, cum ar fi un anticorp PD-1/TIM-3 bispecific.

VH, VL, secvențele HCDR și LCDR ale anticorpilor antagonistici care se leagă specific la PD-1 sunt prezentate în Tabelul 2.

45 Deși anticorpul este ilustrat în exemple cuprind perechi de regiuni variabile, una dintr-un lanț greu și una dintr-un lanț ușor, un specialist calificat va recunoaște că alternativele pot cuprinde regiuni variabile singure ale lanțului greu sau ușor. Regiunea variabilă singură poate fi utilizată la selecția domeniilor variabile capabile de formarea a două fragmente care se leagă la antigen specifice domeniului capabile de, de exemplu, legarea la PD-1 uman. Selecția poate fi realizată prin metode de selecție prin afișare pe bacteriofagi utilizând de exemplu abordarea combinatorială dublu ierarhizată divulgată în publicația de brevet internațional nr. WO1992/01047. În această abordare, o colonie individuală conținând fie o clonă a catenei VH sau fie o clonă a catenei VL este utilizată pentru a infecta o bibliotecă completă de clone care codifică cealaltă catenă (VL sau VH), și domeniul de legare la antigen rezultat specific celor două catene este selectat în conformitate cu tehnicile de afișare pe bacteriofagi utilizând metodele cunoscute și pe cele

55 descrise aici. Prin urmare, catenele polipeptidice individuale VH și VL sunt utile în identificarea anticorpilor suplimentari care se leagă specific la PD-1 uman utilizând metodele divulgate în publicația de brevet internațional nr. WO1992/01047.

În unele realizări, anticorpul antagonist care se leagă specific la PD-1 este un anticorp multispecific.

60 În unele realizări, anticorpul antagonist care se leagă specific la PD-1 este un anticorp bispecific.

În unele realizări, anticorpii antagonici bispecifici care se leagă specific la PD-1 se leagă la PD-L1 (SEQ ID NO: 5), PD-L2 (SEQ ID NO: 8), LAG-3 (SEQ ID NO: 293), TIM-3 (SEQ ID NO: 138), CEACAM-1 (SEQ ID NO: 296), CEACAM-5 (SEQ ID NO: 307), OX-40 (SEQ ID NO: 279), GITR (SEQ ID NO: 271), CD27 (SEQ ID NO: 280), VISTA (SEQ ID NO: 286), CD137 (SEQ ID NO: 281), TIGIT (SEQ ID NO: 301) sau CTLA-4 (SEQ ID NO: 292). Anticorpii bispecifici și multispecifici pot fi generați utilizând metodele descrise aici.

Tabelul 2.

Anticorp	SEQ ID NO:							
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VH	VL
PD1B114	10	13	16	20	26	31	41	49
PD1B149	10	13	16	21	26	32	41	50
PD1B160	10	14	16	22	27	33	42	51
PD1B162	10	14	16	22	26	34	42	52
PD1B164	10	14	16	23	28	35	42	53
PD1B11	10	13	17	20	26	31	43	49
PD1B183	10	13	17	20	26	36	43	54
PD1B184	10	13	17	21	26	32	43	50
PD1B185	10	13	17	21	27	37	43	55
PD1B187	10	13	17	23	26	32	43	56
PD1B192	10	13	17	22	26	32	43	57
PD1B71	10	13	18	20	26	31	44	49
PD1B177	11	15	18	20	26	31	45	49
PD1B70	10	13	19	20	26	31	46	49
PD1B175	12	13	19	20	26	31	47	49
PD1B194	10	14	17	23	28	35	48	53
PD1B195	10	14	17	22	26	34	48	52
PD1B196	10	14	17	23	26	32	48	56
PD1B197	12	13	19	24	26	38	47	58
PD1B198	12	13	19	20	29	39	47	59
PD1B199	11	15	18	20	30	32	45	60
PD1B200	11	15	18	25	26	40	45	61
PD1B201	11	15	18	24	26	32	45	62
PD1B131	66	67	68	69	70	71	63	65
PD1B132	66	67	68	69	70	71	64	65

Anticorpi cu modificări conservative

„Modificarea conservativă” se referă la modificări de aminoacizi care nu afectează semnificativ sau alterează caracteristicile de legare ale anticorpului care conține secvențele de aminoacizi. Modificările conservative includ substituții de aminoacizi, adăugări și deleții. Substituțiile conservative sunt cele în care aminoacidul este înlocuit cu un rest de aminoacid având o catenă laterală similară. Familiile de resturi de aminoacid având catene laterale similare sunt bine definite și includ aminoacizi cu catene laterale acidice (de exemplu, acid aspartic, acid glutamic), catene laterale bazice (de exemplu, lizină, arginină, histidină), catene laterale nonpolare (de exemplu, alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină, fenilalanină, metionină), catene laterale polare neîncărcate (de exemplu, glicină, asparagină, glutamină, cisteină, serină, treonină, tirozină, triptofan), catene laterale aromatice (de exemplu, fenilalanină, triptofan, histidină, tirozină), catene laterale alifatică (de exemplu, glicină, alanină, valină, leucină, izoleucină, serină, treonină), amidă (de exemplu, asparagină, glutamină), catene laterale beta-ramificate (de exemplu, treonină, valină, izoleucină) și catene laterale care conțin sulf (cisteină, metionină). Mai

mult, orice reziduu nativ în polipeptidă poate fi de asemenea substituit cu alanină, cum s-a descris anterior pentru mutageneza de scanare a alaninei (MacLennan și colab., Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, 1998; Sasaki și colab., Adv. Biophys. 35:1-24, 1998). Substituțiile de aminoacizi la anticorpii invenției pot fi făcute prin metode bine cunoscute, de exemplu prin mutageneză PCR (brevetul S.U.A. nr. 4.683.195). Alternativ, bibliotecile de variante pot fi generate utilizând metode cunoscute, de exemplu utilizând codoni randomizați (NNK) sau non-randomizați, de exemplu codoni DVK, care codifică 11 aminoacizi (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Variantele de anticorpi rezultate pot fi testate pentru caracteristicile lor utilizând testele descrise aici.

Anticorpi antagonisti care se leagă specific la TIM-3

Domeniul imunoglobulinei celulei T și domeniul mucinei 3 (TIM-3, cunoscut de asemenea ca receptorul 2 celular al virusului hepatitei A (HAVCR2)) este un receptor coinhibitor al punctului de control imun care a fost propus să regleze negativ ambele răspunsuri imune adaptive și native. TIM-3 este exprimat pe subseturi specifice de celule T CD4⁺ și CD8⁺ și funcționează pentru a limita durata și mărimea răspunsurilor celulelor T.

Multiple linii de dovadă susțin rolul inhibitor al TIM-3 în reglarea răspunsurilor celulelor T. Șoarecii deficienți la Tim-3 prezintă defecte în inducerea toleranței atât specifică la antigen cât și la transplantare, consistent cu TIM-3 care inhibă celulele T efectoare în timpul răspunsurilor imune normale (Sabatos și colab., (2003) Nat Immunol 4(11):1102-1110, Sanchez-Fueyo și colab., (2003) Nat Immunol 4(11):1093-1101). Anticorpii anti-TIM-3 exacerbează encefalomielite autoimună experimentală (EAE) în modelele pe animale (Monney și colab., (2002) Nature 415(6871):536-541). S-a arătat că TIM-3 este un conducător critic al stării celulei T disfuncționale sau epuizate care apare în infecția cronică și cancer (Sakuishi, K. și A. C. Anderson (2014). Tim-3 Regulation of Cancer Immunity. Tumor-Induced Immune Suppression. D. I. Gabrilovich and A. A. Hurrwitz, Springer New York: 239-261).

S-a arătat că blocarea TIM-3 restaurează activitatea în celulele efectoare, cum ar fi secreția și proliferarea de citokine. În populațiile de celule epuizate viral, de exemplu, celule infectate cu HCV, celulele care exprimă TIM-3 (celule TIM-3⁺) exprimă mai puține citokine TNF- α și IFN- γ decât celulele negative TIM-3 în ambele populații de celule efectoare, celule T CD4⁺ și CD8⁺ (Golden-Mason și colab., (2009) J Virol 83:9122). Blockade of TIM-3 restored proliferare în CD8⁺ celule T from an HIV pacient, or in cells that recapitulated viral exhaustion (Jones și colab., (2008) J Exp Med 205:2763), or proliferation and IFN- γ și/sau TNF- α secretion in NY-ESO-1 specific T cells from PBMCs from metastatic patients (Fourcade și colab., (2010) J Exp Med 207:2175). S-a descoperit că celulele T TIM-3⁺ sunt concentrate în tumori, și contribuie la mediul tumoral imunosupresiv (Sakuishi și colab., (2013) Oncoimmunology, 2:e23849).

Blocarea TIM-3 (parțial singur și aditiv sau sinergic în combinație cu blocarea căii PD-1) au dovedit eficacitate anti-tumorală în câteva modele preclinice de cancer, incluzând carcinomul de colon CT26 (Sakuishi și colab., (2010) J Exp Med 207(10):2187-94), WT3 sarcoma and TRAMP-C1 prostate carcinoma (Ngiow și colab., (2011) Cancer Res 71(10):3540-3551).

Mecanismele prin care TIM-3 inhibă răspunsurile celulei T nu sunt complet înțelese. Coada citoplasmatică a TIM-3 conține multiple reziduuri de tirozină (Ferris și colab., (2014) J Immunol 193(4): 1525-1530) dar îi lipsesc motivele inhibitoare de semnalizare cum ar fi ITIM-urile sau ITSM-urile care sunt găsite în coada intracelulară PD-1. S-a dovedit că familia Src de tirozin kinaze Fyn și Lck se leagă la TIM-3, deși consecințele exacte ale acestei interacțiuni rămân să fie confirmate *in vivo*. Au fost propuse două modele opuse pentru cum reglează TIM-3 semnalizarea celulei T. Pe de o parte, s-a postulat că TIM-3 reglează negativ semnalizarea TCR prin recrutarea unei fosfataze la sinapsa imunologică, și defosforilarea Lck (Clayton, și colab., (2014) J Immunol 192(2):782-791). În contrast, TIM-3 a fost de asemenea propus pentru a ameliora semnalizarea TCR și a conduce paradoxal celulele T către o stare mai epuizată, prin activarea crescută a activității NFAT și semnalizării NF κ B.

În plus față de expresia pe celulele T efectoare, TIM-3 este de asemenea exprimat pe celulele T regatoare (Treg-uri) și s-a arătat că marchează un subset Treg supresiv în tumori. Analizele care utilizează ambele celule umane primare și modele preclinice pe șoareci au arătat că Treg-urile TIM-3⁺ sunt mai eficiente la inhibarea răspunsurilor celulelor T ajutătoare T 1 (Th1) și ajutătoare T 17 (Th17) decât Treg-urile TIM-3⁻ (Gautron și colab., (2014) Eur J Immunol 44(9): 2703-2711; Sakuishi și colab., (2013) Oncoimmunology, 2:e23849). Deoarece TIM-3 este exprimat pe Treg-uri puternic supresive, poate inhiba direct răspunsurile celulelor T CD4⁺ și CD8⁺. În plus, Treg-urile TIM-3⁺ exprimă niveluri ridicate de IL-10, care au fost propuse să conducă epuizarea celulelor T efectoare în TME ca un mecanism suplimentar indirect de suprimare a răspunsurilor imune antitumorale (Sakuishi și colab., (2013) Oncoimmunology, 2:e23849).

TIM-3 este exprimat pe câteva tipuri de celule imune native, incluzând monocite/macrofage, celule dendritice, și celule NK. Datele existente sunt consistente cu un rol supresiv pentru TIM-3 în aceste tipuri de celule diferite.

TIM-3 este exprimat constitutiv prin circulația monocitelor CD14⁺ în donatori sănătoși, și expresia sa pe monocitele periferice este semnificativ crescută la pacienții cu inflamație cronică și cancer (Rong și colab., (2014) *Tissue Antigens* 83(2):76-81). Nivelurile TIM-3 sunt de asemenea suprareglate pe macrofagele care s-au infiltrat în tumorile carcinomului hepatocelular (HCC), în comparație cu macrofagele de la țesuturile adiacente, și s-a propus să joace un rol în conducerea polarizării macrofagelor la un fenotip care promovează tumoarea M2.

Recent, s-a raportat că TIM-3 este exprimat pe celule dendritice care se infiltrează în tumorile șoarecilor. În aceste setări, interacțiunea TIM-3 cu HMBG1 a fost propusă să suprimă imunitate nativă prin interferarea cu recunoașterea de și răspunsul la acidul nucleic imunostimulator (Chiba și colab., (2012) *Immunol* 13(9): 832-842). TIM-3 este de asemenea exprimat constitutiv pe celulele NK din sângele periferic. Un recent studiu a prezentat că celulele NK de la pacienții cu melanom avansat exprimă niveluri ridicate de TIM-3 pe celulele NK periferice. Important, celulele NK TIM-3⁺ au fost epuizate funcțional și blocada anti-TIM-3 a fost capabilă de inversarea epuizării și ameliorarea funcționării celulelor NK (da Silva și colab., (2014) *Cancer Immunol Res* 2(5): 410-422).

TIM-3 leagă liganzii galectin-9 (Gal-9), fosfatidilserină (PtdSer), HMGB1 și CEACAM-1. Lectina de tip S galectin-9 poate inhiba funcția efectoră Th1 asociată cu TIM-3 și induce apoptoza pe celulele T care exprimă TIM-3 în modelele murine. PtdSer rezidă uzual pe partea intracelulară a membranei plasmatică, dar este răsturnat spre partea extracelulară în timpul apoptozei. PtdSer leagă o despicătură conservată în toți cei trei membri umani ai familiei TIM (TIM-1, 3, 4). Inhibarea legării PtdSer la TIM-3 poate activa răspunsul celulei T. Galectin-9 este secretat de către celulele tumorale și poate contribui la evaziunea de la imunitatea antitumorală. Alarmina ADN HMGB1, pentru care TIM-3 poate acționa ca „chiuvetă”, poate preveni interacțiunile HMGB 1/RAGE care stimulează imunitatea nativă. CEACAM-1 poate interacționa cu TIM-3 atât în cis ca heterodimer pe celulele T cât și în trans ca ligand. Interacțiunea între CEACAM-1 și TIM-3 poate ajuta la medierea blocării semnalizării răspunsului imun. Coblocarea TIM-3 și CEACAM-1 în carcinomul de colon CT26 a prezentat eficacitate similară cu cea văzută pentru coblocarea PD-L1 și TIM-3.

Invenția furnizează un anticorp antagonist bispecific cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56, care se leagă specific la PD-1, și se leagă la TIM-3. Astfel, blocarea TIM-3 utilizând anticorpii bispecifici ai invenției descrise aici care inhibă funcționarea TIM-3 poate îmbunătăți răspunsul imun împotriva infecției și imunității anti-tumorale.

Inhibarea legării TIM-3 la galectin-9 prin anticorpii bispecifici ai invenției poate fi evaluată utilizând ELISA concurențială. Într-un test exemplificativ, 1 μg/ml de Fc-TIM-3 uman recombinant este legat pe godeurile plăcilor de microtitrare, godeurile sunt spălate și blocate, și se adaugă 10 μg/ml anticorp de test. Fără spălare, se adaugă 7,5 μg/ml de galectin-9 în godeuri și se incubează timp de 30 min, după care se adaugă 0,5 μg/ml anticorp antigalectin-9-biotină și se incubează timp de 30 min. Plăcile sunt spălate și se adaugă 0,5 μg/mL de anticorp policlonal conjugat neutravidin-HRP și se incubează timp de 30 minute. Plăcile sunt spălate și se adaugă substratul de chemiluminiscență POD imediat înainte de citirea semnalului de luminiscență. Anticorpii bispecifici ai invenției inhibă legarea TIM-3 la galectin-9 când legarea galectinei-9 este redusă cu cel puțin aproximativ 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100% utilizând un test descris aici și în Exemplul 1. Exemple de anticorpi, care nu sunt parte a invenției, care inhibă legarea TIM-3 la galectin-9 sunt anticorpii TM3B103, TM3B105, TM3B107, TM3B108, TM3B109, TM3B113, TM3B189, TM3B190 și TM3B196.

În unele realizări, anticorpul bispecific antagonist care se leagă specific la TIM-3 ameliorează activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului.

În unele realizări, anticorpul bispecific antagonist care se leagă specific la TIM-3 ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, în care activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului este evaluată prin măsurarea unei ameliorări semnificative statistic a expresiei suprafeței CD 137 pe celulele T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului în conformitate cu metodele descrise în Exemplul 14.

Utilizarea CD137 ca marker de celule T CD8⁺ și CD4⁺ specifice antigenului care se extind ca răspuns la stimularea antigenului CMV au permis detecția efectelor funcționale ale anticorpilor TIM-3 bispecifici antagonisti ai invenției.

În unele realizări, anticorpul bispecific antagonist care se leagă specific la TIM-3 se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261).

În unele realizări, anticorpul bispecific antagonist care se leagă specific la TIM-3 se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261) și reziduurile 50-56 (DERDVNY) (SEQ ID NO: 262).

În unele realizări, anticorpul bispecific antagonist care se leagă specific la TIM-3 se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 90-102 (RIQIPGIMNDEKF) (SEQ ID NO: 263).

În unele realizări, anticorpul bispecific antagonistic care se leagă specific la TIM-3 se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 90-102 (RIQIPGIMNDEKF) (SEQ ID NO: 263) și reziduurile 50-56 (DERDVNY) SEQ ID NO: 262.

„În cadrul” înseamnă că 80% sau mai mult din reziduurile epitopului anticorpului bispecific se leagă la residuu în zonele de aminoacizi enumerate, și că până la 20% din reziduurile epitopului anticorpului bispecific se leagă la reziduurile din afara zonelor de aminoacizi enumerate.

Epitopul Tim-3 la care se leagă anticorpul bispecific poate fi rezolvat de exemplu utilizând schimbul hidrogen/deuteriu (schimb H/D) sau prin analizarea unei structuri cristaline a anticorpului în complex cu TIM-3. Reziduurile epitopului sunt cele care sunt protejate de anticorp cu cel puțin 5% diferență în nivelurile de deuterare prin schimb H/D sau acele reziduuri de aminoacizi expuse la suprafață determinate să lege anticorpul într-o structură cristalină a unui complex al anticorpului bispecific și TIM-3. În structura cristalină a unui complex al anticorpului și TIM-3, reziduurile epitopului sunt acele reziduuri TIM-3 care rezidă într-o distanță de 4Å sau mai mică față de orice reziduuri CDR ale anticorpului.

Într-un test de schimb H/D, proteina TIM-3 este incubată în prezența sau absența anticorpului în apă deuterată pe durate predeterminate conducând la incorporarea deuteriului la atomii de hidrogen schimbabili care sunt neprotejați de anticorp, urmată de digestia proteazei proteinei și analize ale fragmentelor de peptidă utilizând LC-MS. În un test exemplificativ, 5 μL de anticorp de test (10 μg) sau 5 μL de complex TIM-3 și anticorp de test (10 și respectiv 7,35 μg) sunt incubati cu 120 μL de tampon de marcare cu oxid de deuteriu (50mM fosfat, 100mM clorură de sodiu la pH 7,4) timp de 0 sec, 60 sec, 300 sec, 1800 sec, 7200 sec, și 14400 sec. Schimbul de deuteriu este stins prin adăugarea a 63 μL de 5 M clorhidrat de guanidină și pH-ul final este 2,5. Mostra stinsă este supusă la digestie pe-coloană de pepsină/protează de tip XIII și analiză LC-MS. Pentru digestia de pepsină/protează tip XIII, 5 μg de mostre în 125 μL tampon de control (50mM fosfat, 100mM clorură de sodiu la pH 7,4) sunt denaturate prin adăugarea a 63 μL de 5 M clorhidrat de guanidină (pH-ul final este 2,5) și incubarea amestecului timp de 3 min. Apoi, amestecul este supus la digestia pe-coloană a pepsinei/proteazei de tip XIII și peptidele rezultante analizate utilizând un sistem UPLC-MS compus dintr-un UPLC Waters Acquity cuplat la un spectrometru de masă Q Exactive™ Hibrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Seria de date MS este procesată utilizând software-ul HDX WorkBench pentru analiza datelor MS ale schimbului H/D. Nivelurile de deuteriu sunt calculate utilizând diferența medie de masă între peptida deuteriată și forma sa naivă (t_0). Identificarea peptidei este făcută prin căutarea datelor MS/MS față de secvența TIM-3 cu Mascot. Toleranța de masă pentru ionii precursori și produși este 20 ppm și 0,05 Da, respectiv.

Pentru cristalografia cu raze X, TIM-3 și anticorpul de test sunt exprimați și purificați utilizând protocoale standard. Complexul anticorp TIM-3/test este incubat peste noapte la 4°C, concentrat, și separat de speciile necomplexate utilizând cromatografia de excludere dimensională. Complexul este cristallizat prin metoda de difuzie a vaporilor din diferite soluții de test cunoscute, de exemplu soluții conținând PEG3350, citrat de amoniu și acid 2-(N-Morfolino)etansulfonic (MES).

Legarea anticorpilor în cadrul reziduurilor Tim-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261), 90-102 (RIQIPGIMNDEKF) (SEQ ID NO: 263) și/sau 50-56 (DERDVNY) (SEQ ID NO: 262) poate fi generată prin izolarea legării anticorpilor TIM-3 utilizând biblioteci de afișare pe bacteriofagi, selectând acei anticorpi care concurează cu anticorpul de referință TM3B105 (VH din SEQ ID NO: 146 și VL din SEQ ID NO: 156) sau TM3B291 (VH din SEQ ID NO: 172 și VL din SEQ ID NO: 173) pentru legare la TIM-3 cu 100%, și confirmând epitopul anticorpilor generați prin rezolvarea structurii cristaline a complexului anticorp/TIM-3. Alternativ, șoarecii, șobolanii sau iepurii pot fi imunizați utilizând peptide cuprinzând reziduurile 32-47, 90-102 și/sau 50-56 ale TIM-3 și anticorpii generați pot fi evaluați pentru legarea lor în regiunea enumerată.

SEQ ID NO: 164, 165, 166, 167, 168 și 169 reprezintă secvențele genului HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 ale antagoniștilor TIM-3 derivate din afișarea pe bibliotecile pe bacteriofagi. Secvențele genului au fost generate pe baza modelelor structurale care au condus la secvența de aliniere dată în **Figura 13, Figura 14, Figura 15, Figura 16, Figura 17 și Figura 18** și rezumată aici.

SEQ ID NO: 164

X₁₇YX₁₈MX₁₉,

în care

X₁₇ este N, S, G sau D;

X₁₈ este W sau A; și

X₁₉ este S sau H.

SEQ ID NO: 165

X₂₀IX₂₁X₂₂SGGSX₂₃YYADSKG,

în care

X₂₀ este A sau V;

X₂₁ este S sau K;

X₂₂ este G sau Y; și

X₂₃ este T sau K.

SEQ ID NO: 166

X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁DY,

5 în care

X₂₄ este D, S, N, G sau E;

X₂₅ este H, P, E, T sau L;

X₂₆ este W, E, N sau șters;

X₂₇ este D, P sau șters;

10 X₂₈ este P, Y, D sau șters;

X₂₉ este N, A, D, G sau șters;

X₃₀ este F, P, R, W sau V; și

X₃₁ este L sau F.

SEQ ID NO: 167

15 X₃₂X₃₃SQSVX₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LA,

în care

X₃₂ este R sau K;

X₃₃ este A sau S;

X₃₄ este S, N sau L;

20 X₃₅ este S, A, N sau șters;

X₃₆ este S sau șters;

X₃₇ este S sau șters;

X₃₈ este N sau șters;

X₃₉ este N sau șters;

25 X₄₀ este K sau șters;

X₄₁ este S, D or N; și

X₄₂ este Y sau T.

SEQ ID NO: 168

X₄₃ASX₄₄RX₄₅X₄₆,

30 în care

X₄₃ este G, D, W sau T;

X₄₄ este S, N sau T;

X₄₅ este A sau E; și

X₄₆ este T sau S.

35 **SEQ ID NO: 169**

QQX₄₇X₄₈X₄₉X₅₀PX₅₁T (SEQ ID NO: 169),

în care

X₄₇ este Y, G sau S;

X₄₈ este G sau Y;

40 X₄₉ este S, H sau T;

X₅₀ este S, A sau T; și

X₅₁ este L, I sau W.

SEQ ID NO: 78

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG

GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ

GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ERKCC

VECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VLV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT

ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

45 K

SEQ ID NO: 79

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLIYDA
 SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGGHAPITFGQGTKVEIKR
 TVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO: 240
 EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCC
 VECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 K

SEQ ID NO: 80
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYP
 GDGDIRYTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWEKSTTVVQ
 RNYFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKV
 DKTVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
 5 HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRY
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYPTFGQGTKLEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VH, VL, secvențele HCDR și LCDR ale anticorpilor antagonistici exemplificativi care se leagă
 10 specific la TIM-3 sunt prezentate în **Tabelul 3.**

Tabelul 3.

Nume mAb	SEQ ID NO:							
	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VH	VL
TM3B103	90	99	107	117	126	135	145	155
TM3B105	91	99	108	118	127	136	146	156
TM3B109	91	99	109	119	128	137	148	157
TM3B108	92	100	110	117	126	135	147	155
TM3B113	93	101	111	120	129	139	149	158
TM3B189	94	102	112	121	130	140	150	159
TM3B190	95	103	113	122	131	141	151	160
TM3B193	96	104	114	123	132	142	152	161
TM3B195	97	105	115	124	133	143	153	162
TM3B196	98	106	116	125	134	144	154	163
TM3B291	97	105	115	124	133	143	172	173

Anticorpi anti-PD-1/TIM-3 bispecfici

Invenția furnizează de asemenea anticorpi PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56.

Invenția furnizează de asemenea un anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic izolat cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56, și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției ameliorează activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției ameliorează activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, în care activarea ameliorată a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului este evaluată prin măsurarea unei creșteri statistic semnificative a expresiei suprafeței CD137 pe celulele T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției inhibă legarea TIM-3 la galectin-9.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C;

se leagă la PD-1 uman cu K_D de mai puțin de aproximativ 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C;

se leagă la PD-1 de cynomolgus cu K_D de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C; sau

se leagă la PD-1 de cynomolgus cu K_D de mai puțin de aproximativ 1 nM;

în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției ameliorează o activare a celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, în care activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului este evaluată prin măsurarea unei creșteri statistic semnificative a expresiei suprafeței CD137 pe celulele T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului și se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției ameliorează activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, în care activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului este evaluată prin măsurarea unei creșteri statistic semnificative a expresiei suprafeței CD137 pe celulele T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, și se leagă la PD-1 uman cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției ameliorează activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, în care activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului este evaluată prin măsurarea unei creșteri statistic semnificative a expresiei suprafeței CD137 pe celulele T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului și se leagă la PD-1 cynomolgus cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 100 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției ameliorează activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, în care activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului este evaluată prin măsurarea unei creșteri statistic semnificative a expresiei suprafeței CD137 pe celulele T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, și se leagă la PD-1 de cynomolgus cu o constantă de disociere la echilibru (K_D) de mai puțin de aproximativ 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

Anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției descriși aici pot fi evaluați pentru abilitatea lor de a ameliora activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului, pentru a inhiba legarea TIM-3 la galectin-9, și cineticele de legare la PD-1 uman sau de cynomolgus sau TIM-3 pot fi evaluate utilizând metodele descrise aici.

De exemplu, CD137 poate fi utilizat ca marker pentru activarea celulelor T CD4⁺ sau CD8⁺ specifice antigenului. Expresia suprafeței CD137 poate fi măsurată pe celulele T cultivate în prezența sau în absența unui anticorp de test, cum ar fi anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific, utilizând anticorp anti-CD 137 și un anticorp secundar conjugat de exemplu la un colorant fluorescent. Este evaluată diferența semnificativă statistic în semnalul obținut pe celulele T cultivate în prezența sau în absența anticorpului de test.

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261).

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261) și reziduurile 50-56 (DERDVNY) SEQ ID NO: 262.

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 90-102 (RIQIPGIMNDEKF) (SEQ ID NO: 263).

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 90-102 (RIQIPGIMNDEKF) (SEQ ID NO: 263) și reziduurile 50-56 (DERDVNY) SEQ ID NO: 262.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde secvențele de aminoacizi HCDR1, HCDR2 și HCDR3 din SEQ ID NO: 164, 165 și respectiv 166.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde secvențele de aminoacizi LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 167, 168 și respectiv 169.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde secvențele de aminoacizi HCDR1, HCDR2 și HCDR3 din SEQ ID NO: 164, 165 și respectiv 166, și secvențele de aminoacizi LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 167, 168 și respectiv 169.

Primul domeniu cuprinde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 10, 14, 17, 23, 26 și respectiv 32.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 ale

SEQ ID NO: 90, 99, 107, 117, 126 și respectiv 135;

SEQ ID NO: 91, 99, 108, 118, 127 și respectiv 136;

SEQ ID NO: 91, 99, 109, 119, 128 și respectiv 137;

SEQ ID NO: 92, 100, 110, 117, 126 și respectiv 135;

SEQ ID NO: 93, 101, 111, 120, 129 și respectiv 139;

SEQ ID NO: 94, 102, 112, 121, 130 și respectiv 140;

SEQ ID NO: 95, 103, 113, 122, 131 și respectiv 141;

SEQ ID NO: 96, 104, 114, 123, 132 și respectiv 142;

SEQ ID NO: 97, 105, 115, 124, 133 și respectiv 143; sau

SEQ ID NO: 98, 106, 116, 125, 134 și respectiv 144.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154 sau 172, VH având opțional una, două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, douăsprezece, treisprezece, paisprezece sau cincisprezece substituții conservative de aminoacizi. Opțional, orice substituție nu este în regiunile CDR.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde VL din SEQ NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 sau 173, VL având opțional una, două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, douăsprezece, treisprezece, paisprezece sau cincisprezece substituții conservative de aminoacizi. Opțional, orice substituție nu este în regiunile CDR.

În unele realizări, al doilea domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154 sau 172 și VL din SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 sau 173, VH și VL având opțional una, două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, douăsprezece, treisprezece, paisprezece sau cincisprezece substituții conservative de aminoacizi. Opțional, orice substituție nu este în regiunile CDR.

Primul domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56.

Invenția furnizează de asemenea un anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic izolat cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3, în care primul domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56, și al doilea domeniu cuprinde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 91, 99, 108, 118, 127 și respectiv 136.

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261).

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic se leagă la TIM-3 în reziduurile TIM-3 32-47 (WGKGACPVFECGNVVL) (SEQ ID NO: 261) și reziduurile 50-56 (DERDVNY) SEQ ID NO: 262.

În unele realizări, anticorpus PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic inhibă legarea TIM-3 la galectin-9.

În unele realizări, primul domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 și al doilea domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 146 și VL din SEQ ID NO: 156.

În unele realizări, anticorpus este un izotip IgG1.

În unele realizări, anticorpus este un izotip IgG2.

În unele realizări, anticorul este un izotip IgG2 cuprinzând o substituție F405L și/sau K409R.

În unele realizări, anticorul este un izotip IgG2, cuprinzând opțional substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorul este un izotip IgG3.

5 În unele realizări, anticorul este un izotip IgG4, cuprinzând opțional o substituție S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorul este un izotip IgG4 cuprinzând o substituție F405L și K409R.

În unele realizări, anticorul este un izotip IgG4 cuprinzând o substituție a lanțului greu S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

10 În unele realizări, anticorul PD-1/TIM-3 bispecific antagonist izolat cuprinde un prim lanț greu (HC1), un prim lanț ușor (LC1), un al doilea lanț greu (HC2), și un al doilea lanț ușor (LC2) din SEQ ID NO: 241, 188, 245 sau respectiv 194.

În unele realizări, anticorul PD-1/TIM-3 bispecific antagonist izolat cuprinde HC1, LC1, HC2 și LC2 din SEQ ID NO: 186, 188, 191 sau respectiv 194.

15 În unele realizări, anticorul PD-1/TIM-3 bispecific antagonist izolat cuprinde HC1, LC1, HC2 și LC2 din SEQ ID NO: 186, 188, 248 sau respectiv 194.

În unele realizări, anticorul PD-1/TIM-3 bispecific antagonist izolat cuprinde HC1, LC1, HC2 și LC2 din SEQ ID NO: 243, 188, 246 sau respectiv 194.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer.

20 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei tumori solide.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui melanom.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer pulmonar.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer pulmonar nonmicrocelular (NSCLC).

25 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui NSCLC scuamos.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui NSCLC non-scuamos.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui adenocarcinom la plămân.

30 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom cu celule renale (RCC).

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui mezoteliom.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom nazofaringeal (NPC).

35 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer colorectal.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la prostată.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la prostată rezistent la castrare.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la stomac.

40 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer ovarian.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer gastric.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer hepatic.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea cancerului pancreatic.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la tiroidă.

45 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom cu celule scuamoase de cap și gât.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui carcinom de esofag sau tract gastrointestinal.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la sân.

50 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer al trompei uterine.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer la creier.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer uretral.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei endometrioze.

55 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unui cancer de col uterin.

Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie, de exemplu în tratarea unei leziuni metastatice canceroase.

60 Anticorul este adecvat pentru utilizare în terapie la un subiect care este tratat sau care a fost tratat cu anticorpi anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 230 și VL din SEQ ID NO: 231. (de exemplu KEYTRUDA® (pembrolizumab)).

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie la un subiect care este tratat sau care a fost tratat cu anticorpi anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 232 și VL din SEQ ID NO: 233. (de exemplu OPDIVO® (nivolumab)).

5 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie la un subiect care este refractar la tratamentul cu anticorpi anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 230 și VL din SEQ ID NO: 231. (de exemplu KEYTRUDA® (pembrolizumab)).

Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie la un subiect care este refractar la tratamentul cu anticorpi anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 232 și VL din SEQ ID NO: 233. (de exemplu OPDIVO® (nivolumab)).

10 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie la un subiect care are o tumoare recidivată după tratamentul cu anticorpi anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 230 și VL din SEQ ID NO: 231. (de exemplu KEYTRUDA® (pembrolizumab)).

15 Anticorpul este adecvat pentru utilizare în terapie la un subiect care are o tumoare recidivată după tratamentul cu anticorpi anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 232 și VL din SEQ ID NO: 233. (de exemplu OPDIVO® (nivolumab)).

20 Invenția furnizează de asemenea un anticorp PD-1/Tim-3 bispecific antagonist izolat cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3, în care primul domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56, și al doilea domeniu cuprinde HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3 din SEQ ID NO: 97, 105, 115, 124, 133 și respectiv 143.

În unele realizări, primul domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 și al doilea domeniu cuprinde VH din SEQ ID NO: 153 și VL din SEQ ID NO: 156.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG1.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG2.

25 În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG2 cuprinzând o substituție F405L și/sau K409R.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG2, cuprinzând opțional substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG3.

30 În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG4, cuprinzând opțional o substituție S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG4 cuprinzând o substituție F405L și K409R.

În unele realizări, anticorpul este un izotip IgG4 cuprinzând o substituție a lanțului greu S228P în comparație cu IgG4 de tip sălbatic.

35 În unele realizări, anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific izolat cuprinde HC1, LC1, HC2 și LC2 din SEQ ID NO: 186, 188, 190 și respectiv 193.

Exemple de anticorpi PD-1/TIM-3 bispecifici antagonisti ai invenției având anumite secvențe VH, VL, HCDR și LCDR așa cum se arată în **Tabelul 4** și **Tabelul 5**.

Tabelul 4.

mAb	SEQ ID NO ale brațului de legare PD-1:							
	VH	VL	Regiuni HCDR			Regiuni LCDR		
			1	2	3	1	2	3
PTBB 14	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB15	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB24	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB30	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB27	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB28	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB20	48	56	10	14	17	23	26	32
PTBB21	48	56	10	14	17	23	26	32

Tabelul 5.

mAb	SEQ ID NO ale brațului de legare TIM-3:							
	VH	VL	HRegiuni CDR			LCDR2		
			1	2	3	1	2	3
PTBB 14	153	162	97	105	115	124	133	143

mAb	SEQ ID NO ale brațului de legare TIM-3:							
	VH	VL	HRegiuni CDR			LCDR2		
			1	2	3	1	2	3
PTBB15	146	156	91	99	108	118	127	136
PTBB24	172	173	97	105	115	124	133	143
PTBB30	146	156	91	99	108	118	127	136
PTBB27	172	173	97	105	115	124	133	143
PTBB28	146	156	91	99	108	118	127	136
PTBB20	146	156	91	99	108	118	127	136
PTBB21	172	173	97	105	115	124	133	143

Anticorpi modificați genetic și modificați

Anticorpii invenției pot fi modificați genetic suplimentar pentru a genera anticorpi modificați cu proprietăți similare sau alterate în comparație cu anticorpii parentali. VH, VL, VH și VL, regiunile constante, cadrul VH, cadrul VL, sau oricare sau toate dintre cele șase regiuni CDR pot fi modificate genetic în anticorpii invenției.

„Anticorpii invenției” așa cum s-au utilizat în acest document se referă la anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56 și anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56, și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3 (de exemplu anticorpi PD-1/TIM-3 bispecfici) cum s-a descris aici.

În unele realizări, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici ai invenției cuprind HDCR1 din SEQ ID NO: 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 sau 98, HCDR2 din SEQ ID NO: 99, 100, 101, 102, 10, 104, 105 sau 106, HCDR3 din SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 sau 116, și VL care cuprinde LCDR1 din SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 sau 125, LCDR2 din SEQ ID NO: 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 sau 134, și/sau LCDR3 din SEQ ID NO: 135, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 143 sau 144, în care cadrul VH este derivat din secvențele genei liniei germinative umane VH altele decât cele ale IGHV3-23 (SEQ ID NO: 174), IGHV1-02 (SEQ ID NO: 175), IGHV4-30-4 (SEQ ID NO: 176), IGHV1-03 (SEQ ID NO: 177), IGHV2-26 (SEQ ID NO: 178) sau IGHV5-51 (SEQ ID NO: 179), și cadrul VL este derivat din secvențele genei liniei germinative umane VL altele decât cele ale IGKV3-20 (A27) (SEQ ID NO: 180), IGKV3-11 (L6) (SEQ ID NO: 171), IGKV4-1 (B3) (SEQ ID NO: 181), IGKV1-39 (O12) (SEQ ID NO: 182) sau IGKV1-33 (O18) (SEQ ID NO: 183).

Secvențele cadru care vor fi utilizate pot fi obținute din baza de date ADN publică sau referiri publicate care includ secvențe genetice de anticorpi ai liniei germinative. De exemplu, ADN al liniei germinative și secvențele codificate de proteină ale genelor regiunii variabile a lanțului greu și ușor umane pot fi găsite la IMGT®, sistemul informatic internațional® ImunoGeneTics (<http://www-imgt.org>). Secvențele cadru care pot fi utilizate pentru a înlocui secvențele cadru existente în anticorpii invenției pot fi cele care prezintă cea mai mare identitate procentuală cu cadrele parentale pe întreaga lungime a VH sau VL, sau pe lungimea FR1, FR2, FR3 și FR4. În plus, cadre adecvate pot fi selectate suplimentar pe baza lungimilor CDR1 și CDR2 VH și VL sau a structurii canonice identice a LCDR1, LCDR2, LCDR3, HDCR1 și HDCR2. Cadrele adecvate pot fi selectate utilizând metode cunoscute, cum ar fi adaptarea cadrului uman descrisă în brevetul S.U.A. nr. 8.748.356 sau superumanizarea descrisă în brevetul S.U.A. nr. 7.709.226.

Secvențele cadru ale anticorpilor parentali și modificați genetic pot fi modificate suplimentar, de exemplu prin mutații inverse pentru a reface și/sau îmbunătăți legarea anticorpului generat la antigen cum s-a descris de exemplu în brevetul S.U.A. nr. 6.180.370. Secvențele cadru ale anticorpilor parentali sau modificați genetic pot fi modificate suplimentar prin mutarea unuia sau mai multe reziduuri în regiunea cadru, sau în una sau mai multe regiuni CDR, pentru a îndepărta epitopii celulei T pentru a reduce prin urmare potențiala imunogenicitate a anticorpului. Această abordare este cea la care se face referire de asemenea ca „deimunizare” și este descrisă mai detaliat în publicația de brevet S.U.A. nr. US20070014796.

Reziduurile CDR ale anticorpilor invenției pot fi mutate pentru a îmbunătăți afinitate anticorpilor la PD-1, TIM-3, sau PD-1 și TIM-3.

Reziduurile CDR ale anticorpilor invenției pot fi mutate, de exemplu pentru a minimiza riscul de modificări post-translaționale. Reziduurile de aminoacid ale motivelor putative pentru deaminare (NS), hidroliză catalizată de acid (DP), izomerizare (DS), sau oxidare (W) pot fi substituite cu orice aminoacizi care apar natural pentru a mutageniza motivele, și anticorpi rezultați pot fi testați pentru funcționalitatea și stabilitatea lor utilizând metodele descrise aici.

Substituțiile Fc pot fi făcute anticorpilor invenției pentru a modula funcțiile efectoare și proprietățile farmacocinetice ale anticorpilor. În funcționarea imună tradițională, interacțiunea complexilor anticorp-antigen cu celulele sistemului imunitar conduce la o matrice largă a răspunsurilor, care variază de la funcții efectoare cum ar fi citotoxicitatea dependentă de anticorp, degranularea mastocitelor, și fagocitoza până la semnale imunomodulatoare cum ar fi reglarea proliferării limfocitelor și secreția de anticorpi. Toate aceste interacțiuni sunt inițiate prin legarea domeniului Fc al anticorpilor sau complexilor imunitari la receptori specializați de pe suprafața celulară pe celulele hematopoietice. Diversitatea răspunsurilor celulare declanșate de anticorpi și complexii imunitari rezultă din eterogenitatea structurală a celor trei receptori Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), și FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) și FcγRIII (CD16) sunt „receptori Fcγ de activare” (adică, de amplificare a sistemului imunitar); FcγRIIB (CD32B) este un „receptor Fcγ de inhibare” (adică, de amortizare a sistemului imunitar). Legare la receptorul FcRn modulează perioada de înjumătățire a anticorpului.

În unele realizări, anticorpii antagoniști ai invenției cuprind cel puțin o substituție într-o regiune Fc.

În unele realizări, anticorpii antagoniști ai invenției cuprind una, două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, unsprezece, douăsprezece, treisprezece, paisprezece sau

Pozițiile Fc care pot fi substituite pentru a modula perioada de înjumătățire a anticorpului sunt cele descrise de exemplu în Dall'Acqua și colab., (2006) J Biol Chem 281:23514-240, Zalevsky și colab., (2010) Nat Biotechnol 28:157-159, Hinton și colab., (2004) J Biol Chem 279(8):6213-6216, Hinton și colab., (2006) J Immunol 176:346-356, Shields și colab. (2001) J Biol Chem 276:6591-6607, Petkova și colab., (2006) Int Immunol 18:1759-1769, Datta-Mannan și colab., (2007) Drug Metab Dispos, 35:86-94, 2007, Vaccaro și colab., (2005) Nat Biotechnol 23:1283-1288, Yeung și colab., (2010) Cancer Res, 70:3269-3277 și Kim și colab., (1999) Eur J Immunol 29: 2819, și includ pozițiile 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 și 435. Exemple de substituții care pot fi făcute singular sau în combinație sunt substituțiile T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A și H435R. Exemple de substituții singulare sau în combinație care pot fi făcute pentru a crește perioada de înjumătățire a anticorpului sunt substituțiile M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A și T307A/E380A/N434A. Exemple de substituții singulare sau în combinație care pot fi făcute pentru a reduce perioada de înjumătățire a anticorpului sunt substituțiile H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A și H435R.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc la poziția de aminoacid 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 sau 435.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc selectată din grupul constând din T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A și H435R.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc selectată din grupul constând din M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A, T307A/E380A/N434A, H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A și H435R.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc care reduce legarea anticorpului la un receptor Fcγ de activare (FcγR) și/sau reduce funcțiile efectoare Fc cum ar fi legarea la C1q, citotoxicitatea dependentă de complement (CDC), citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp (ADCC) sau fagocitoza (ADCP).

Pozițiile Fc care pot fi substituite pentru a reduce legarea anticorpului la FcγR de activare și ulterior pentru a reduce funcțiile efectoare sunt cele descrise de exemplu în Shields și colab., (2001) J Biol Chem 276:6591-6604, publicația de brevet internațional nr. WO2011/066501, brevetele S.U.A. numerele 6.737.056 și 5.624.821, Xu și colab., (2000) Cell Immunol, 200:16-26, Alegre și colab., (1994) Transplantation 57:1537-1543, Bolt și colab., (1993) Eur J Immunol 23:403-411, Cole și colab., (1999) Transplantation, 68:563-571, Rother și colab., (2007) Nat Biotechnol 25:1256-1264, Ghevaert și colab., (2008) J Clin Invest 118:2929-2938, An și colab., (2009) mAbs, 1:572-579 și includ pozițiile 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 și 365. Exemple de substituții care pot fi făcute singular sau în combinație sunt substituțiile K214T, E233P, L234V, L234A, deleție de G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S și P331S în IgG1,

IgG2, IgG3 sau IgG4. Exemple de substituții de combinație care conduc la anticorpi cu ADCC redusă sunt substituțiile L234A/L235A pe IgG1, V234A./G237A/ P238S/H268A/V309L/A330S/P331S pe IgG2, F234A/L235A pe IgG4, S228P/F234A/ L235A pe IgG4, N297A pe toate izotipurile Ig, V234A/G237A pe IgG2, K214T/E233P/ L234V/L235A/G236-șters/A327G/P331A/D365E/L358M pe IgG1, H268Q/V309L/ A330S/P331S pe IgG2, S267E/L328F pe IgG1, L234F/L235E/D265A pe IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S pe IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S pe IgG4, și S228P/F234A/L235A/G236-șters/G237A/P238S pe IgG4. Domeniile Fc IgG2/4 hibride pot fi de asemenea utilizate, cum ar fi Fc cu reziduurile 117-260 din IgG2 și reziduurile 261-447 din IgG4.

Bine cunoscuta substituție S228P poate fi făcută în anticorpii IgG4 pentru a ameliora stabilitatea IgG4.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție în cel puțin o poziție a rezidului 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 sau 365, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție selectată din grupul constând din K214T, E233P, L234V, L234A, deleție de G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S și P331S, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție în cel puțin o poziție a rezidului 228, 234, 235, 237, 238, 268, 330 sau 331, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție S228P, în care numerotarea reziduurilor în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție V234A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție F234A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție G237A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție P238S, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție H268A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție Q268A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție A330S, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind o substituție P331S, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind substituțiile L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S și P331S, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind substituțiile F234A, L235A, G237A, P238S și Q268A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind substituțiile L234A, L235A sau L234A și L235A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind substituțiile F234A, L235A sau F234A și L235A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind substituțiile S228P, F234A și L235A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție într-un anticorp Fc care ameliorează legarea anticorpului la un receptor Fcγ (FcγR) și/sau ameliorează funcțiile Fc efectoare cum ar fi legarea la C1q, citotoxicitatea dependentă de complement (CDC), citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp (ADCC) sau fagocitoză (ADCP).

În plus față de activitatea lor imunomodulatoare, anticorpii PD-1 sau TIM-3 ai invenției pot ucide celule tumorale care exprimă PD-1 și/sau TIM-3 direct prin funcțiile efectoare mediate de anticorp, de exemplu prin ADCC, ADCP sau CDC.

Pozițiile Fc care pot fi substituite pentru a crește legarea anticorpului la Fcγ de activare și/sau ameliora funcțiile efectoare ale anticorpului sunt cele descrise de exemplu în brevetul S.U.A. nr. 6.737.056, publicația de brevet S.U.A. nr. 2015/0259434, Shields și colab., (2001) J Biol Chem 276:6591-6604, Lazar și colab., (2006) Proc Natl Acad Sci, 103:4005-4010, Stavenhagen și colab.,

(2007) Cancer Res 67:8882-8890, Richards și colab., (2008) Mol Cancer Ther 7:2517-2527, Diebold și colab., Science; publicată online pe 13 martie 2014; doi:10.1126/science.1248943, și includ pozițiile 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 sau 430 (numerotarea reziduurilor în conformitate cu indicele EU). Exemple de substituții care pot fi făcute singular sau în combinație sunt G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T și P396L. Exemple de substituții în combinație care conduc la anticorpi cu ADCC sau ADCP crescute sunt substituțiile S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L și G236A/S239D/I332E pe IgG1.

10 Pozițiile Fc care pot fi substituite pentru a ameliora CDC a anticorpului sunt cele descrise de exemplu în cererea de brevet internațional WO2014/108198, Idusogie și colab., (2001) J Immunol 166:2571-2575 și Moore și colab., (2010) Mabs, 2:181-189, și includ pozițiile 267, 268, 324, 326, 333, 345 și 430. Exemple de substituții care pot fi făcute singular sau în combinație sunt substituțiile S267E, H268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F și E430T.

15 Exemple de substituții de combinație care conduc la anticorpi cu CDC crescută sunt substituțiile K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T și S267E/H268F/S324T pe IgG1.

„Citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp“, „citotoxicitatea mediata celular dependentă de anticorp“ sau „ADCC“ este un mecanism pentru inducerea morții celulei care depinde de interacțiunea celulelor țintă acoperite cu anticorpi cu celulele efectoare care posedă activitate litică, cum ar fi celulele ucigașe naturale, monocitele, macrofagele și neutrofilele prin receptori gama Fc (FcγR) exprimați pe celule efectoare. De exemplu, celulele NK exprimă FcγRIIIa, în timp ce monocitele exprimă FcγRI, FcγRII și FcγRIIIa. Moartea celulei țintă acoperită cu anticorp, cum ar fi celulele care exprimă PD-1 sau TIM-3, are loc ca rezultat al activității celulei efectoare prin secreția proteinelor și protezelor care formează porii membranei. Pentru a evalua activitatea ADCC a anticorpului invenției descrise aici, anticorpul poate fi adăugat la celule care exprimă TIM-3 sau PD-1 în combinație cu celule efectoare imune, care pot fi activate de către complecși anticorp antigen conducând la citoliza celulei țintă. Citoliza poate fi detectată prin eliberarea de etichetă (de exemplu substraturi radioactive, coloranți fluorescenți sau proteine intracelulare naturale) din celulele lizate. Exemple de celule efectoare pentru astfel de teste includ celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) și celulele NK. Exemple de celule țintă includ celulele care exprimă TIM-3 sau PD-1 fie endogen sau recombinant. Într-un test exemplificativ, celulele țintă sunt utilizate cu un raport de 1 celulă țintă la 50 de celule efectoare. Celulele țintă sunt pre-etichetate cu BATDA (PerkinElmer) timp de 20 minute la 37°C, spălate de două ori și resuspendate în DMEM, 10% FBS inactivat termic, 2mM L-glutamină (toate de la Invitrogen). Ținta (1×10^4 celule) și celulele efectoare ($0,5 \times 10^6$ celule) sunt combinate și 100 μl de celule se adaugă la godeurile plăcilor cu fundul în formă de U cu 96 de godeuri. Se adaugă suplimentar 100 μl cu sau fără anticorpi de test. Plăcile sunt centrifugate la 200g timp de 3 minute, incubate la 37°C timp de 2 ore, și apoi centrifugate din nou la 200g timp de 3 minute. Un total de 20 μl de supernatant este îndepărtat pe godeu și lizarea celulei este măsurată prin adăugarea a 200 μl de reactiv pe bază de Europiu DELPHIA (PerkinElmer). Datele sunt normalizate la citotoxicitatea maximă cu 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) și controlul minimal determinat prin eliberarea spontană de BATDA din celulele țintă în absența oricărui anticorp. Anticorpul invenției poate induce ADCC cu aproximativ 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100%.

„Fagocitoza celulară dependentă de anticorp“ („ADCP“) se referă la un mecanism de eliminare a celulelor țintă acoperite de anticorp prin internalizare cu celule fagocitice, cum ar fi macrofagele sau celulele dendritice. ADCP poate fi evaluată prin utilizarea macrofagelor derivate din monocite ca celule efectoare și celule Daudi (ATCC® CCL-213™) sau leucemie cu celule B sau limfom sau celule tumorale care exprimă TIM-3 sau PD-1 ca celule țintă modificate genetic pentru a exprima GFP sau altă moleculă marcată. Raportul celulelor efectoare:țintă poate fi de exemplu 4:1. Celulele efectoare pot fi incubate cu celulele țintă timp de 4 ore cu sau fără anticorpul invenției. După incubare, celulele pot fi detașate utilizând acutaza. Macrofagele pot fi identificate cu anticorpi anti-CD 11b și anti-CD 14 cuplați la o etichetă fluorescentă, și fagocitoza procentuală poate fi determinată pe baza % de fluorescență GFP în macrofagele CD11⁺CD14⁺ utilizând metode standard. Anticorpul invenției poate induce ADCP cu aproximativ 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100%.

„Citotoxicitatea dependentă de complement“, sau „CDC“, se referă la un mecanism pentru inducerea morții celulei în care domeniul efector Fc al unui anticorp legat țintă se leagă și activează componenta complementului C1q care în schimb activează cascada complementului conducând la moartea celulei țintă. Activarea complementului poate conduce de asemenea la depozitia de componente ale complementului pe suprafața celulei țintă care facilitează ADCC prin legarea receptorilor complementului (de exemplu, CR3) pe leucocite. CDC a celulelor care exprimă TIM-3 sau PD-1 poate fi

măsurată de exemplu prin placarea celulelor Daudi la 1×10^5 celule/godeu (50 μ l/godeu) în RPMI-B (RPMI suplimentat cu 1% BSA), adăugând 50 μ l de anticorpi de test la godeuri la o concentrație finală între 0-100 μ g/ml, incubând reacția timp de 15 min la temperatura camerei, adăugând 11 μ l de ser uman grupat la godeuri, și incubând reacția timp de 45 min la 37°C. Procentajul (%) de celule lizate poate fi detectat ca % de celule colorate cu iodură de propidium în testul FACS utilizând metode standard. Anticorpii invenției pot induce CDC cu aproximativ 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau 100%.

Abilitatea anticorpilor invenției descrise aici de a induce ADCC poate fi ameliorată prin modificarea genetică a componentei oligozaharidă a acestora. IgG1 sau IgG3 umane sunt N-glicozilate la Asn297 cu majoritatea glicanilor în bine cunoscutele forme biantenare G0, G0F, G1, G1F, G2 sau G2F. Anticorpii produși prin celule CHO nemodificate genetic, au de obicei un conținut de fucoză glicanică de aproximativ cel puțin 85%. Îndepărtarea fucozei miezului oligozaharidelor de tip complex biantenar atașate la regiunile Fc ameliorează ADCC a anticorpilor prin legarea Fc γ RIIIa îmbunătățită fără alterarea legării la antigen sau a activității CDC. Astfel de mAb-uri pot fi obținute utilizând diferite metode raportate că conduc la expresia cu succes a anticorpilor defucozilați relativ mari care poartă tipul de complex biantenar de oligozaharide Fc cum ar fi control osmolalității culturii (Konno și colab., (2012) Cytotechnology 64:249-65), aplicație a unei linii CHO variante, Lec13 ca linie de celule gazdă (Shields și colab., (2002) J Biol Chem 277:26733-26740), aplicație a unei linii CHO variante, EB66 ca linie de celule gazdă (Olivier și colab., MABs ;2(4), 2010; Epub ahead of print; PMID:20562582), aplicație a unei linii celulare hibridom de șobolan, YB2/0 ca linie de celule gazdă (Shinkawa și colab., (2003) J Biol Chem 278:3466-3473), introducerea unui ARN mic de interferare specific împotriva genei α 1,6-fucoziltransferază (*FUT8*) (Mori și colab., (2004) Biotechnol Bioeng 88:901-908), sau coexprimarea de β -1,4-N-acetilglucozaminiltransferază III și Golgi α -manosidază II sau un inhibitor potent alfa-manosidază I, kifunenzină (Ferrara și colab., (2006) J Biol Chem 281:5032-5036, Ferrara și colab., (2006) Biotechnol Bioeng 93:851-861; Xhou și colab., (2008) Biotechnol Bioeng 99:652-65).

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc care ameliorează funcțiile efectoare ale anticorpusului.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc la poziția de aminoacid 236, 239, 243, 256, 267, 268, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 324, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 sau 430.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc selectată din grupul constând din G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T, P396L, S267E, H268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F și E430T.

În unele realizări, anticorpii invenției cuprind cel puțin o substituție în anticorpusul Fc selectată din grupul constând din S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305L/P396L, G236A/S239D/I332E, K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T și S267E/H268F/S324T.

În unele realizări, anticorpii invenției au o structură glicană biantenară cu conținut de fucoză de la aproximativ 0% până la aproximativ 15%, de exemplu de 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% sau 0%.

În unele realizări, anticorpii invenției au o structură glicană biantenară cu conținut de fucoză de aproximativ 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% sau 0%.

Substituțiile în Fc și conținutul redus de fucoză pot ameliora activitatea ADCC a anticorpilor antagoniști legând specific TIM-3 sau PD-1 ai invenției. Anticorpii TIM-3 sau PD-1 cu activitate ADCC, ADCP și/sau CDC ameliorată pot fi utili în tratamentul pacienților cu TIM-3 și/sau PD-1 care exprimă tumori, incluzând malignități heme.

„Conținutul de fucoză” înseamnă cantitatea de monozaharidă de fucoză în catena de zahăr la Asn297. Cantitatea relativă de fucoză este procentajul de structuri care conțin fucoză înrudite cu toate glicostructurile. Acestea pot fi caracterizate și cuantificate prin metode multiple, de exemplu: 1) utilizând MALDI-TOF al mostrei tratate cu N-glicozidază F (de exemplu structuri complexe, hibride și oligo- și puternic-manoză) cum s-a descris în publicația de brevet internațional nr. WO2008/077546; 2) prin eliberare enzimatică a glicanilor Asn297 cu derivatizarea ulterioară și detecția/ cuantificarea prin HPLC (UPLC) cu detecție fluorescentă și/sau HPLC-MS (UPLC-MS); 3) analiza proteinei intacte a mAb-urilor native sau reduse, cu sau fără tratamentul glicanilor Asn297 cu Endo S sau altă enzimă care clivează între prima și a doua monozaharidă GlcNAc, lăsând fucoza atașată la prima GlcNAc; 4) digestia mAb la peptida constituentă prin digerare enzimatică (de exemplu, tripsină sau endopeptidază Lys-C), și separare ulterioară, detecție și cuantificare prin HPLC-MS (UPLC-MS) sau 5) separarea oligozaharidelor mAb din proteina mAb prin deglicozilare enzimatică specifică cu PNGase F la Asn 297. Oligozaharidele eliberate pot fi etichetate cu un fluorofor, separate și identificate prin diferite tehnici complementare care permit

caracterizarea fină a structurilor de glicani prin spectrometrie de masă cu ionizare cu desorbție laser asistată matriceal (MALDI) prin compararea maselor experimentale cu masele teoretice, determinarea gradului de sialilare prin HPLC cu schimbare de ioni (GlicoSep C), separare și cuantificare a formelor de oligozaharide în conformitate cu criteriile de hidrofilicitate prin HPLC cu fază normală (GlicoSep N), și separare și cuantificare a oligozaharidelor prin fluorescență indusă laser prin electroforeză capilară de înaltă performanță (HPCE-LIF).

„Fucoză scăzută” sau „conținut scăzut de fucoză” se referă la anticorpi cu conținut de fucoză de aproximativ 0% - 15%.

„Fucoză normală” sau „conținut normal de fucoză” se referă la anticorpi cu conținut de fucoză de aproximativ peste 50%, de obicei de aproximativ peste 60%, 70%, 80% sau peste 85%.

Anticorpii invenției pot fi modificați post-translațional prin procedee cum ar fi glicozilare, izomerizare, deglicozilare sau modificare covalentă care nu apare natural cum ar fi adăugarea de radicali de polietilen glicol (PEGilare) și lipidare. Astfel de modificări pot avea loc *in vivo* sau *in vitro*. De exemplu, anticorpii invenției descrise aici pot fi conjugați la polietilen glicol (PEG-ilați) pentru a îmbunătăți profilul lor farmacocinetic. Conjugarea poate fi efectuată prin tehnici cunoscute celor calificați în domeniu. S-a arătat că conjugarea anticorpilor terapeutici cu PEG ameliorează farmacodinamicile în timp ce nu interferează cu funcționarea (Knigh și colab., (2004) Platelets 15:409-18; Leong și colab., (2001) Citokine 16:106-19; Yang și colab., (2003) Protein Eng 16:761-70).

Anticorpii invenției pot fi modificați pentru a îmbunătăți stabilitatea, selectivitatea, reticularitatea, afinitatea, imunogenicitatea sau alte proprietăți dorite biologice sau biofizice care sunt în domeniul invenției. Stabilitatea unui anticorp este influențată de un număr de factori, incluzând (1) împachetarea miezului domeniilor individuale care afectează stabilitatea lor intrinsecă, (2) interacțiunile interfeței proteină/proteină care au impact după împerecherea HC și LC, (3) îngroparea reziduurilor polare și încărcate, (4) rețeaua de legare H pentru reziduurile polare și încărcate; și (5) încărcarea suprafeței și distribuția reziduurilor polare printre alte forțe intra- și inter-moleculare (Worn și colab., (2001) J Mol Biol 305:989-1010). Potențialele reziduuri de destabilizare ale structurii pot fi identificate pe baza structurii cristaline a anticorpului sau prin modelarea moleculară în anumite cazuri, și efectul reziduurilor asupra stabilității anticorpului poate fi testat prin generarea și evaluarea variantelor care găzduiesc mutații în reziduurile identificate. O modalitate de a crește stabilitatea anticorpului este de a crește punctul de mijloc al tranziției termice (T_m) după cum s-a măsurat prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC). În general, proteina T_m este corelată cu stabilitatea sa și corelată invers cu susceptibilitatea sa la depliere și denaturare în soluție și procese de degradare care depind de tendința proteinei de a se deplia (Remmele și colab., (2000) Biopharm 13:36-46). Un număr de studii au găsit o corelație între variabilitatea stabilității fizice a formulărilor măsurate ca stabilitate termică prin DSC și stabilitate fizică măsurată prin alte metode (Gupta și colab., (2003) AAPS PharmSci 5E8; Zhang și colab., (2004) J Pharm Sci 93:3076-89; Maa și colab., (1996) Int J Pharm 140:155-68; Bedu-Addo și colab., (2004) Pharm Res 21:1353-61; Remmele și colab., (1997) Pharm Res 15:200-8). Studiile formulărilor sugerează că un Fab T_m are implicare în stabilitatea fizică pe termen lung a unui mAb corespunzător.

Lizina C-terminală (CTL) poate fi îndepărtată de anticorpii injectați prin carboxipeptidaze endogene în circulație în fluxul sanguin (Cai și colab., (2011) Biotechnol Bioeng 108:404-412). În timpul fabricării, îndepărtarea CTL poate fi controlată până la mai puțin de nivelul maxim prin controlul concentrației de Zn^{2+} extracelular, EDTA sau EDTA - Fe^{3+} cum s-a descris în publicația de brevet S.U.A. nr. US20140273092. Conținutul de CTL în anticorpi poate fi măsurat utilizând metode cunoscute.

În unele realizări, anticorpii invenției au un conținut de lizină C-terminală de aproximativ 10% până la aproximativ 90%, aproximativ 20% până la aproximativ 80%, aproximativ 40% până la aproximativ 70%, aproximativ 55% până la aproximativ 70%, sau aproximativ 60%.

În unele realizări, anticorpii invenției au un conținut de lizină C-terminală de aproximativ 0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% sau 100%.

Metode de generare a anticorpilor omologi, a anticorpilor cu modificări conservative, și a anticorpilor modificați genetic și modificați

Anticorpii invenției care au secvențe alterate de aminoacizi în comparație cu anticorpii parentali pot fi generați utilizând clonarea standard și tehnologii de expresie. De exemplu, mutageneza direcționată la situs sau mutageneza mediată prin PCR poate fi efectuată pentru a introduce mutația și efectul asupra legării anticorpului sau altei proprietăți de interes, pot fi evaluate utilizând metode bine-cunoscute și metodele descrise aici în Exemple.

Alotipuri de anticorp

Anticorpul invenției poate fi un izotip IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4.

În unele realizări, anticorpul invenției este un izotip IgG1.

În unele realizări, anticorpul invenției este un izotip IgG2.

În unele realizări, anticorpul invenției este un izotip IgG3.

În unele realizări, anticorpul invenției este un izotip IgG4.

Imunogenicitatea anticorpilor terapeutici este asociată cu riscul crescut al reacțiilor de perfuzie și o durată scăzută de răspuns terapeutic (Baert și colab., (2003) N Engl J Med 348:602-08). Măsura în care anticorpii terapeutici induc un răspuns imun în gazdă poate fi determinată parțial prin alotipul anticorpului (Stickler și colab., (2011) Genes and Immunity 12:213-21). Alotipul anticorpului este înrudit cu variațiile secvenței de aminoacizi la locații specifice în secvențele regiunii constante a anticorpului.

Tabelul 6 prezintă selecția alotipurilor IgG1, IgG2 și IgG4.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sunt de alotip G2m(n), G2m(n-), G2m(n)/(n-), nG4m(a), Glm(17) sau Glm(17,1).

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la TIM-3 al invenției sunt de alotip G2m(n), G2m(n-), G2m(n)/(n-), nG4m(a), Glm(17) sau Glm(17,1).

În unele realizări, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici ai invenției sunt de alotip G2m(n), G2m(n-), G2m(n)/(n-), nG4m(a), Glm(17) sau Glm(17,1).

Tabelul 6.

Alotip	Reziduu de aminoacid la poziția diversității (numerotarea reziduurilor: indice EU)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A

15 Anticorpi anti-idiotipici

Un anticorp anti-idiotipic se leagă la anticorpul invenției.

O realizare care nu este parte a invenției este un anticorp anti-idiotipic care se leagă specific la anticorpul cuprinzând VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56.

Un anticorp anti-idiotipic poate fi utilizat pentru detectarea nivelului anticorpilor terapeutici (de exemplu anticorpii anti-PD-1 sau PD-1/TIM-3 bispecfici ai invenției descrise aici) dintr-o mostră.

Un anticorp anti-idiotipic (Id) este un anticorp care recunoaște determinanții antigenici (de exemplu paratopul sau regiunile CDR) ai anticorpului. Anticorpul Id poate fi cu blocarea sau fără blocarea antigenului. Id cu blocare antigenului poate fi utilizat pentru a detecta anticorpul liber dintr-o mostră (de exemplu anticorpul anti-PD-1 sau PD-1/TIM-3 bispecific conform invenției descrise aici). Id fără blocare poate fi utilizat pentru a detecta anticorpul total (liber, parțial legat la antigen, sau complet legat la antigen) dintr-o mostră. Un anticorp Id poate fi preparat prin imunizarea unui animal cu anticorpul la care se prepară un anti-Id.

Un anticorp anti-Id poate fi de asemenea utilizat ca un imunogen să inducă un răspuns imun la încă un alt animal, producând un așa numit anticorp anti-anti-Id. Un anti-anti-Id poate fi epitopic identic cu mAb-ul original, care a indus anti-Id-ul. Astfel, prin utilizarea anticorpilor la determinanții idiotipici ai unui mAb, este posibil să se identifice alte clone care exprimă anticorpi de specificitate identică. Anticorpii anti-Id pot fi variați (producând prin urmare variante de anticorp anti-Id) și/sau derivatizați prin orice tehnică adecvată, cum ar fi cele descrise în altă parte aici față de anticorpii care se leagă specific la PD-1 sau la anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici.

35 Imunoconjugati

Un „imunoconjugat” se referă la anticorpul invenției conjugat la una sau mai multe molecule heterologe.

În unele realizări, anticorpul invenției este conjugat la unul sau mai mulți agenți citotoxici sau la un agent de imagistică.

Exemple de agenți citotoxici includ agenți chimioterapici sau medicamente, agenți inhibitori de creștere, toxine (de exemplu, toxine proteice, toxine active enzimatic de origine bacteriană, fungică, de plante, sau animală, sau fragmente ale acestora), și radionuclizi.

Agentul citotoxic poate fi unul sau mai multe medicamente, cum ar fi un maiatansinoid (vezi, de exemplu, brevetele S.U.A. nr. 5.208.020, 5.416.06), un auristatin cum ar fi radicalii medicamentoși de monometilauristatin DE și DF (MMAE și MMAF) (vezi, de exemplu, brevetele S.U.A. numerele 5.635.483 și 5.780.588, și 7.498.298), un dolastatin, un calicheamicin sau derivat al acestuia (vezi, de exemplu, brevetele S.U.A. numerele 5.712.374, 5.714.586, 5.739.

116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, și 5.877.296; Hinman și colab., (1993) Cancer Res 53:3336-3342; și Lode și colab., (1998) Cancer Res 58:2925-2928); o antraciclină cum ar fi daunomicină sau doxorubicină (vezi, de exemplu, Kratz și colab., (2006) Curent Med. Chem 13:477-523; Jeffrey și colab., (2006) Bioorganic & Med Chem Letters 16:358-362; Torgov și colab., (2005) Bioconj Chem 16:717-721; Nagy și colab., (2000) Proc Natl Acad Sci SUA 97:829-834; Dubowchik și colab, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532 (2002); King și colab., (2002) J Med Chem 45:4336-4343; și brevetul S.U.A. nr. 6.630.579), metotrexat, vindezină, un taxan cum ar fi docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, și ortataxel.

Agentul citotoxic poate fi de asemenea o toxină enzimatic activă sau fragment al acesteia, cum ar fi catena difteriei A, fragmente active care nu se leagă ale toxinei de difterie, catena exotoxinei A (de la *Pseudomonas aeruginosa*), catena ricinei A, catena modecinei A, alfa-sarcin, proteine fordii Aleurites, diantine, proteine *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, și PAP-S), inhibitor momordica charantia, curcină, crotină, inhibitor sapaonaria officinalis, gelonină, mitogelină, restrictocină, fenomicină, enomicină, și tricotecenă.

Agentul citotoxic sau un agent de imagistică poate fi de asemenea un radionuclid. Exemple de radionuclizi includ Ac-225, La-211, 1-131, 1-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, Pb-212 și izotopi radioactivi de Lu. Când radioconjugatul este utilizat pentru detecție, el poate cuprinde un atom radioactiv pentru studii scintigrafice, de exemplu Tc-99m sau 1-123, sau o etichetă de rotire pentru imagistică prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) (cunoscută de asemenea ca imagistică prin rezonanță magnetică, mri), cum ar fi 1-123, 1-131, În-111, F-19, C-13, N-15 sau O-17.

Conjugații anticorpilor invenției și molecula heterologă pot fi făcuți utilizând o varietate de agenți de cuplare biproteici funcționali cum ar fi N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionat (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilat (SMCC), iminotiolan (IT), derivați bifuncționali de imidoesteri (cum ar fi dimetil adipimidat HQ), esteri activi (cum ar fi disuccinimidil suberat), aldehide (cum ar fi glutaraldehidă), compuși bis-azido (cum ar fi bis (p-azidobenzoil) hexandiamină), derivați bis-diazoniu (cum ar fi bis-(p-diazoniubenzoil)-etilendiamină), diizocianați (cum ar fi toluen 2,6-diizocianat), și compuși din fluor bis-activi (cum ar fi 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen). De exemplu, o imunotoxină din ricin poate fi preparată cum s-a descris în Vitetta și colab., (1987) Science 238: 1098. Acidul 1-izotiocianatobenzil-3-metildietilen triaminpentaacetic (MX- DTPA) marcat cu carbon-14 este un exemplu de agent chelator pentru conjugarea radionucleotidelor la anticorp. Vezi, de exemplu, WO94/11026. Liantul poate fi un „liant clivabil” facilitând eliberarea unui medicament citotoxic în celulă. De exemplu, poate fi utilizat un liant labil la acid, liant sensibil la peptidază, liant fotolabil, liant dimetil sau liant conținând disulfură (Chari și colab., (1992) Cancer Res 52: 127-131; brevetul S.U.A. nr. 5.208.020).

Conjugații anticorpilor invenției și molecula heterologă pot fi preparați cu reactivi de reticulare cum ar fi BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, și sulfo-SMPB, și SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfon)benzoat) care sunt disponibili comercial (de exemplu, de la Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Invenția furnizează de asemenea un imunoconjugat cuprinzând anticorpul antagonist care se leagă specific la PD-1 al invenției legat la un agent terapeutic sau un agent de imagistică.

Invenția furnizează de asemenea un imunoconjugat cuprinzând anticorpul D-1/TIM-3 bispecific conform invenției legat la un agent terapeutic sau un agent de imagistică.

Generare de monoanticorpi specifici ai invenției

În unele realizări, anticorpii invenției sunt umani.

În unele realizări, anticorpii invenției sunt umanizați.

Monoanticorpii specifici invenției descrise aici (de exemplu anticorpi care se leagă specific la PD-1, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56) pot fi generați utilizând diferite tehnologii. De exemplu, metoda hibridoamelor a lui Kohler și Milstein, Nature 256:495, 1975 poate fi utilizată pentru a genera anticorpi monoclonali. În metoda hibridoamelor, un șoarece sau alt animal gazdă, cum ar fi un hamster, șobolan sau maimuță, este imunizat cu PD-1 uman sau de cyno sau cu fragmente de PD-1, cum ar fi domeniul extracelular al PD-1, urmat de fuziunea celulelor din splina de la animalele imunizate cu celule de mielom utilizând metode standard pentru a forma celule hibridom (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pag. 59-103 (Academic Press, 1986)). Coloniile care apar din celule hibridom singure imortalizate sunt selectate pentru producția anticorpilor cu proprietățile dorite, cum ar fi specificitatea de legare, reticularitatea sau lipsa acesteia, și afinitatea pentru antigen.

Pot fi utilizate diferite animale gazdă pentru a produce anticorpii invenției. De exemplu, șoarecii balb/c pot fi utilizați pentru a genera anticorpii PD-1 anti-umani de șoarece. Anticorpii făcuți în șoarecii balb/c și alte animale non-umane pot fi umanizați utilizând diferite tehnologii pentru a genera mai multe secvențe asemănătoare cu cele umane.

Exemple de tehnici de umanizare incluzând selecția cadrelor acceptor umane sunt cunoscute și includ grefare CDR (brevetul S.U.A. nr. 5.225.539), grefare SDR (brevetul S.U.A. nr. 6.818.749), Refacerea suprafeței (Padlan, (1991) Mol Immunol 28:489-499), Refacerea suprafeței reziduurilor care determină specificitatea (publicația de brevet S.U.A. nr. 2010/0261620), adaptarea cadrului uman (brevetul S.U.A. nr. 8.748.356) sau superumanizarea (brevetul S.U.A. nr. 7.709. 226). În aceste metode, regiunile CDR ale anticorpilor parentali sunt transferate pe cadre umane care pot fi selectate pe baza omologiei lor globale cu cadrele parentale, pe baza similarității în lungimea CDR, sau a identității structurii canonice, sau o combinație a acestora.

Anticorpii umanizați pot fi optimizați suplimentar pentru a îmbunătăți selectivitatea sau afinitatea lor la un antigen dorit prin încorporarea reziduurilor de susținere ale unui cadru alterat pentru a conserva afinitate de legare (mutații inverse) prin tehnici cum ar fi cele descrise în publicațiile de brevet internațional numerele WO1090/007861 și WO1992/22653, sau prin introducerea variației la oricare din regiunile CDR de exemplu pentru a îmbunătăți afinitatea anticorpului.

Animalele transgenice, cum ar fi șoarecii sau șobolanii care poartă loci de imunoglobulină umană (Ig) în genomul lor pot fi utilizate pentru a genera anticorpi umani împotriva unei proteine țintă, și sunt descrise în, de exemplu brevetul S.U.A. nr. 6.150.584, publicația de brevet internațional nr. WO99/45962, publicațiile de brevet internațional numerele WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 și WO1990/04036, Lonberg și colab (1994) Nature 368:856-9; Green și colab (1994) Nature Genet. 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) Exp. Med. 188:483-95; Lonberg și Huszar (1995) Int Rev Immunol 13:65-93; Bruggemann și colab., (1991) Eur J Immunol 21:1323- 1326; Fishwild și colab., (1996) Nat Biotechnol 14:845-851; Mendez și colab., (1997) Nat Genet 15:146-156; Green (1999) J Immunol Methods 231:11-23; Yang și colab., (1999) Cancer Res 59:1236-1243; Bruggemann și Taussig (1997) Curr Opin Biotechnol 8:455-458. Locii de imunoglobulină endogenă în astfel de animale pot fi perturbați sau șterși, și cel puțin un locus complet sau parțial de imunoglobulină umană poate fi inserat în genomul animalului utilizând recombinare omoloagă sau non-omoloagă, utilizând transcromozomi, sau utilizând minigene. Companii cum ar fi Regeneron (<http://www.regeneron.com>), Harbour Antibodies (<http://www.harbourantibodies.com>), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (<http://www.omtinc.net>), KyMab (<http://www.kymab.com>), Trianni (<http://www.trianni.com>) și Capabilxis (<http://www.capabilxis.com>) pot fi cuplate pentru a furniza anticorpi umani direcționați împotriva unui antigen selectat utilizând tehnologii cum s-a descris mai sus.

Anticorpii umani pot fi selectați dintr-o bibliotecă de afișare pe bacteriofagi, unde fagii sunt modificați genetic pentru a exprima imunoglobulina umană sau porțiuni ale acesteia cum ar fi Fab-urile, anticorpi monocatenari (scFv), sau regiuni variabile ale anticorpului neîmperecheate sau împerecheate (Knappik și colab., (2000) J Mol Biol 296:57-86; Krebs și colab., (2001) J Immunol Meth 254:67-84; Vaughan și colab., (1996) Nature Biotechnology 14:309-314; Sheets și colab., (1998) PITAS (SUA) 95:6157-6162; Hoogenboom și Winter (1991) J Mol Biol 227:381; Marks și colab., (1991) J Mol Biol 222:581). Anticorpii invenției pot fi izolați de exemplu din biblioteca de afișare pe bacteriofagi care exprimă regiunile variabile ale lanțului greu și ușor ale anticorpului ca proteine de fuziune cu proteina acoperită cu bacteriofagul pIX cum s-a descris în Shi și colab., (2010) J Mol Biol 397:385-96, și publicația de brevet internațional nr. WO09/085462). Bibliotecile pot fi selectate pentru legarea fagilor la PD-1 uman și/sau de cyno și clonele pozitive obținute pot fi caracterizate în plus, Fab-urile izolate de clonele lizate, și exprimate ca IgG-uri cu lungime completă. Astfel de metode de afișare pe bacteriofagi pentru izolarea anticorpilor umani sunt descrise în de exemplu: brevetele S.U.A. numerele 5.223.409, 5.403.484, 5.571.698, 5.427.908, 5.580.717, 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 și 6.593.081.

Prepararea antigenilor imunogenici și producția de anticorpi monoclonali pot fi efectuate utilizând orice tehnică adecvată, cum ar fi producția de proteine recombinante. Antigenii imunogenici pot fi administrați unui animal în formă de proteină purificată, sau amestecuri de proteine incluzând celule întregi sau extracte celulare sau de țesut, sau antigenul poate fi format *de novo* în corpul animalului din acizi nucleici care codifică respectivul antigen sau o porțiune a acestuia.

Generare de anticorpi PD-1/TIM-3 bispecfici ai invenției

Anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici ai invenției (de exemplu anticorpii bispecfici cuprinzând un prim domeniu legare specifică la PD-1, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56, și un al doilea domeniu legare specifică la TIM-3) pot fi generați prin combinarea domeniilor VH/VL de legare la PD-1 cu domeniile VH/VL de legare la TIM-3 izolate și caracterizate aici. Alternativ, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici pot fi modificați genetic utilizând domeniile VH/VL de la anticorpii monospecfici anti-PD-1 și anti-TIM-3 disponibili public, și/sau prin combinarea domeniilor VH/VL de legare la PD-1 sau TIM-3 identificate aici cu domeniile VH/VL de legare la PD-1 sau TIM-3 disponibile public.

Exemple de anticorpi anti-PD-1 care pot fi utilizați pentru a modifica genetic moleculele PD-1/TIM-3 bispecifice sunt de exemplu cele descrise în brevetele S.U.A. numerele 5.897.862 și 7.488.802, și în publicațiile de brevet internațional nr. WO2004/004771, WO2004/056875, WO2006/121168, WO2008/156712, WO2010/029435, WO2010/036959, WO2011/110604, WO2012/145493, WO2014/194302, WO2014/206107, WO2015/036394, WO2015/035606, WO2015/085847, WO2015/112900 și WO2015/112805. De exemplu, pot fi utilizate domeniile VH/VL ale KEYTRUDA® (pembrolizumab) și OPDIVO® (nivolumab). Aceste domenii VH/VL PD-1 pot fi încorporate în anticorpi bispecfici cuprinzând domeniile VH/VL de legare la TIM-3 descrise aici și în **Tabelul 3**. De exemplu, domeniile VH/VL ale anticorpilor TIM-3 TM3B103, TM3B105, TM3B107, TM3B108, TM3B109, TM3B113, TM3B189, TM3B190 și TM3B196 descriși aici pot fi utilizate pentru a genera anticorpi PD-1/TIM-3 bispecfici.

În mod similar, exemple de anticorpi anti-TIM-3 care pot fi utilizați pentru a modifica moleculele PD-1/TIM-3 bispecifice sunt de exemplu cele descrise în publicațiile de brevet internațional numerele WO2011/155607, WO2013/006490, și WO2015/117002. Aceste domenii VH/VL TIM-3 pot fi încorporate în anticorpi bispecfici care cuprind domeniile VH/VL de legare la PD-1 descrise aici și în **Tabelul 2**. De exemplu, domeniile VH/VL ale anticorpilor PD-1 PD1B114, PD1B149, PD1B160, PD1B162, PD1B164, PD1B11, PD1B183, PD1B184, PD1B185, PD1B187, PD1B192, PD1B71, PD1B177, PD1B70, PD1B175, PD1B194, PD1B195, PD1B196, PD1B197, PD1B198, PD1B199, PD1B200, PD1B201, PD1B131 și PD1B132 descriși aici pot fi utilizate pentru a genera anticorpi PD-1/TIM-3 bispecfici.

Anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici generați pot fi testați pentru legarea lor la PD-1 și TIM-3, și pentru caracteristicile lor funcționale dorite, cum ar fi accelerarea activării celulelor T CD4⁺ și CD4⁺ specifice antigenului utilizând metodele descrise aici.

Anticorpii bispecfici ai invenției cuprind anticorpi având o structură a anticorpului cu lungime completă.

Anticorpii bispecfici cu lungime completă pot fi generați de exemplu utilizând schimbarea brațului Fab (de exemplu, schimbarea unei jumătăți de moleculă, schimbarea perechii de lanț greu - lanț ușor) între doi anticorpi bivalenți monospecfici prin introducerea mutațiilor la interfața CH3 a lanțului greu în fiecare jumătate de moleculă pentru a favoriza formarea heterodimerului a două jumătăți de molecule de anticorp având specificitate distinctă fie *in vitro* în mediu fără celule sau fie utilizând co-expresia. Reacția de schimbare a brațului Fab este rezultatul unei reacții de izomerizare a legăturii disulfură și disocierii-asocierii domeniilor CH3. Legăturile disulfură ale lanțului greu din regiunile balama ale anticorpilor monospecfici parentali sunt reduse. Cisteinele libere rezultate ale unuia dintre anticorpii monospecfici parentali formează o inter legătură disulfură a lanțului greu cu reziduurile de cisteină ale unei a doua molecule a unui anticorp monospecific parental și simultan domeniile CH3 ale anticorpilor parentali eliberează și reformează prin disociere-asociere. Domeniile CH3 ale brațelor Fab pot fi modificate genetic pentru a favoriza heterodimerizarea peste homodimerizare. Produsul rezultat este un anticorp bispecific având două brațe Fab r jumătate de moleculă cu care fiecare se leagă la un epitop distinct. Mutațiile F405L într-un lanț greu și K409R în celălalt lanț greu pot fi utilizate în cazul anticorpilor IgG1. Pentru anticorpii IgG2, poate fi utilizat un anticorp IgG2 de tip sălbatic și un anticorp IgG2 cu substituțiile F405L și R409K. Pentru a genera anticorpi bispecfici, primul anticorp bivalent monospecific și al doilea anticorp bivalent monospecific sunt modificați genetic pentru a avea o mutație F405L sau K409R în regiunea Fc, anticorpii sunt incubati împreună în condiții reducătoare suficiente pentru a permite cisteinelor din regiunea balama să sufere izomerizarea legăturii disulfură; generând prin urmare anticorpul bispecific prin schimbarea brațului Fab. Condițiile de incubare pot fi optim refăcute la nonreducere. Exemple de agenți reducători care pot fi utilizați sunt 2-mercaptoetilamină (2-MEA), ditiotritol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatation, tris(2 carboxietil)fosfină (TCEP), L-cisteină și beta-mercaptoetanol. De exemplu, poate fi utilizată incubarea timp de cel puțin 90 min la o temperatură de cel puțin 20°C în prezența a cel puțin 25 mM 2-MEA sau în prezența a cel puțin 0,5 mM ditiotritol la un pH de, de la 5-8, de exemplu la pH de 7,0 sau la pH de 7,4.

Anticorpii bispecfici pot fi de asemenea generați utilizând concepte cum ar fi nod-în-gaură (Genentech), CrossMAbs (Roche) și ajustare electrostatică (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), corpul domeniului modificat genetic prin schimbarea catenei (SEEDbody)(EMD Serono), și Biclonic (Merus).

Strategia „nod-în-gaură” (vezi, de exemplu, publicația internațională nr. WO 2006/028936) poate fi utilizată pentru a genera anticorpii bispecfici cu lungime completă ai invenției. Pe scurt, aminoacizii selectați care formează interfața domeniilor CH3 în IgG umană pot fi mutați în poziții care afectează interacțiunile domeniului CH3 pentru a promova formarea heterodimerului. Un aminoacid cu o mică catenă laterală (gaură) este introdus într-un lanț greu al unui anticorp care se leagă specific la un prim antigen și un aminoacid cu o catenă laterală mare (nod) este introdus într-un lanț greu al unui anticorp care se leagă specific la un al doilea antigen. După co-expresia celor doi anticorpi, se formează

un heterodimer ca rezultat al interacțiunii preferențiale a lanțului greu cu o „gaură” cu lanțul greu cu un „nod”. Exemple de perechi de substituție CH3 care formează un nod și o gaură sunt (exprimate ca poziție modificată în primul domeniu CH3 al primului lanț greu/poziție modificată în al doilea domeniu CH3 al celui de al doilea lanț greu): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S și T366W/T366S_L368A_Y407V.

Tehnologia CrossMAb poate fi utilizată pentru a genera anticorpii bispecfici cu lungime completă ai invenției. MAb-urile încrucișate, în plus față de utilizarea strategiei „nod-în-gaură” pentru a promova schimbarea brațului Fab, au în una dintre jumătățile brațelor domeniilor CH1 și CL schimbate pentru a asigura împerecherea corectă a lanțului ușor al anticorpului bispecific rezultat (vezi de exemplu brevetul S.U.A. nr. 8.242.247).

Alte strategii de încrucișare pot fi utilizate pentru a genera anticorpii bispecfici cu lungime ai invenției prin schimbarea domeniilor variabile sau constante, sau a ambelor între lanțul greu și lanțul ușor sau în lanțul greu din anticorpii bispecfici, fie într-unul sau în ambele brațe. Aceste exmodificări include de exemplu VH-CH1 cu VL-CL, VH cu VL, CH3 cu CL și CH3 cu CH1 cum s-a descris în Int. Brevet Publ. Nos. WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 și WO2009/080252.

Pot fi utilizate și alte strategii cum ar fi promovarea heterodimerizării lanțului greu utilizând interacțiuni electrostatice prin substituirea reziduurilor încărcate pozitiv la o suprafață CH3 și a reziduurilor încărcate negativ la o a doua suprafață CH3, cum s-a descris în publicația de brevet SUA nr. US2010/0015133; publicația de brevet SUA nr. US2009/0182127; publicația de brevet SUA nr. US2010/028637 sau publicația de brevet SUA nr. US2011/0123532. În alte strategii, heterodimerizarea poate fi promovată prin următoarele substituții (exprimate ca poziții modificate în primul domeniu CH3 al primului lanț greu/poziție modificată în al doilea domeniu CH3 al celui de al doilea lanț greu): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F. sau T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W cum s-a descris în publicația de brevet S.U.A. nr. US2012/0149876 sau publicația de brevet S.U.A. nr. US2013/0195849.

Tehnologia LUZ-Y poate fi utilizată pentru a genera anticorpii bispecfici ai invenției. În această tehnologie, o leucină fermoar se adaugă în C terminalul domeniilor CH3 pentru a conduce ansamblul heterodimer de la mAb-urile parentale care sunt îndepărtate post-purificare cum s-a descris în Wranik și colab., (2012) J Biol Chem 287(52): 42221-9.

Tehnologia SEEDbody poate fi utilizată pentru a genera anticorpii bispecfici ai invenției. Corpii SEED au, în domeniile lor constante, reziduuri IgG selectate substituite cu reziduuri IgA pentru a promova heterodimerizarea cum s-a descris în brevetul S.U.A. nr. US20070287170.

Mutațiile sunt de obicei făcute la nivel de ADN la o moleculă cum ar fi domeniul constant al anticorpului utilizând metode standard.

Anticorpii invenției pot fi modificați genetic în diferite formate bine cunoscute ale anticorpului.

În unele realizări, anticorpii bispecfici include molecule de țintire duală asemănătoare IgG-ului recombinant, în care cele două laturi ale moleculei conțin fiecare fragmentul Fab sau o parte din fragmentul Fab de la cel puțin doi anticorpi diferiți; moleculele de fuziune IgG, în care anticorpii IgG cu lungime completă sunt fuzionați la un extra fragment Fab sau la părți de fragment Fab; molecule de fuziune Fc, în care moleculele Fv monocatenare sau diacorpii stabiliizați sunt fuzionați la domeniile constante ale lanțului greu, regiuni Fc sau părți ale acestora; molecule de fuziune Fab, în care diferite fragmente Fab sunt fuzionate împreună; anticorpi pe bază de ScFv și diacorpi și ai lanțului greu (de exemplu, anticorpi de domeniu, nanocorpi) în care diferite molecule Fv monocatenare sau diferiți diacorpi sau diferiți anticorpi ai lanțului greu (de exemplu anticorpi de domeniu, nanocorpi) sunt fuzionați unul cu celălalt sau la o altă proteină sau moleculă purtătoare.

Polinucleotide, vectori și celule gazdă

Invenția furnizează de asemenea un anticorp antagonistic care se leagă specific la PD-1, sau la PD-1 și TIM-3 având o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56, în care anticorpul VH este codificat printr-o primă polinucleotidă și anticorpul VL este codificat printr-o a doua polinucleotidă. Polinucleotida poate fi un acid deoxinucleic complementar (ADNc), și poate fi optimizată codonic pentru expresie în gazda adecvată. Optimizarea codonică este o tehnologie bine cunoscută.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică VH al anticorpului invenției, VL al anticorpului invenției, lanțul greu al anticorpului invenției sau lanțul ușor al anticorpului invenției.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică VH, VL, sau VH și VL ale anticorpului antagonistic care se leagă specific la PD-1 al invenției.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică VH din SEQ ID NO: 48.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică VL din SEQ ID NO: 56.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată cuprinzând secvența de polinucleotidă din SEQ ID NO: 196 și 197.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică HC1, LC1, HC2 sau LC2 ale anticorpului PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic conform invenției.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică HC1 din SEQ ID NO: 186, 241, sau 243.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică LC1 din SEQ ID NO: 188.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică HC2 din SEQ ID NO: 190, 191, 192, 244, 245, 246, 247 sau 248.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată care codifică LC2 din SEQ ID NO: 193, 194 sau 195.

Invenția furnizează de asemenea o polinucleotidă izolată cuprinzând secvența de polinucleotidă din SEQ ID NO: 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259 și 260.

SEQ ID NO: 196 (PD1H170)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCG
TGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGCGATTAG
CTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGCATTATT
CCGATTTTTGACACCGCGAACTATGCGCAGAAATTTAGGGCCGCGTGACCAT
TACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGC
AGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCCCTGGTCTCGCTGCGGCTTA
TGATACTGGTTCCTTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCA
GC

SEQ ID NO: 197 (PD1L148)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTTCGCTCCTACCTGGCGTG
TATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATCTACGACGCGAGCA
ATCGTGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCTCCGGTAGCGGCACCGAT
TTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGC
CAGCAACGTAATTATTGGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAT
TAAA

SEQ ID NO: 198 (PD1H129)

GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCT
GAGACTGAGCTGTGCCGCGAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGATACGACATGAGCT
GGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGACTGGAAGCGTGGCTACATCTCTGG
CGGAGGCGCCAACACCTACTACCTGGACAACGTGAAGGGCCGGTTCACCATC
AGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGG
CCGAGGACACCGCGTGTACTATTGCGCCTCCCCCTACCTGAGCTACTTCGAC
GTGTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTATCT

SEQ ID NO: 199 (PD1L62)

GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCTGCCACCCTGTCCGTGTCTCCAGGCGAAAG
AGCCACCCTGAGCTGCAGAGCCAGCCAGAGCCTGAGCGACTACCTGCACTGGT
ATCAGCAGAAGCCCCGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCAAGTCTGCCAGCCA
GTCCATCAGCGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGAGT
TCACCCTGACAATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC
CAGAACGGCCACAGCTTCCCTTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAAT
CAAG

SEQ ID NO: 200 (PD1H163)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCG
TGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAAGTCCTATGTGATTTCAT
TGGGTGCGCCAGGCGCCGGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGTATTATCC
CAATTTTTGGCACCGCCAATTATGCGCAGAAATTTAGGGCCGCGTGACCATT
ACCGCTGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCA
GCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGTTATGTGCGGGCTACGGGC
ATGTTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 201 (PD1L185)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTAGCAATTATCTGGCGTG
TATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATCTACGACGCCAGCA
ATCGCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCTCCGGTAGCGGCACCGAT
TTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGC
CAGCAACGTGCATATTGGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAT
TAAA

SEQ ID NO: 202 (PD1H164)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCAGCAGCG
TGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCGATTATGTGATTTC
TGGGTGCGCCAGGCGCCGGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGCGGTATTATCC
CGATTTACGGGACCGCTAACTATGCGCAGAAATTTAGGGCCGCGTGACCATT
ACCGCTGATGAAAGCACCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCA
GCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGTACCCTCGACCGGACCGGG

5 CATTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 203 (PD1L86)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTCTCCTACCTTGCCTGG
TATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATCCACGACGCCTCTAC
GCGTGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCTCCGGTAGCGGCACCGATT
TTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGC
CAGCAACGTAATTATTGGCCGCTCACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAT

TAAA

10 SEQ ID NO: 204 (TM3H24)

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGCC
TGCGCCTGAGCTGCGCGGCAAGCGGCTTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGC
TGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATTAGCG
GCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATT
AGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCG
CGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAATCCCCGTACGCGCCCTTGGAC
TATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 205 (TM3L33)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCGACCCTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCCTTAGCTGCCGTGCAAGTCAGAGTGTGAACGACTACCTGGCGTG
TATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGCGAGCAA
CCGCGCGACCGGCATTCCGGCGCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATT
TTACCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTTCGGTGTATTATTGC
CAGCAGGGTGGTCACGCGCCGATCACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGAAAA
TAAA

SEQ ID NO: 206 (TM3H162)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCC
TGAAGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGCTACAGCTTCACCAGCTACTGGATGCA
GTGGGTGCGCCAGATGCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATGGGCGCCATCTATC
CCGGCGACGGCGACATCAGATACACCCAGAACTTCAAGGGCCAAGTGACCAT
CAGCGCCGACAAGAGCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGTCCAGCCTGAAG
GCCAGCGACACCGCCATGTACTACTGTGCCAGATGGGAGAAGTCCACCACCGT
GGTGCAGCGGAATACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCAAGTGACCGTGT
CTAGT

SEQ ID NO: 207 (TM3L85)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACA
5 GAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCGAGAACGTGGGCACCTTCGTGTCCTGG
TATCAGCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCA
ACAGATACACCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGA
CTTCACCCTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTG
CGGCCAGAGCTACAGCTACCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA
AG

SEQ ID NO: 208 (TM3H21)

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGCC
TGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCAACTATTGGATGAGC
TGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGCGATTAGCG
GCAGCGGCGGCAGCACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATT
AGCCGCGATAACAGCAAAAACACCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCG
CGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAAGATCATTGGGATCCCAATTTT
TTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

10 SEQ ID NO: 209 (PH9L1)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGGCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCTGGC
GTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGGCGCGA
GCAGCCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
CGATTTTACCCTGACCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTTCGGTGTATT
ATTGCCAGCAGTATGGCAGCAGCCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTG
GAAATTAAA

SEQ ID NO: 210 (TM3H65)

GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGCC
 TGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTAGCGACTATTGGATGAGC
 TGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGAGCGTGATCAAGT
 ATAGCGGTGGCTCCAAATATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCAT
 AGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCG
 CGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGAAAGAGCTGGAGGGGGTGTTCGA
 CTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
 SEQ ID NO: 211 (TM3L12)
 GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGGGCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGGCGAAC
 GCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTAGCAATAGCACTCTGGC
 GTGGTATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATACTGCGA
 GCAGCCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
 CGATTTTACCCTGACCATTAGCCGCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATT
 ATTGCCAGCAGTCTTACACATCTCCGTGGACTTTTGGCCAGGGCACCAAAGTG
 GAAATTTAAA

Secvențele de polinucleotide care codifică VH sau VL sau un fragment care se leagă la antigen al acestora al anticorpilor invenției, sau lanțul greu și lanțul ușor al anticorpilor invenției pot fi legate operabil la unul sau mai multe elemente reglatoare, cum ar fi un promotor sau un ameliorator, care permit expresia secvenței de nucleotide în celula gazdă intenționată. Polinucleotida poate fi un ADNc.

Invenția furnizează de asemenea un vector cuprinzând polinucleotida invenției. Astfel de vectori pot fi vectori plasmidici, vectori virali, vectori pentru expresia baculovirusului, vectori pe bază de transposon sau orice alți vectori adecvați pentru introducerea polinucleotidei sintetice a invenției într-un organism dat sau fundal genetic prin orice mijloace. De exemplu, polinucleotidele care codifică regiunile variabile ale lanțului ușor și/sau greu al anticorpilor invenției, legate opțional la regiuni constante, sunt inserate în vectori de expresie. Lanțurile ușoare și/sau grele pot fi clonate în aceeași sau în diferiți vectori de expresie. Segmentele de ADN care codifică lanțurile de imunoglobulină pot fi legate operabil pentru a controla secvențele din vectorul de expresie care asigură expresia polipeptidelor de imunoglobulină. Astfel de secvențe de control includ secvențe semnal, promotori (de exemplu promotori asociați natural sau heterologi), elemente ameliorante, și secvențe de terminarea transcripției, și sunt alese pentru a fi compatibile cu celula gazdă aleasă pentru a exprima anticorpul. Odată ce vectorul a fost incorporat în gazda adecvată, gazda este menținută în condiții adecvate pentru exprimarea la un nivel ridicat a proteinelor codificate de către polinucleotidele încorporate.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 196 și 197.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 204 și 205.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 206 și 207.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 208 și 209.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 210 și 211.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 253 și 254.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 255 și 256.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 257 și 258.

În unele realizări, vectorul cuprinde polinucleotida din SEQ ID NO: 259 și 260.

Vectorii de expresie adecvați sunt de obicei replicabili în organismele gazdă fie ca episomi sau ca o parte integrală din ADN-ul cromozomial al gazdei. În mod obișnuit, vectorii de expresie conțin markeri de selecție cum ar fi rezistenți la ampicilină, rezistenți la higromicină, rezistenți la tetraciclină, rezistenți la kanamicină sau rezistenți la neomicină pentru a permite detecția acelor celule transformate cu secvențele ADN dorite.

Elementele promoatoare și amelioratoare adecvate sunt cunoscute în domeniu. Pentru expresia într-o celulă eucariotă, exemplele de promotori include elemente promoatoare și amelioratoare ale genei de imunoglobulină a lanțului ușor și/sau greu; promotor timpuriu imediat de citomegalovirus; promotor timidină kinază al virusului simplex herpes; promotori SV40 timpurii și târzii; promotor prezent în repetările terminale lungi de la un retrovirus; promotor metalotionein-1 de șoarece; și diferiți promotori cunoscuți specifici țesutului. Selecția vectorului adecvat și promotorului este bună la nivelul celor având calificare obișnuită în domeniu.

Exemple de vectori care pot fi utilizați sunt bacterieni: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., SUA); pTrc99A, pKK223-

3, pKK233-3, pDR540, și pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suedia). Eucariote: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG și pSVL (Pharmacia), pEE6,4 (Lonza) și pEE12,4 (Lonza).

Invenția furnizează de asemenea o celulă gazdă cuprinzând unul sau mai mulți vectori ai invenției. „Celula gazdă” se referă la o celulă în care a fost introdus un vector. Se înțelege că termenul celulă gazdă este intenționat a se referi nu numai la celula subiectului particular ci și la descendenții unei astfel de celule, și de asemenea la o linie celulară stabilă generată din celula subiectului particular. Deoarece anumite modificări poate avea loc în generările succesive din cauza fie a mutației sau fie din influența de mediu, astfel de descendenți pot să nu fie identici cu celula părinte, dar sunt încă incluși în domeniul termenului de „celulă gazdă” așa cum s-a utilizat în acest document. Astfel de celule gazdă pot fi celule eucariote, celule procariote, celule de plante sau celule arheale. *Escherichia coli*, bacilli, cum ar fi *Bacillus subtilis*, și alte enterobacteriaceae, cum ar fi *Salmonella*, *Serratia*, și diferite specii de *Pseudomonas* sunt exemple de celule procariote gazdă. Alți microbi, cum ar fi drojdia, sunt de asemenea utili pentru expresie. *Saccharomyces* (de exemplu, *S. cerevisiae*) și *Pichia* sunt exemple de celule de drojdie gazdă adecvate. Exemple de celule eucariote pot fi de mamifer, insecte, aviane sau de alte origini animale. Celulele eucariote de mamifer include linii celulare imortalizate cum ar fi linii celulare hibridom sau mielom cum ar fi SP2/0 (Colecția American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC nr. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) și linii celulare murine Ag653 (ATCC CRL-1580). Un exemplu de linie celulară umană de mielom este U266 (ATCC CRL-TIB-196). Alte linii celulare utile le include pe cele derivate din celule ovariene de hamster chinezesc (CHO) cum ar fi CHOK1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), Potelligent® CHOK2SV (Lonza), CHO-K1 (ATCC CRL-61) sau DG44.

Invenția furnizează de asemenea o metodă pentru producerea unui anticorp conform invenției cuprinzând cultivarea celulei gazdă a invenției în condiții în care anticorpul este exprimat, și recuperarea anticorpului produs de către celula gazdă. Metodele de realizare a anticorpilor și de purificare a lor sunt bine cunoscute în domeniu. Odată sintetizat (fie chimic sau recombinant), întregii anticorpi, dimerii lor, lanțurile individuale ușoare și/sau grele, sau alte fragmente de anticorp cum ar fi VH și/ sau VL, pot fi purificate în conformitate cu proceduri standard, incluzând precipitare cu sulfat de amoniu, coloane de afinitate, cromatografie pe coloană, purificare prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC), electroforeză în gel, și altele asemenea (vezi în general Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))). Un anticorp subiect poate fi substanțial pur, de exemplu, cel puțin aproximativ 80% până la 85% pur, cel puțin aproximativ 85% până la 90% pur, cel puțin aproximativ 90% până la 95% pur, sau cel puțin aproximativ 98% până la 99%, sau mai mult, pur, de exemplu, fără contaminanți cum ar fi reziduuri celulare, macromolecule, etc., altele decât anticorpul subiect.

Secvențele de polinucleotide ale invenției pot fi încorporate în vectori utilizând metode standard de biologie moleculară. Transformarea celulei gazdă, cultura, expresia anticorpului și purificarea sunt făcute utilizând metode bine-cunoscute. O altă realizare a invenției este o metodă pentru producerea anticorpului antagonistic care se leagă specific la PD-1 al invenției, cuprinzând: încorporarea primei polinucleotide care codifică VH a anticorpului și a doua polinucleotidă care codifică VL a anticorpului într-un vector de expresie; transformând o celulă gazdă cu vectorul de expresie; cultivarea celulei gazdă în mediu de cultură în condiții în care VL și VH sunt exprimate și formează anticorpul; și recuperarea anticorpului din celula gazdă sau mediul de cultură.

Polinucleotidele care codifică anumite secvențe VH sau VL ale invenției descrise aici, și în unele realizări ale fiecăreia și fiecare dintre realizările numerotate listate mai jos, pot fi încorporate în vectori utilizând metode standard de biologie moleculară. Transformarea celulei gazdă, cultura, expresia anticorpului și purificarea sunt făcute utilizând metode bine-cunoscute.

Compoziții farmaceutice/Administrare

Invenția furnizează compoziții farmaceutice cuprinzând anticorpii invenției și un purtător acceptabil farmaceutic. Pentru utilizare terapeutică, anticorpii invenției pot fi preparați ca compoziții farmaceutice conținând o cantitate eficientă de anticorp ca un ingredient activ într-un purtător acceptabil farmaceutic. „Purtător” se referă la un diluant, adjuvant, excipient, sau vehicul cu care este administrat anticorpul invenției. Astfel de vehicule pot fi lichide, cum ar fi apă și uleiuri, incluzându-le pe cele de origine petrolieră, animală, vegetală sau sintetică, cum ar fi ulei de arahide, ulei de soia, ulei mineral, ulei de susan și altele asemenea. De exemplu, pot fi utilizate 0,4% soluție salină și 0,3% glicină. Aceste soluții sunt sterile și în general fără materii particulare. Ele pot fi sterilizate prin tehnici de sterilizare convenționale, bine cunoscute (de exemplu, filtrare). Compozițiile pot conține substanțe auxiliare acceptabile farmaceutic după cum este necesar pentru a aproxima condițiile fiziologice cum ar fi ajustarea pH-ului și agenți de tamponare, stabilizare, îngroșare, lubrifierea și agenți de colorare, etc. Concentrația de anticorpi ai invenției în astfel de formulări farmaceutice poate varia, de la mai puțin de aproximativ 0,5%, uzual la cel puțin aproximativ 1% până la cel mult 15 sau 20% din masă și poate fi selectată în

primul rând pe baza dozei necesare, volumului de fluid, vâscozității, etc., în conformitate cu modul de administrare particular selectat. Vehiculele și formulările adecvate, inclusiv de alte proteine umane, de exemplu, albumină din ser uman, sunt descrise, de exemplu, în Remington: The Science and Practice of Pharmacy, ediția a 21-a, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams și Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pag. 691-1092, Vezi în special pag. 958-989.

Modul de administrare pentru utilizarea terapeutică a anticorpilor invenției poate fi orice cale adecvată care livrează anticorpul la gazdă, cum ar fi administrarea parenterală, de exemplu, intradermală, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă sau subcutanată, pulmonară, transmucozală (orală, intranazală, intravaginală, rectală), utilizând o formulare într-o tabletă, capsulă, soluție, pulbere, gel, particulă; și conținut într-o seringă, un dispozitiv implantat, cum este bine cunoscut în domeniu. Administrarea specifică situsului poate fi obținută de exemplu prin livrare intratumorală, intrarticulară, intrabronhială, intraabdominală, intracapsulară, intracartilaginoasă, intracavitară, intracelulară, intracerebrală, intracerebroventriculară, intracolică, intracervicală, intragastrică, intrahepatică, intracardială, intraosteală, intrapelvică, intrapericardiacă, intraperitoneală, intrapleurală, intraprostacică, intrapulmonară, intrarectală, intrarenală, intraretinală, intraspinală, intrasinovială, intratoracică, intrauterină, intravasculară, intravezicală, intralezională, vaginală, rectală, bucală, sublinguală, intranazală, sau transdermală.

Anticorpii invenției pot fi administrați unui subiect pe orice cale adecvată, de exemplu parental prin perfuzie intravenoasă (i.v.) sau injecție bolus, intramuscular sau subcutanat sau intraperitoneal. Perfuzia i.v. poate fi dată timp de, de exemplu 15, 30, 60, 90, 120, 180, sau 240 minute, sau de la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 sau 12 ore.

Doza dată unui subiect este suficientă pentru a atenua sau cel puțin opri parțial boala care este tratată („cantitate eficientă terapeutică”) și poate fi uneori de la 0,005 mg până la aproximativ 100 mg/kg, de exemplu de la aproximativ 0,05 mg până la aproximativ 30 mg/kg sau de la aproximativ 5 mg până la aproximativ 25 mg/kg, sau de aproximativ 4 mg/kg, de aproximativ 8 mg/kg, de aproximativ 16 mg/kg sau de aproximativ 24 mg/kg, sau de exemplu de aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 mg/kg, dar poate chiar mai ridicată, de exemplu de aproximativ 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100 mg/kg.

Poate fi dată de asemenea o doză unitară fixată, de exemplu, 50, 100, 200, 500 sau 1000 mg, sau doza poate fi pe baza ariei suprafeței pacientului, de exemplu, 500, 400, 300, 250, 200, sau 100 mg/m². Pot fi administrate uzual între 1 și 8 doze, (de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sau 8) pentru a trata pacientul, dar se pot da și 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau mai multe doze.

Administrarea anticorpilor invenției poate fi repetată după o zi, două zile, trei zile, patru zile, cinci zile, șase zile, o săptămână, două săptămâni, trei săptămâni, o lună, cinci săptămâni, șase săptămâni, șapte săptămâni, două luni, trei luni, patru luni, cinci luni, șase luni sau mai mult. Cursuri repetate de tratament sunt de asemenea posibile, ca la administrarea cronică. Administrarea repetată poate fi la aceeași doză sau la o doză diferită. De exemplu, anticorpii invenției pot fi administrați la 8 mg/kg sau la 16 mg/kg la interval săptămânal timp de 8 săptămâni, urmați de administrare la 8 mg/kg sau la 16 mg/kg la fiecare două săptămâni timp de 16 săptămâni suplimentare, urmați de administrarea la 8 mg/kg sau la 16 mg/kg la fiecare patru săptămâni prin perfuzie intravenoasă.

De exemplu, anticorpii invenției pot fi furnizați ca dozaj zilnic într-o cantitate de aproximativ 0,1-100 mg/kg, cum ar fi de 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 sau 100 mg/kg, pe zi, în cel puțin una din zilele 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, sau 40, sau alternativ, cel puțin în una dintre săptămânile 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 sau 20 după începerea tratamentului, sau orice combinație a acestora, utilizând doze singure sau divizate la fiecare 24, 12, 8, 6, 4, sau 2 ore, sau orice combinație a acestora.

Anticorpii invenției, pot fi de asemenea administrați profilactic pentru a reduce riscul de dezvoltare a cancerului, întârziarea debutului apariției unui eveniment în progresul cancerului, și/sau reduce riscul de recurență când un cancer este în remisie.

Anticorpii invenției pot fi liofilizați pentru depozitare și reconstituți într-un purtător adecvat înainte de utilizare. Această tehnică s-a arătat a fi eficientă cu preparările convenționale de proteine și pot fi utilizate tehnici de liofilizare și reconstituire bine cunoscute.

Metode și utilizări

Anticorpii invenției au utilizări în diagnoza *in vitro* și *in vivo*, precum și terapeutice și profilactice. De exemplu, anticorpii invenției pot fi administrați celulelor în cultură, *in vitro* sau *ex vivo*, diagnosticând o varietate de tulburări, cum ar fi cancerul și tulburările infecțioase.

Invenția furnizează anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de modificare a unui răspuns imun la un subiect cuprinzând administrarea către subiect a anticorpului invenției pentru un timp suficient pentru a modifica răspunsul imun.

În unele realizări, răspunsul imun este ameliorat, stimulat sau suprarreglat.

În unele realizări descrise aici, subiectul este un pacient uman.

În unele realizări descrise aici, subiectul este un pacient uman care are nevoie de accelerarea răspunsului imun.

5 În unele realizări, subiectul este imunocompromis.

În unele realizări, subiectul este la risc de a fi imunocompromis. Subiectul imunocompromis poate fi cel care este supus la, sau a fost supus la o terapie chimioterapeutică sau cu radiații.

În unele realizări, subiectul este, sau este la risc de a fi, imunocompromis ca rezultat al unui infecții.

10 Anticorpii invenției sunt adecvați pentru utilizare în tratarea unui subiect având o tulburare care poate fi tratată prin creșterea răspunsurilor imune mediate de celulele T.

În unele realizări, anticorpii antagonici care se leagă specific la PD-1 pentru utilizare conform invenției este PD1B196 sau PD1B244. Secvențele de aminoacizi VH și VL ale acestor anticorpi sunt prezentate în **Tabelul 2**.

15 În unele realizări, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecifici pentru utilizare conform invenției este PTBB14, PTBB15, PTBB24, PTBB30, PTBB27, PTBB28, PTBB20 sau PTBB21. Secvențele de aminoacizi HC1, LC1, HC2 și LC2 ale acestor anticorpi sunt prezentate în **Tabelul 41** și **Tabelul 42**.

Anticorpii antagonici care se leagă specific la PD-1 pentru utilizare conform invenției cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56.

20 În unele realizări, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecifici antagonici cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3 utilizat în metodele invenției cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 în primul domeniu, și VH din SEQ ID NO: 153 și VL din SEQ ID NO: 162 în al doilea domeniu.

25 În unele realizări, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecifici antagonici cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3 utilizat în metodele invenției cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 în primul domeniu, și VH din SEQ ID NO: 146 și VL din SEQ ID NO: 156 în al doilea domeniu.

30 În unele realizări, anticorpii PD-1/TIM-3 bispecifici antagonici cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3 utilizat în metodele invenției cuprinde VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 în primul domeniu, și VH din SEQ ID NO: 172 și VL din SEQ ID NO: 173 în al doilea domeniu.

Cancer

35 Blocarea PD-1 poate ameliora un răspuns imun la celulele canceroase la un subiect. Ligandul pentru PD-1, PD-L1, este exprimat abundent într-o varietate de cancere la om (Dong și colab., (2002) Nat Med 8:787-9). Interacțiunea între PD-1 și PD-L1 poate conduce la o scădere a limfocitelor care se infiltrează în tumoare, o scădere în proliferarea mediata de receptorul celulelor T, și/sau evaziunea imună a celulelor canceroase (Dong și colab., (2003) J Mol Med 81:281-7; Blank și colab., (2005) Cancer Immunol Immunother 54:307-314; Konishi și colab., (2004) Clin Cancer Res 10:5094-100). Supresia imună poate fi inversată prin inhibarea interacțiunii locale a PD-1 la PD-L1; efectul este aditiv când interacțiunea lui PD-1 la al doilea ligand PD-1, PD-L2, este blocată de asemenea (Iwai și colab., (2002) Proc Natl Acad Sci 99:12293-7; Maro și colab., (2003) J Immunol 170:1257-66). Astfel, inhibarea PD-1 poate conduce la creșterea unui răspuns imun.

45 TIM-3 este o proteină co-inhibitoare exprimată pe celulele T CD4⁺ ajutoare T 1 (Th1) și CD8⁺ citotoxice activate care secretă IFN- γ . TIM-3 este co-exprimit pe celulele T epuizate PD-1⁺ așa cum se arată în modelele preclinice de cancer și epuizare virală. Coblocarea acestor căi poate reface funcționarea celulei T efectoare (de exemplu, secreția de IFN- γ , proliferare) în câteva modele ca și PBMC-urile umane derivate de la pacienți cu melanom metastatic și pacienți cu HIV sau HCV. TIM-3 este de asemenea îmbogățit pe celulele T reglatoare Foxp3⁺ și Treg-urile care coexprimă TIM-3, LAG3 și CTLA4 s-a arătat că sunt supresori cu eficiență ridicată ai celulelor T efectoare (Teff) (Galton și colab., (2014) Eur J Immunol 44(9):2703-11). Expresia TIM-3 a fost corelată cu prognoza mai slabă în NSCLC (Zhuang și colab., (2012) Am J Clin Pathol 137(6):978-85). Limfocitele din țesuturile tumorale de la pacienții cu carcinom ovarian, colorectal, cervical și hepatocelular prezintă o proporție mai ridicată de celule T CD4 TIM-3⁺, care celule au o capacitate alterată de a produce ILF- γ (Yan și colab., (2013) PLoS One 8(3):e58006).

55 Invenția furnizează de asemenea anticorpii invenției pentru utilizare într-o metodă de inhibare a creșterii celulelor tumorale la un subiect, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1 al invenției pentru un timp suficient pentru a inhiba creșterea celulelor tumorale.

60 Invenția furnizează de asemenea anticorpii bispecifici ai invenției pentru utilizare într-o metodă de inhibare a creșterii celulelor tumorale la un subiect, cuprinzând administrarea către subiect a unei

cantități eficiente terapeutic de anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonist conform invenției pentru un timp suficient pentru a inhiba creșterea celulelor tumorale.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer prin administrarea către subiectul care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1 al invenției pentru un timp suficient pentru a trata cancerul.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul bispecific ai invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer prin administrarea către subiectul care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp PD-1/TIM-3 bispecific conform invenției pentru un timp suficient pentru a trata cancerul.

Exemple de anticorpi care pot fi utilizați sunt anticorpii antagonisti care se leagă specific la PD-1 și anticorpii PD-1/TIM-3 bispecifici antagonisti PD1B196, PTBB14, PTBB15, PTBB24, PTBB30, PTBB27, PTBB28, PTBB20 și PTBB21 având secvențele de aminoacizi VH și VL și caracteristicile cum s-a descris aici.

Cancerul poate fi o afecțiune sau tulburare hiperproliferativă, o tumoră solidă, o malignitate hematologică, o tumoră a țesutului moale, sau o leziune metastatică.

„Cancerul” se înțelege că include toate tipurile de creșteri canceroase sau procese oncogenice, țesuturi metastatice sau celule transformate malignant, țesuturi, sau organe, indiferent de tipul de histopatologie sau starea de invazivitate. Exemple de cancere includ tumori solide, malignități hematologice, tumori ale țesutului moale, și leziuni metastazice. Exemple de tumori solide includ malignități, de exemplu, sarcoame, și carcinoame (incluzând adenocarcinoame și carcinom cu celule scuamoase) ale diferitelor sisteme organice, cum ar fi acele care afectează ficatul, plămânul, sânul, limfoidul, tractul gastrointestinal (de exemplu, colon), tractul genitourinar (de exemplu, renal, celule uroteliale), prostată și faringe. Adenocarcinoamele includ malignități cum ar fi majoritatea cancerelor la colon, un cancer rectal, un carcinom cu celule renale, un cancer hepatic, un carcinom de plămân nonmicrocelular, un cancer la intestinul subțire și un cancer la esofag. Carcinomul cu celule scuamoase include malignități, de exemplu, în plămân, esofag, piele, regiunea capului și gâtului, cavitatea orală, anus, și colul uterin.

În unele realizări, cancerul este un melanom.

Leziunile metastazice ale cancerelor anterior menționate pot fi de asemenea tratate sau prevenite utilizând metodele și anticorpii invenției descrise aici.

Exemple de cancere a căror creștere poate fi inhibată sau redusă utilizând anticorpii invenției includ cancerele care pot fi responsive la imunoterapie. Exemple de astfel de cancere includ un melanom, un cancer renal, un cancer la prostată, un cancer la sân, un cancer la colon, un cancer gastrointestinal, un cancer la stomac, un cancer la esofag, un cancer pulmonar, un melanom malign metastatic, un carcinom cu celule clare, un adenocarcinom la prostată refractar la hormoni, un cancer pulmonar nonmicrocelular sau cancer la cap și gât. Malignitățile refractare sau recurente pot fi tratate utilizând anticorpii invenției descrise aici.

Exemple de alte cancere care pot fi tratate cu anticorpii invenției sunt un cancer anal, un carcinom al celulei bazale, un cancer al tractului biliar, un cancer la vezică, un cancer osos, cancere la creier și la SNC, un carcinom al trompelor uterine, carcinom la vagin, un carcinom la vulvă, un melanom malign cutanat sau intraocular, un cancer astro-esofagial, un cancer testicular, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un cancer rectal, un cancer uterin, un limfom primar al SNC; un neoplasm al sistemului nervos central (CNS), un cancer de col uterin, un coriocarcinom, un cancer rectal, un cancer al țesutului conjunctiv, un cancer al sistemului digestiv, un cancer endometrial, un cancer ocular; un neoplasm intra-epitelial, un cancer la rinichi, un cancer la laringe, un cancer hepatic; un cancer pulmonar microcelular, un neuroblastom, un cancer la cavitatea orală (de exemplu, buză, limbă, gură, și faringe), un cancer nazofaringeal, un retinoblastom, un rabdomiosarcom, un cancer al sistemului respirator, un sarcom, un cancer la tiroidă, un cancer al sistemului urinar, un hepatocarcinom, un cancer al regiunii anale, un carcinom al trompelor uterine, un carcinom al vaginului, un carcinom al vulvei, un cancer al intestinului subțire, un cancer al sistemului endocrin, un cancer al glandei paratiroide, un cancer al glandei suprarenale, un sarcom al țesutului moale, un cancer de uretră, un cancer la penis, tumori solide ale copilăriei, o angiogeneză tumorală, o tumoră a șirei spinării, un gliom stem la creier, un adenom pituitar, sarcom Kaposi, cancer cu celule Merkel, un cancer epidermoid, un cancer cu celule scuamoase, cancere induse de mediu care le includ pe cele induse de asbest, precum și alt carcinoame și sarcoame, și combinații ale cancerelor menționate.

Exemple de malignități hematologice care pot fi tratate cu anticorpii invenției includ leucemii, limfoame și mielom, cum ar fi a leucemie/limfom limfoblastic cu precursor de celule B și un limfom non-Hodgkin cu celule B, o leucemie promielocitară acută, o leucemie limfoblastică acută (ALL), o leucemie limfocitară cronică cu celule B (CLL)/limfom limfocitar mic (SLL), o leucemie limfocitară acută cu celule B, o leucemie prolimfocitară cu celule B, un limfom limfoplasmatic, un limfom cu celule de

manta (MCL), un limfom folicular (FL), incluzând de FL grad scăzut, de grad intermediar și de grad ridicat, un limfom de centru folicular cutanat, un limfom al zonei marginale cu celule B (de tip MALT, nodal și de tip splenic), o leucemie cu celule păroase, un limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), limfom Burkitt (BL), un plasmacitom, un mielom multiplu (MM), o leucemie a celulei plasmatice, o tulburare limfoproliferativă post-transplant, macroglobulinemie Waldenstrom, tulburări ale celulei plasmatice, un limfom anaplastic cu celule mari (ALCL), o leucemie limfocitară acută cu celule T, o amiloidoză sistemică primară (de exemplu amiloidoză a lanțului ușor), o leucemie pro-limfocitică/mielocitică, o leucemie mieloidă acută (AML), o leucemie mieloidă cronică (CML), o leucemie limfocitară granulară mare (LGL), o leucemie cu celule NK și limfom Hodgkin.

„Tulburarea celulei plasmatice“ se referă la tulburări caracterizate prin celule plasmatice clonale, și include un mielom multiplu, o amiloidoză a lanțului ușor și macroglobulinemie Waldenstrom. Amiloidoza lanțului ușor și macroglobulinemia Waldenstrom pot apare independent de mielomul multiplu. Ele pot apare de asemenea simultan cu mielomul multiplu, și se pot dezvolta fie înainte sau fie după dezvoltarea mielomului multiplu.

Exemple de limfoame non-Hodgkin cu celule B sunt o granulomatoză limfomatoidă, un limfom primar cu efuziune, un limfom intravascular cu celule B mari, un limfom mediastinal cu celule B mari, boli ale lanțurilor grele (inclusiv boala γ , μ , și δ), limfoame induse de terapia cu agenți imunosupresivi, cum ar fi limfomul indus de ciclosporină, și limfomul indus de metotrexat.

Pacienții având cancer care include cancerul metastatic care exprimă PD-L1 pot fi tratați cu anticorpii invenției. Cancerul poate fi un melanom, un carcinom cu celule renale, un cancer pulmonar nonmicrocelular scuamos (NSCLC), un NSCLC non-scuamos, un cancer colorectal, un cancer la prostată rezistent la prostată, un cancer ovarian, un cancer gastric, un adenocarcinom (ACA), un carcinom cu celule scuamoase (SCC), un carcinom hepatocelular (HCC), un carcinom pancreatic, un carcinom cu celule scuamoase de cap și gât, carcinoame de esofag, tract gastrointestinal și sân.

Pacienții având cancer care exprimă TIM-3 pot fi tratați cu anticorpii invenției. Cancerurile care exprimă TIM-3 includ un cancer de col uterin, un cancer pulmonar, un NSCLC, o leucemie mieloidă acută (AML), un limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), un melanom, un cancer renal, un carcinom cu celule renale (RCC), un carcinom la rinichi cu celule clare, un carcinom la rinichi cu celule papilare, un carcinom metastatic cu celule renale, un carcinom cu celule scuamoase, un carcinom la esofag cu celule scuamoase, un carcinom nazofaringeal, un cancer colorectal, un cancer la sân (de exemplu, un cancer la sân care nu exprimă unul, doi sau toți receptorii estrogeni, receptorul progesteron, sau Her2/neu, de exemplu, un cancer la sân triplu negativ), un mezoteliom, un carcinom hepatocelular, și un cancer ovarian. Cancerul care exprimă TIM-3 poate fi un cancer metastatic.

În unele realizări, subiectul are o tumoare solidă.

În unele realizări, subiectul are o malignitate hematologică.

În unele realizări, tumoarea solidă este un melanom.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer pulmonar.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer pulmonar nonmicrocelular (NSCLC).

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer pulmonar nonmicrocelular scuamos (NSCLC).

În unele realizări, tumoarea solidă este un NSCLC non-scuamos.

În unele realizări, tumoarea solidă este un adenocarcinom la plămân.

În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom cu celule renale (RCC).

În unele realizări, tumoarea solidă este un mezoteliom.

În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom nazofaringeal (NPC).

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer colorectal.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la prostată.

În unele realizări, tumoarea solidă este cancer la prostată rezistent la castrare.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la stomac.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer ovarian.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer gastric.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer hepatic.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer pancreatic.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la tiroidă.

În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom cu celule scuamoase de cap și gât.

În unele realizări, tumoarea solidă este un carcinom de esofag sau tract gastrointestinal.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la sân.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer al trompei uterine.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer la creier.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer uretral.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer genitourinar.

În unele realizări, tumoarea solidă este o endometrioza.

În unele realizări, tumoarea solidă este un cancer de col uterin.
 În unele realizări, tumoarea solidă este o leziune metastatică a cancerului.
 În unele realizări, malignitatea hematologică este un limfom, un mielom sau o leucemie.
 În unele realizări, malignitatea hematologică este un limfom cu celule B.
 5 În unele realizări, malignitatea hematologică este limfom Burkitt.
 În unele realizări, malignitatea hematologică este limfom Hodgkin.
 În unele realizări, malignitatea hematologică este un limfom non-Hodgkin.
 În unele realizări, malignitatea hematologică este un sindrom mielodisplazic.
 10 În unele realizări, malignitatea hematologică este o leucemie mieloidă acută (AML).
 În unele realizări, malignitatea hematologică este o leucemie mieloidă cronică (CML).
 În unele realizări, malignitatea hematologică este o leucemie mielomonocitică cronică (CMML).
 În unele realizări, malignitatea hematologică este a mielom multiplu (MM).
 În unele realizări, malignitatea hematologică este un plasmacitom.
 În unele realizări, subiectul are o tumoare care exprimă PD-L1.
 15 În unele realizări, subiectul are limfocite T care se infiltrează în tumoare (TIL-uri) în țesutul tumoral.
 În unele realizări, subiectul are TIL-uri PD-1⁺TIM-3⁺ în țesutul tumoral.
 În unele realizări, subiectul are un număr crescut de limfocite T care se infiltrează în tumoarea PD-1⁺TIM-3⁺ (TIL-uri) în țesutul tumoral.
 20 „Numărul crescut” se referă la creșterea semnificativă statistic la un subiect în comparație cu un control. „Numărul crescut” se referă de exemplu la creșterea semnificativă statistic în numărul de TIL-uri la un subiect (de exemplu pacient) pre- și post-tratament cu un anticorp PD-1 sau alți agenți terapeutici.
 În unele realizări, subiectul are o expresie sau activitate crescute de interferon-gama (IFN- γ).
 În unele realizări, subiectul a fost tratat cu un anticorp anti-PD-1.
 25 În unele realizări, subiectul este refractar la tratamentul cu anticorpul anti-PD-1.
 În unele realizări, subiectul are o tumoare recidivată după tratamentul cu anticorpul anti-PD-1.
 În unele realizări, subiectul a fost tratat cu anticorpul anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 230 și VL din SEQ ID NO: 231 (de exemplu KEYTRUDA[®] (pembrolizumab)).
 30 În unele realizări, subiectul a fost tratat cu anticorpul anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 232 și VL din SEQ ID NO: 233 (de exemplu OPDIVO[®] (nivolumab)).
 În unele realizări, subiectul este refractar la tratamentul cu anticorpul anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 230 și VL din SEQ ID NO: 231 (de exemplu KEYTRUDA[®] (pembrolizumab)).
 În unele realizări, subiectul este refractar la tratamentul cu anticorpul anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 232 și VL din SEQ ID NO: 233 (de exemplu OPDIVO[®] (nivolumab)).
 35 În unele realizări, subiectul are o tumoare recidivată după tratamentul cu anticorpul anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 230 și VL din SEQ ID NO: 231 (de exemplu KEYTRUDA[®] (pembrolizumab)).
 În unele realizări, subiectul are o tumoare recidivată după tratamentul cu anticorpul anti-PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 232 și VL din SEQ ID NO: 233 (de exemplu OPDIVO[®] (nivolumab)).
 40 SEQ ID NO: 230
 QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPQGGLWVWG
 INPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM
 GFDYWGGQTTVTVSS
 SEQ ID NO: 231
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAS
 YLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIK
 SEQ ID NO: 232
 QVQLVESGGGVVQPGRLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIY
 DGSKRYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQG
 45 TLVTVSS
 SEQ ID NO: 233
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQSSNWPRTFGGQGTKVEIK
 În unele realizări, subiectul a fost tratat sau este tratat cu un anticorp PD-L1.
 În unele realizări, subiectul este refractar la tratamentul cu anticorpul PD-L1.
 50 În unele realizări, subiectul are o tumoare recidivată după tratamentul cu anticorpul PD-L1.
 În unele realizări, subiectul este refractar sau recidivat după tratamentul cu anticorpul PD-L1 durvalumab (MEDI-4736). Durvalumab cuprinde VH din SEQ ID NO: 234 și VL din SEQ ID NO: 235.

SEQ ID NO: 234
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN
 IKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
 GWFGELAFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 235
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
 DASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSPLPWTFG
 QGTKVEIK

- 5 În unele realizări, subiectul este refractar sau recidivat după tratamentul cu anticorpul PD-L1 atezolizumab. Atezolizumab cuprinde VH din SEQ ID NO: 236 și VL din SEQ ID NO: 237.

SEQ ID NO: 236
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAW
 ISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRH
 WPGGFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 237
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS
 ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQ

- 10 GTKVEIK
 În unele realizări, subiectul este refractar sau recidivat după tratamentul cu anticorpul PD-L1 avelumab. Avelumab cuprinde VH din SEQ ID NO: 238 și VL din SEQ ID NO: 239.

SEQ ID NO: 238
 EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSS

- 15 IYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIK
 LGTVTTVDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 239
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGINVSWYQHPGKAPKLM
 YDVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRV
 FGTGKVTVL

- 20 În unele realizări, subiectul este refractar sau recidivat după tratamentul cu anticorpul PD-L1 MDX-1105.

În unele realizări, subiectul a fost tratat sau este tratat cu un anticorp PD-L2.

În unele realizări descrise aici, subiectul este refractar la tratamentul cu un anticorp PD-L2.

În unele realizări, subiectul are o tumoare recidivată după tratamentul cu un anticorp PD-L2.

- 25 Pot fi utilizate diferite metode calitative și/sau cantitative pentru a determina natura recidivată sau refractară a bolii. Simptomele care pot fi asociate cu recidiva sau rezistența sunt, de exemplu, o scădere sau platou al stării de bine a pacientului sau restabilirea sau înrăutățirea diferitelor simptome asociate cu tumorile solide, și/sau împrăștierea celulelor canceroase în corp dintr-o locație la alte organe, țesuturi sau celule.

- 30 S-a descoperit aici că expresia TIM-3 este crescută în celulele T CD8⁺ izolate din tumori după tratamentul cu anticorpul anti-PD-1. Prin urmare, administrarea terapeutică a anticorpilor antagonistici care se leagă specific la TIM-3 sau a anticorpilor PD-1/TIM-3 bispecifici antagonistici descriși aici la un subiect care a primit deja sau primește terapia cu anticorp anti-PD-1, este refractară la tratamentul cu anticorpul anti-PD-1 sau a recidivat după sau în timpul tratamentului cu anticorpul anti-PD-1 poate îmbunătăți rezultatul clinic al pacienților.

- 35 Invenția furnizează de asemenea anticorpii bispecifici ai invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonist al invenției, în care subiectul este tratat sau a fost tratat cu un anticorp anti-PD-1.

- 40 Invenția furnizează de asemenea anticorpii bispecifici ai invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonist al invenției, în care subiectul este tratat sau a fost tratat cu un anticorp anti-PD-L1.

- 45 Invenția furnizează de asemenea anticorpii bispecifici ai invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp PD-1/TIM-3 bispecific antagonist al invenției, în care subiectul este tratat sau a fost tratat cu un anticorp anti-PD-L2.

Invenția furnizează de asemenea anticorpii invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiect a unei cantități eficiente terapeutic de anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56 pentru un timp suficient pentru a trata cancerul.

Orice anticorpi PD-1 sau PD-1/TIM-3 bispecfici ai invenției descriși aici pot fi utilizați conform invenției.

„Tratează” sau „tratament” se referă la tratamentul terapeutic în care obiectivul este de a încetini (reduce) o modificare fiziologică nedorită sau boală, cum ar fi dezvoltarea sau împrăștierea tumorii sau celulelor tumorale, sau pentru a furniza un rezultat clinic benefic sau dorit în timpul tratamentului. Rezultatele clinice benefice sau dorite includ ameliorarea simptomelor, diminuarea extensiei bolii, starea stabilizată (adică, neînrautățită) a bolii, întârzierea sau încetinirea progresului bolii, lipsa metastazei, ameliorarea sau alinarea stării bolii, și remisia (indiferent dacă parțială sau totală), indiferent dacă este detectabilă sau nedetectabilă. „Tratamentul” poate însemna de asemenea prelungirea supraviețuirii în comparație cu supraviețuirea așteptată dacă subiectul nu a primit tratamentul. Cei care au nevoie de tratament includ acei subiecți care au deja modificări fiziologice sau boli nedorite ca și acei subiecți predispuși a avea modificări fiziologice sau boli.

O „cantitate eficientă terapeutică” se referă la o cantitate eficientă, la doze și pe perioade de timp necesare, pentru a obține un rezultat terapeutic dorit. O cantitate eficientă terapeutică de anticorp al invenției poate varia în conformitate cu factori cum ar fi starea de boală, vârsta, sexul, și greutatea individului, și abilitatea anticorpului invenției de a declanșa un răspuns dorit la individ. Exemple de indicatori ai unui agent terapeutic eficient sau ai unei combinații de agenți terapeutici includ, de exemplu, starea de bine îmbunătățită a pacientului, reducerea încărcării tumorale, oprirea sau încetinirea creșterii unei tumori, și/sau absența metastazei celulelor canceroase la alte locații din corp.

Terapii de combinație pentru tratamentul cancerului

Anticorpii invenției pot fi administrați în combinație cu un al doilea agent terapeutic.

Anticorpii invenției pot fi administrați în combinație cu unul, doi, trei, patru, cinci sau șase agenți terapeutici suplimentari.

Oricare dintre anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 sau anticorpii PD-1ATIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției pot fi utilizați în combinație cu un al doilea agent terapeutic.

Oricare din anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 sau anticorpi PD-1ATIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției pot fi utilizați în combinație cu unul, doi, trei, patru, cinci sau șase agenți terapeutici suplimentari.

„În combinație cu” se referă la administrarea anticorpilor invenției și a cel puțin unui al doilea agent terapeutic concomitent ca agenți singuri sau secvențial ca agenți singuri în orice ordine. În general, fiecare agent va fi administrat la o doză și/sau la un program în timp determinat pentru acel agent.

În unele realizări, al doilea agent terapeutic modulează activitatea unei molecule implicate în ciclul imunitar al cancerului, de exemplu o moleculă implicată în căile stimulatorie sau inhibitorie care funcționează în eliberarea antigenilor celulei canceroase, prezentării antigenului canceros, amorsarea și activarea celulei T, traficul celulelor T la tumori, infiltrarea celulelor T în tumori, recunoașterea celulelor canceroase de către celulele T, și uciderea celulelor canceroase. Ciclul imunității canceroase este descris în Chen și Mellman (2013) *Immunity* 39:1-10. În unele realizări, al doilea agent terapeutic modulează activitatea unei molecule implicate în reglarea activității celulelor reglatoare T (Treg), liganzilor co-stimulatori sau coinhibitori exprimați pe tumori, receptori activatori sau inhibitori pe celulele ucigașe naturale (NK), sau factori imunosupresivi în micromediul tumoral. Imunoterapiile canceroase de combinație sunt descrise în Manoney și colab., (2015) *Nature Reviews* 14:561-584.

Al doilea agent terapeutic ameliorează de obicei activitatea moleculelor stimulatorie și suprimă activitatea moleculelor inhibitorie, așa cum este bine cunoscut. Astfel, „modularea” se referă la ameliorarea răspunsului imun de către al doilea agent terapeutic, indiferent dacă agentul însuși este agonist sau antagonist al unei molecule specifice.

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor al unei molecule inhibitorie a celulelor T.

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor al unei molecule inhibitorie a celulelor T PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, BTNL2, B7-H3, B7-H4, HVEM, HHLA2, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, BTLA, CD160, CEACAM-1, LAIR1, TGFβ, IL-10, proteină din familia Siglec, KIR, CD96, TIGIT, NKG2A, CD112, CD47, SIRPA sau CD244.

În unele realizări, KIR este KIR2DL1, KIR2DL2 sau KIR2DL3.

Inhibarea moleculelor inhibitorie poate fi efectuată prin inhibare la nivel de ADN, ARN sau proteină. În unele realizări, un acid nucleic inhibitor (de exemplu, un dsRNA, ARNsi sau shARN) este utilizat pentru a inhiba expresia moleculei inhibitorie.

În unele realizări, inhibitorul moleculei inhibitorie este un ligand solubil al moleculei inhibitorului.

În unele realizări, inhibitorul moleculei inhibitoare este un anticorp antagonistic care se leagă specific la molecula inhibitoare.

În unele realizări, inhibitorul moleculei inhibitoare este proteina de fuziune CTLA-4-Fc sau TIM-3-Fc.

5 În unele realizări, inhibitorul moleculei inhibitoare este un anticorp sau un fragment de anticorp care se leagă la PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, BTNL2, B7-H3, B7-H4, HVEM, HHLA2, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, BTLA, CD160, CEACAM-1, LAIR1, TGFβ, IL-10, proteina familiei Siglec, KIR, CD96, TIGIT, NKG2A, CD112, CD47, SIRPA sau CD244.

10 Exemple de anticorpi anti-PD-1 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși aici și în brevetele S.U.A. numerele 5.897.862 și 7.488.802, și în publicațiile de brevete numerele WO2004/004771, WO2004/056875, WO2006/121168, WO2008/156712, WO2010/029435, WO2010/036959, WO2011/110604, WO2012/145493, WO2014/194302, WO2014/206107, WO2015/036394, WO2015/035606, WO2015/085847, WO2015/112900 și WO2015/112805. Exemple de anticorpi anti-PD1 includ KEYTRUDA® (pembrolizumab) și OPDIVO® (nivolumab).

15 În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un ligand PD-1 solubil.

În unele realizări, ligandul PD-1 solubil este PD-L1 solubil sau PD-L2 solubil fuzionat la un Fc.

În unele realizări, ligandul PD-1 solubil este AMP-224.

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-PD-L1, sau fragment cu legare la antigen al acestuia.

20 Exemple de anticorpi PD-L1 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt anticorpii MDPL3280A (Genentech/Roche) și alți anticorpi umani monoclonali divulgați în brevetul S.U.A. nr. 7.943.743 și publicația de brevet S.U.A. nr. 20120039906. Alți agenți de legare anti-PD-L1 includ YW243.55.S70 (regiunile variabile ale lanțului greu și ușor sunt prezentate în SEQ ID NO 20 și 21 în WO2010/077634) și MDX-1105 (la care se face referire de asemenea ca BMS-936559, și, de exemplu, agenți de legare anti-PD-L1 divulgați în WO2007/005874). Sunt divulgate aici secvențele VH și VL ale anticorpilor anti-PD-L1 durvalumab, atezolimumab și avelumab care pot fi utilizați.

Exemple de anticorpi PD-L2 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în brevetele S.U.A. numerele 8.080.636, 8.188.238, publicația de brevet S.U.A. nr. 20110271358 și publicația de brevet internațional nr. WO2012145493.

30 Exemple de anticorpi B7-H4 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în brevetele S.U.A. numerele 7.888.477, 8.609.816, 7.931.896, brevetul european nr. 1817055, publicațiile de brevet S.U.A. nr. US20140037551 și US2014029486, și publicațiile de brevet internaționale nr. WO2014/100483 și WO2014/159835.

35 Exemple de anticorpi anti-CTLA-4 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt ipilimumab (MDX-010, CAS nr. 477202-00-9) și tremelimumab (anticorp monoclonal IgG2 disponibil de la Pfizer, cunoscut anterior ca ticilimumab, CP-675.206).

Exemple de anticorpi anti-LAG-3 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși de exemplu în publicațiile de brevet internațional nr. WO2008/132601 și WO2010/019570.

40 Exemple de anticorpi anti-CEACAM-1 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în brevetul S.U.A. nr. 8.598.322 și în publicația de brevet S.U.A. nr. US2004/0047858, US20140271618 și US20120100158. Fără a dori a fi legat de nici o teorie particulară, CEACAM-1 a fost descris ca ligand și partener al TIM-3 (vezi de exemplu, publicația de brevet internațional nr. WO2014/022332). Efectul sinergic *in vivo* al combinației de anticorpi anti-TIM-3 și anti-CEACAM-1 a fost detectat în modelele de cancer de xenogrefă (vezi de exemplu, publicația de brevet internațional nr. WO2014/022332). Tumorile pot utiliza CEACAM-1 până la inhibarea sistemului imunitar. Prin urmare, anticorpii anti-CEACAM-1 pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției descrise aici.

Exemple de anticorpi anti-LAIR1 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în brevetul S.U.A. nr. 6.479.638 și publicația de brevet internațional nr. WO2010/078580.

50 Exemple de anticorpi anti-CD96 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în publicația de brevet internațional nr. WO2015/024060.

Exemple de anticorpi anti-TIM-3 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși aici și în publicația de brevet internațional nr. WO2011/155607, WO2013/006490 și WO2015/117002.

55 Exemple de anticorpi anti-TIGIT care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în publicațiile de brevet S.U.A. nr. US20140056890 și US20150216970. Un exemplu de anticorp anti-TIGIT este RG-6058 (MTIG-7192A).

60 S-a descoperit aici că expresia TIGIT este crescută în celulele T CD8⁺ izolate din tumori după tratamentul cu anticorpi anti-TIM-3 în modelele pe animale de cancer. Prin urmare, administrarea terapeutică a anticorpilor antagonistici care se leagă specific la TIGIT la un subiect care a primit deja sau primește terapie cu anticorpi anti-TIM-3, este refractar la tratamentul cu anticorpi anti-TIM-3 sau a

recidivat după sau în timpul tratamentului cu anticorpi anti-TIM-3, poate îmbunătăți rezultatul clinic al pacienților.

Exemple de anticorpi anti-BTLA care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în brevetele S.U.A. numerele 8.546.541, 7.479.544, 8.188.232, 8.247.537, 8.563.694 și în publicația de brevet internațional nr. WO2014184360.

Exemple de anticorpi anti-HVEM care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în publicația de brevet S.U.A. nr. US20110280866.

Exemple de anticorpi CD47 care pot fi utilizați în metodele invenției sunt cei descriși în brevetul S.U.A. nr. 8.101.719.

Exemple de anticorpi CD244 care pot fi utilizați în metodele invenției îi includ pe cei descriși în brevetul S.U.A. nr. 5.688.690.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau la anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-TIM-3 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-PD-L1 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-PD-L2 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-VISTA sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-BTNL2 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-B7-H3 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-B7-H4 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-HVEM sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-HLA2 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CTLA-4 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-LAG-3 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-TIM-3 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-BTLA sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD160 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CEACAM-1 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagonistici ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-LAIR1 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-TGFβ sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

5 În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-IL-10 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-TIGIT sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

10 În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-KIR sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-NKG2A sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD112 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

20 În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD47 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-SIRPA sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

25 În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1/TIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD244 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

30 Moleculele inhibitoare imune pot regla sau regla sinergic funcțiile celulei T pentru a promova evadarea imună tumorală. Prin urmare, terapiile de combinație cu doi sau mai mulți inhibitori ai moleculei inhibitoare pot furniza o terapie îmbunătățită la un pacient în comparație cu monoterapia singură.

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un activator al unei molecule activatoare.

35 În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un activator al unei molecule activatoare CD86, CD80, CD28, ICOS, ligand ICOS, TMIGD2, CD40, ligand GITR, ligand 4-1BB, ligand OX40, CD70, CD40L, TNFRSF25, LIGHT, GITR, OX-40, CD27, CD137, NKG2D, CD48, CD226 sau MICA.

Activarea moleculei activatoare poate fi efectuată utilizând de exemplu liganzi solubili sau derivați liganzi ai moleculelor activatoare, peptide sau anticorpi agonistici.

40 În unele realizări, activatorul moleculei activatoare este un ligand solubil al moleculei care activează celula T.

În unele realizări, activatorul moleculei activatoare este un anticorp agonistic care se leagă specific la molecula activatoare.

45 Exemple de anticorpi anti-CD40 care pot fi utilizați în metodele invenției includ CP-870,893 și S2C6 umanizat descris în brevetul S.U.A. nr. 7.288.251 (anticorpul 21.4.1) și respectiv brevetul S.U.A. nr. 8.303.955, și anticorpii anti-CD40 descriși în publicațiile de brevet internaționale numerele WO2001/056603, WO2001/083755, WO2013/034904 și WO2014/070934.

50 Exemple de agonști GITR includ, de exemplu, proteine de fuziune GITR și anticorpi anti-GITR (de exemplu, anticorpi anti-GITR bivalenți), cum ar fi, o proteină de fuziune GITR descrisă în brevetul S.U.A. nr. 6.111.090, brevetul european nr. 090505B1, brevetul S.U.A. nr. 8.586.023, publicațiile de brevet internațional nr. WO2010/003118 și WO2011/090754, sau un anticorp anti-GITR descris în brevetele S.U.A. numerele 7.025.962, 7.812.135, 8.388.967, 8.591.886 și 7.618.632, brevetele europene nr. 1947183 și 1866339, sau publicațiile de brevet internațional numerele WO2011/028683, WO2013/039954, WO2005/007190, WO2007/133822, WO2005/055808, WO1999/40196, 55 WO2001/03720, WO1999/20758, WO2006/083289, WO2005/115451 și WO2011/051726.

S-a descoperit aici că expresia GITR este crescută în celulele T CD8⁺ izolate din tumori după tratamentul cu anticorp anti-PD-1 în modelele pe animale de cancer. Restaurarea expresiei GITR pe TIL-uri prin tratamentul cu anti-PD-1 susține că terapia de combinație cu anticorpi anti-GITR și anti-PD-1 poate îmbunătăți rezultatul clinic al pacienților.

60 Invenția furnizează de asemenea anticorpii invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiectul care are nevoie de aceasta a unei

cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1 și un anticorp agonistic care se leagă specific la GITR pentru un timp suficient pentru a trata cancerul.

În unele realizări, anticorpul agonistic care se leagă specific la GITR este administrat după administrarea anticorpului antagonist care se leagă specific la PD-1.

În unele realizări, anticorpul agonistic care se leagă specific la GITR și anticorpul antagonist care se leagă specific la PD-1 sunt administrați concomitent ca agenți singuri sau secvențial ca agenți singuri în orice ordine.

Exemple de anticorpi OX40 care pot fi utilizați în metodele invenției îi includ pe cei descriși în brevetele S.U.A. numerele 8.133.983, 7.960.515, publicația de brevet S.U.A. nr. 20130280275 și publicațiile de brevet internațional nr. WO2013028231 și WO2014148895.

Un exemplu de anticorp OX40 care poate fi utilizat în metodele invenției este un anticorp cuprinzând VH din SEQ ID NO: 309 și VL din SEQ ID NO: 310.

Un alt exemplu de anticorp OX40 care poate fi utilizat în metodele invenției este un anticorp cuprinzând VH din SEQ ID NO: 311 și VL din SEQ ID NO: 312.

S-a descoperit aici că expresia OX40 este crescută în celulele T CD8⁺ izolate din tumori după tratamentul cu anticorp anti-PD-1 în modelele pe animale de cancer. Restaurarea expresiei OX40 pe TIL-uri prin tratamentul cu anti-PD-1 susține că terapia de combinație cu anticorpi anti-OX40 și anti-PD-1 poate îmbunătăți rezultatul clinic al pacienților.

Invenția furnizează de asemenea anticorpii invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiectul care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1 și un anticorp agonistic care se leagă specific la OX40 pentru un timp suficient pentru a trata cancerul.

În unele realizări, anticorpul agonistic care se leagă specific la OX40 este administrat după administrarea anticorpului antagonist care se leagă specific la PD-1.

În unele realizări, anticorpul agonistic care se leagă specific la OX40 și anticorpul antagonist care se leagă specific la PD-1 sunt administrate concomitent ca agenți singuri sau secvențial ca agenți singuri în orice ordine.

Exemple de anticorpi CD70 care pot fi utilizați în metodele invenției îi include pe cei descriși în publicația de brevet S.U.A. nr. US20130336976.

Exemple de anticorpi TNFRSF25 care pot fi utilizați în metodele invenției îi include pe cei descriși în brevetul S.U.A. nr. 7.708.996.

Exemple de anticorpi CD27 care pot fi utilizați în metodele invenției îi include pe cei descriși în publicația de brevet S.U.A. nr. US20130336976.

Exemple de anticorpi CD137 care pot fi utilizați în metodele invenției îi includ pe cei descriși în brevetele S.U.A. numerele 6.974.863, 6.303.121, 7.138.500, 7.288.638, 8.716.452, 8.821.867 și în publicația de brevet S.U.A. nr. US20130149301.

S-a descoperit aici că expresia CD137 este crescută în celulele T CD8⁺ izolate din tumori după tratamentul cu anticorp anti-PD-1 în modelele pe animale de cancer. Restaurarea expresiei CD137 pe TIL-uri prin tratamentul cu anti-PD-1 susține că terapia de combinație cu anticorpii anti-CD 137 și anti-PD-1 poate îmbunătăți rezultatul clinic al pacienților.

Invenția furnizează de asemenea anticorpii invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect, cuprinzând administrarea către subiectul care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un anticorp antagonist care se leagă specific la PD-1 și un anticorp agonistic care se leagă specific la CD137 pentru un timp suficient pentru a trata cancerul.

În unele realizări, anticorpul agonistic care se leagă specific la CD137 este administrat după administrarea anticorpului antagonist care se leagă specific la PD-1.

În unele realizări, anticorpul agonistic care se leagă specific la CD137 și anticorpul antagonist care se leagă specific la PD-1 sunt administrate concomitent ca agenți singuri sau secvențial ca agenți singuri în orice ordine.

Exemple de anticorpi NKG2D care pot fi utilizați în metodele invenției îi include pe cei descriși în publicația de brevet S.U.A. nr. US20110150870.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1ATIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD86 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1ATIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD80 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

În unele realizări, anticorpii antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpii PD-1ATIM-3 bispecfici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD28 sau fragment care se leagă la antigen al acestuia.

Eficacitatea combinațiilor descrise aici poate fi testată pe modelele pe animale cunoscute în domeniu.

Anticorpul invenției descrise aici pot fi administrați în combinație cu un vaccin.

Exemple de vaccinuri sunt agenți imunogenici, cum ar fi celule canceroase, antigeni tumorali purificați (incluzând proteine recombinante, epitopi antigenici, molecule de peptide și carbohidrat), antigeni tumorali livrați unui pacient prin terapie genetică, celule, și celule transfectate cu gene care codifică citokinele de stimulare imună. Exemple de vaccinuri care pot fi utilizate includ peptide de antigeni melanomici, cum ar fi peptide de gp100, antigeni MAGE, Trp-2, MART1 și/sau tirozinază, sau celule tumorale transfectate pentru a exprima citokina GM-CSF, vaccinuri pe bază de ADN, vaccinuri pe bază de ARN, și vaccinuri pe bază de transducție virală, peptide sau antigeni de prostată sau peptide de antigeni pulmonari cancerigeni. Vaccinul contra cancerului poate fi profilactic sau terapeutic.

Au fost concepute multe strategii experimentale pentru vaccinarea împotriva tumorilor (vezi Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; vezi de asemenea Restifo, N. și Sznol, M., Cancer Vaccines, Cap. 61, pag. 3023-3043 în DeVita, V. și colab. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Ediția a cincea). Într-una din aceste strategii, un vaccin este preparat utilizând celule tumorale autologe sau alogeneice. S-a adovedit că aceste vaccinuri celulare sunt cele mai eficiente când celulele tumorale sunt transduse pentru a exprima GM-CSF. S-a arătat că GM-CSF este un activator potent al prezentării antigenului pentru vaccinarea tumorală (Dranoff și colab., (1993) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90: 3539-43).

Anticorpul invenției descrise aici pot fi administrați în combinație cu una sau cu o colecție de proteine recombinante și/sau peptide exprimate în, sau pe o tumoare, pentru a genera un răspuns imun la aceste proteine. Aceste proteine sunt în mod normal văzute de către sistemul imunitar ca auto-antigeni și este prin urmare tolerant la acestea. Antigenul tumoral poate include de asemenea proteina telomerază, care este necesară pentru sinteza telomerilor de cromozomi și care este exprimată în mai mult de 85% din cancere la om și în numai într-un număr limitat de țesuturi somatice (Kim și colab., (1994) Science 266: 2011-2013). Antigenii tumorali pot fi de asemenea „neo-antigeni” exprimați în, sau pe celule canceroase, ca rezultat al mutațiilor somatice care alterează secvența de proteină sau crează proteine de fuziune între două secvențe neînrudite (de exemplu, bcr-abl în cromozomul Philadelphia), sau idiotip din tumori cu celule B. Antigenii tumorali pot fi epitopi antigenici ai antigenului specific de prostată (PSA), mesotelin, antigen al membranei specifice prostatei (PSMA), sarcom sinovial X2 (SSX2), NKX3.1, fosfatază acidică prostatică (PAP), sau receptori pentru factorul de creștere epidermal, sau peptide specifice pentru variante de EGFR cum ar fi bine cunoscutul EGFRvIII supraexprimat pe celulele tumorale.

Alte vaccinuri tumorale pot include proteine din virusurile implicate în cancere la om cum ar fi virusurile Papilloma umane (HPV), virusurile hepatitei (HBV și HCV) și virusul Sarcom Herpes Kaposi (KHSV), și virusul Epstein-Barr (EBV). O altă formă de antigeni specifici tumorali care poate fi utilizată în combinație cu anticorpul invenției descrisă aici o constituie proteinele purificate la șoc termic (HSP) izolate din țesutul tumoral însuși. HSP conține fragmente ale proteinelor din celulele tumorale și sunt puternic eficiente la livrare la celulele care prezintă antigen pentru provocarea imunității tumorale (Suot și Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura și colab., (1997) Science 278:117-120).

Celulele dendritice (DC) sunt celule potente care prezintă antigen care pot fi utilizate pentru a pregăti răspunsuri specifice antigenului. DC pot fi produse *ex vivo* și încărcate cu diferite proteine și antigeni peptidici precum și extracte celulare tumorale (Nestle și colab., (1998) Nature Medicine 4: 328-332). DC-urile pot fi de asemenea transduse prin mijloace genetice pentru a exprima acești antigeni tumorali. DC-urile au fuzionat de asemenea direct la celulele tumorale în scopuri de imunizare (Kugler și colab., (2000) Nature Medicine 6:332-336). Ca metodă de vaccinare, imunizarea DC poate fi eficientă combinată cu anticorpul invenției descrise aici pentru a activa răspunsuri antitumorale mai potente.

În unele realizări, vaccinul este o polipeptidă sau un fragment al acesteia, sau un ADN sau un ARN care codifică polipeptida sau fragmentul acesteia exprimată pe celulele tumorale.

În unele realizări, polipeptida sau fragmentul acesteia exprimate pe celulele tumorale este PSMA.

În unele realizări, polipeptida sau fragmentul acesteia exprimate pe celulele tumorale este mesotelin.

În unele realizări, polipeptida sau fragmentul acesteia exprimate pe celulele tumorale este EGFR sau o variantă EGFR cum ar fi EGFRvIII.

În unele realizări, polipeptida sau fragmentul acesteia exprimate pe celulele tumorale este PAP.

În unele realizări, polipeptida sau fragmentul acesteia exprimate pe celulele tumorale este sarcomul sinovial X2 (SSX2).

În unele realizări, polipeptida sau fragmentul acesteia exprimat pe celulele tumorale este NKX3.1.

În unele realizări, celulele tumorale sunt melanom, cancer pulmonar, cancer pulmonar nonmicrocelular scuamos (NSCLC), NSCLC non-scuamos, cancer colorectal, cancer la prostată, cancer

la prostată rezistent la castrare, cancer ovarian, cancer gastric, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer la tiroidă, carcinom cu celule scuamoase de cap și gât, carcinoame de esofag sau tract gastrointestinal sau celule canceroase la sân.

5 În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin de carcinom renal (RCC).

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin de cancer pulmonar.

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin de cancer la prostată.

10 În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin de cancer pulmonar.

În unele realizări, anticorpul antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpul PD-1/TIM-3 bispecifici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin tumoral cuprinzând un fragment de peptidă de EGFR sau EGFRvIII, sau un vector care codifică fragmentul de peptidă de EGFR sau EGFRvIII.

În unele realizări, anticorpul antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpul PD-1/TIM-3 bispecifici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin tumoral cuprinzând un fragment de peptidă de mesotelin, sau un vector care codifică fragmentul de peptidă de mesotelin.

20 În unele realizări, anticorpul antagoniști care se leagă specific la PD-1 al invenției sau anticorpul PD-1/TIM-3 bispecifici antagoniști ai invenției sunt administrați în combinație cu un vaccin tumoral cuprinzând un fragment de peptidă de antigen specific prostatei, sau un vector care codifică fragmentul de peptidă al antigenului specific prostatei.

25 Vectorii adecvați care pot fi utilizați în metodele invenției sunt bine cunoscute și includ vectori lentivirali, vectori adenovirali, vectori minimali ai acidului nucleic (MNAV), virus vaccinia, virus flow pox, VRP derivat din virus Alfa, Saccharomyces cerevisiae, MVA, Listeria monocytogenes, plasmidă pe bază pVAX, vezi de exemplu Pol și colab., (2014) Oncoimmunology 1(3):e28185.

Anticorpul invenției pot fi administrați în combinație cu un tratament standard pentru îngrijirea cancerului.

30 Anticorpul invenției descrise aici pot fi administrați în combinație cu regimuri chimioterapeutice standard pentru îngrijirea cancerului. În aceste cazuri, poate fi posibilă reducerea dozei de reactiv chimioterapeutic administrat (Mokyr și colab., (1998) Cancer Research 58: 5301-5304).

În unele realizări, anticorpul invenției pot fi administrați în combinație cu unul sau mai multe dintre alte molecule anticorp, chimioterapie, alte terapii anti-cancer (de exemplu, terapii anti-cancer țintite, sau medicamente oncolitice), agenți citotoxici, citokine, proceduri chirurgicale și/sau cu radiații.

35 Exemple de agenți citotoxici care pot fi administrați în combinație cu anticorpul invenției include agenți antimicrotubuli, inhibitori de topoizomerază, antimetaboliți, inhibitori mitotici, agenți alchilanți, antracicline, alcaloizi vinca, agenți de intercalare, agenți capabili de interferarea cu o cale de transducție a semnalului, agenți care promovează apoptoză, inhibitori de proteozom, și radiație (de exemplu, iradierea corporală locală sau în întregime).

40 Agenții terapeutici standard de îngrijire includ anastrozole (Arimidax[®]), bicalutamida (Casodex[®]), sulfat de bleomicină (Blenoxane[®]), busulfan (Myleran[®]), injecție cu busulfan (Busulfex[®]), capecitabină (Xeloda[®]), N4-pentoxycarbonil-5-deoxi-5-fluorocitidină, carboplatin (Paraplatin[®]), carmustină (BiCNU[®]), clorambucil (Leukeran[®]), cisplatin (Platinol[®]), cladribină (Leustatin[®]), ciclofosamidă (Citoxan[®] sau Neosar[®]), citarabină, citozină arabinozidă (Citosar-U[®]), injecție cu lipozom de citarabină (DepoCyt[®]), dacarbazină (DTIC-Dome[®]), dactinomycină (Actinomycină D, Cosmegen), clorhidrat de daunorubicină (Cerubidine[®]), injecție cu lipozom de citrat de daunorubicină (DaunoXome[®]), dexametazonă, docetaxel (Taxotere[®]), clorhidrat de doxorubicină (Adriamicină[®], Rubex[®]), etoposidă (Vepesid[®]), fosfat de fludarabină (Fludara[®]), 5-fluorouracil (Adrucil[®], Efudex[®]), flutamidă (Eulexin[®]), tezacitabină, Gemcitabină (difluorodeoxicitidină), hidroxiuree (Hydrea[®]), Idarubicin (Idamicină[®]), ifosfamidă (IFEX[®]), irinotecan (Camptosar[®]), L-asparaginază (ELSPAR[®]), leucovorin calciu, melfalan (Alkeran[®]), 6-mercaptopurină (Purinathol[®]), metotrexat (Folex[®]), mitoxantronă (Novantrone[®]), paclitaxel (Taxol[®]), foenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatin, polifeprosan 20 cu implant de carmustină (Gliadel[®]), citrat de tamoxifen (Nolvadex[®]), tenipozidă (Vumon[®]), 6-tioguanină, tiotepa, tirapazamină (Tirazone[®]), clorhidrat de topotecan pentru injecție (Hycamptin[®]), vinblastină (Velban[®]), vincristină (Oncovin[®]), vinorelbina (Navelbine[®]), Ibrutinib, idelalisib, și brentuximab vedotin.

55 Exemple de agenți alchilanți includ, iperite de azot, derivați de etilenimină, alchil sulfonați, nitrosouree și triazene: muștar de uracil (Aminouracil Mustard[®], Chlorethaminacil[®], Demetildopan[®], Desmetildopan[®], Haemanthamină[®], Nordopan[®], iperită de azot uracil[®], Uracillost[®], Uracilmotaza[®], Uramustin[®], Uramustine[®]), clormetină (Mustargen[®]), ciclofosamidă (Citoxan[®], Neosar[®], Clafen[®], Endoxan[®], Procitox[®], Revimmune[™]), ifosfamidă (Mitoxana[®]), melfalan (Alkeran[®]), clorambucil

(Leukeran[®]), pipobroman (Amedel[®], Vercyte[®]), trietilenmelamină (Hemel[®], Hexalen[®], Hexastat[®]), trietilentiofosforamină, temozolomidă (Temodar[®]), tiotepa (Tioplex[®]), busulfan (Busilvex[®], Myleran[®]), carmustină (BiCNU[®]), lomustină (CeeNU[®]) și streptozocin (Zanosar[®]). Exemple suplimentare de agenți alchilanți includ, oxaliplatin (Eloxatin[®]), temozolomidă (Temodar[®] și Temodal[®]), dactinomycină (cunoscută de asemenea ca actinomycină-D, Cosmegen[®]), altretamină (cunoscută de asemenea ca hexametilmelamină (HMM), Hexalen[®]), bendamustină (Treanda[®]), carboplatin (Paraplatin[®]), lomustină (cunoscută de asemenea ca CCNU, CeeNU[®]), cisplatin (cunoscut de asemenea ca CDDP, Platinol[®] și Platinol[®]-AQ), clorambucil (Leukeran[®]), prednumustină, procabazină (Matulane[®]), și tiotepa (cunoscută de asemenea ca tiofosfoamidă, TESP și TSPA, Tioplex[®]).

Exemple de antraciclină includ, de exemplu, doxorubicină (Adriamicină[®] și Rubex[®]); bleomicină (Lenoxane[®]), daunorubicină (clorhidrat de dauorubicină, daunomicină, și clorhidrat de rubidomicină, Cerubidine[®]), daunorubicină lipozomală (lipozom de citrat de daunorubicină, DaunoXome[®]), mitoxantronă (DHAD, Novantrone[®]), epirubicină (Ellence[™]), idarubicină (Idamicină[®], Idamicină PFS[®]), mitomicină C (Mutamicină[®]), geldanamycină, herbimycină, ravidomicină, și desacetilravidomicină.

Exemple de alcaloizi vinca care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției includ tartrat de vinorelbina (Navelbine[®]), vincristină (Oncovin[®]), și vindesină (Eldisine[®]), vinblastină (cunoscută de asemenea ca sulfat de vinblastină, vincalcukoblastină și VLB, Alkaban-AQ[®] și Velban[®]) și vinorelbina (Navelbine[®]).

Exemple de inhibitori de proteozom care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției sunt bortezomib (Velcade[®]); carfilzomib (Kyprolis[®]), ixazomib (Ninlaro[®]), marizomib (NPI-0052) și delanzomib (CEP-18770).

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, un inhibitor al receptorului de tirozin kinază (RTK)). Exemple de inhibitori de tirozin kinază includ un inhibitor al căii factorului de creștere epidermal (EGF) (de exemplu, un inhibitor al receptorului factorului de creștere epidermal (EGFR)), un inhibitor al căii factorului de creștere endotelial vascular (VEGF) (de exemplu, un inhibitor al receptorului factorului de creștere endotelial vascular (VEGFR) (de exemplu, un inhibitor VEGFR-1, un inhibitor VEGFR-2, un inhibitor VEGFR-3), un inhibitor al căii factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF) (de exemplu, un inhibitor al receptorului factorului de creștere derivat din trombocite (PDGFR) (de exemplu, un inhibitor PDGFR-β), un inhibitor RAF-1, un inhibitor KIT și un inhibitor RET. În unele realizări, al doilea agent terapeutic este axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTIN[™], AZD2171), dasatinib (SPRYCEL[®], BMS-354825), erlotinib (TARCEVA[®]), gefitinib (IRESSA[®]), imatinib (Gleevec[®], CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB[®], TYVERB[®]), lestaurtinib (CEP-701), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA[®]), semaxanib (semaxinib, SU5416), sunitinib (SUTENT[®], SU11248), toceranib (PALLADIA[®]), vandetanib (ZACTIMA[®], ZD6474), vatalanib (PTK787, PTK/ZK), trastuzumab (HERCEPTIN[®]), bevacizumab (AVASTIN[®]), rituximab (RITUXAN[®]), cetuximab (ERBITUX[®]), panitumumab (VECTIBIX[®]), ranibizumab (Lucentis[®]), nilotinib (TASIGNA[®]), sorafenib (NEXAVAR[®]), alemtuzumab (CAMPATH[®]), gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG[®]), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, dovitinib lactat (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK[™]), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF[®]), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, XL228, AEE788, AG-490, AST-6, BMS-599626, CUDC-101, PD153035, pelitinib (EKB-569), vandetanib (zactima), WZ3146, WZ4002, WZ8040, ABT-869 (linifanib), AEE788, AP24534 (ponatinib), AV-951 (tivozanib), axitinib, BAY 73-4506 (regorafenib), alalinat de brivanib (BMS-582664), brivanib (BMS-540215), cediranib (AZD2171), CHIR-258 (dovitinib), CP 673451, CYC116, E7080, Ki8751, masitinib (AB1010), MGCD-265, difosfat de motesanib (AMG-706), MP-470, OSI-930, clorhidrat de pazopanib, PD173074, Sorafenib Tosilat (Bay 43-9006), SU 5402, TSU-68 (SU6668), vatalanib, XL880 (GSK1363089, EXEL-2880). Inhibitorii selectați de tirozin kinază sunt aleși dintre sunitinib, erlotinib, gefitinib, sau sorafenib. În unele realizări, inhibitorul EGFR este un anticorp EGFRc-Met bispecific (EM-1 mAb) cuprinzând lanțurile grele și ușoare din SEQ ID NO: 249, 250, 251 și 252 (US2014/0141000).

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu inhibitori ai receptorului factorului de creștere endotelial vascular (VEGF), incluzând bevacizumab (Avastin[®]), axitinib (Inlyta[®]), alalinat de brivanib (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-Fluoro-2-metil-1H-indol-5-iloxi)-5-metilpirolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-iloxi)propan-2-il)2-aminopropanoat), sorafenib (Nexavar[®]); Pazopanib (Votrient[®]), maleat de sunitinib (Sutent[®]), cediranib (AZD2171, CAS 288383-20-1), vargatef (BIBF1120, CAS 928326-83-4), foretinib (GSK1363089), telatinib (BAY57-9352, CAS 332012-40-5), apatinib (YN968D1, CAS 811803-05-1), imatinib (Gleevec[®]), ponatinib (AP24534, CAS 943319-70-8), tivozanib (AV951, CAS 475108-18-0), regorafenib (BAY73-4506, CAS 755037-03-7), diclorhidrat de vatalanib (PTK787, CAS 212141-51-0), brivanib (BMS-540215, CAS 649735-46-6), vandetanib (Caprelsa[®] sau

AZD6474), difosfat de motesanib (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-indol-6-il)-2-[(4-piridinilmetil)amino]-3-piridinăcarboxamidă, descrisă în publicația PCT nr. WO 02/066470), acid dilactic de dovitinib (TKI258, CAS 852433-84-2), linfanib (ABT869, CAS 796967-16-3); Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1), lestaurtinib (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-Dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidincarboxamidă (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-Amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[[3 α ,5 β ,6 α]-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirol-5-il]metoxi]-4-chinazolinamină (XL647, CAS 781613-23-8); 4-Metil-3-[[1-metil-6-(3-piridinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il]amino]-N-[3-(trifluorometil)fenil]-benzamidă (BHG712, CAS 940310-85-0); și aflibercept (Eylea®).

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor al PI3K. Într-o realizare, inhibitorul PI3K este un inhibitor al izoformelor delta și gama ale PI3K. Exemple de inhibitori ai PI3K care pot fi utilizați sunt descrise în, de exemplu, WO 2010/036380, WO 2010/006086, WO 09/114870, WO 05/113556, GSK 2126458, GDC-0980, GDC-0941, Sanofi XL147, XL756, XL147, PF-46915032, BKM 120, CAL-101, CAL 263, SF1126, PX-886, și un inhibitor dual al PI3K (de exemplu, Novartis BEZ235).

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor mTOR, de exemplu, unul sau mai mulți inhibitori mTOR aleși dintre unul sau mai mulți dintre rapamicină, temsirolim (TORISEL®), AZD8055, BEZ235, BGT226, XL765, PF-4691502, GDC0980, SF1126, OSI-027, GSK1059615, KU-0063794, WYE-354, Palomid 529 (P529), PF-04691502, sau PKI-587. Ridaforlim (cunoscut anterior ca deferolim, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-penta-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30,3,1,04,9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexil dimetilfosfinat, cunoscut de asemenea ca AP23573 și MK8669, și descris în publicația PCT nr. WO 03/064383); everolim (Afinitor® sau RAD001); rapamicină (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); emsirolim, (5-[2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-Amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido [2,3 -d]pirimidin-7(8H)-onă (PF04691502, CAS 1013101-36-4); și N2-[1,4-dioxa-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinium-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L- α -aspartil-L-serină- (SEQ ID NO: 237), sare internă (SF1126, CAS 936487-67-1), și XL765.

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor BRAF, de exemplu, GSK2118436, RG7204, PLX4032, GDC-0879, PLX4720, și sorafenib tosilat (Bay 43-9006).

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor MEK.

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor JAK2, de exemplu, CEP-701, INCB18424, CP-690550 (tasocitinib).

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu paclitaxel sau un agent paclitaxel, de exemplu, TAXOL®, paclitaxel legat la proteină (de exemplu, ABRAXANE®). Exemple de agenți paclitaxel includ paclitaxel legat la nanoparticule de albumină (ABRAXANE, comercializat de Abraxis Bioscience), paclitaxel legat la acid docosahexaenoic (DHA-paclitaxel, Taxoprexin, comercializat de Protarga), paclitaxel legat la poliglutamat (PG-paclitaxel, paclitaxel poliglumex, CT-2103, XYOTAX, comercializat de Cell Therapeutic), promedicament activat de tumoare (TAP), ANG105 (Angiopep-2 legat la trei molecule de paclitaxel, comercializat de ImunoGen), paclitaxel-EC-1 (paclitaxel legat la peptida EC-1 care recunoaște erbB2; vezi Li și colab., Biopolymers (2007) 87:225-230), și paclitaxel conjugat la glucoză (de exemplu, 2'-paclitaxel metil 2-glucopiranozil succinat, vezi Liu și colab., (2007) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17:617-620).

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu o imunoterapie celulară (de exemplu, Provenge (de exemplu, Sipuleucel)), și opțional în combinație cu ciclofosfamidă.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpul invenției pentru tratamentul cancerului pancreatic includ un agent chimioterapic, de exemplu, paclitaxel sau un agent paclitaxel (de exemplu, o formulare paclitaxel cum ar fi TAXOL, o formulare paclitaxel cu nanoparticule stabilizate de albumină (de exemplu, ABRAXANE) sau o formulare paclitaxel lipozomală); gemcitabină (de exemplu, gemcitabină singură sau în combinație cu AXP107-11); alți agenți chimioterapici cum ar fi oxaliplatin, 5-fluorouracil, capecitabină, rubitecan, clorhidrat de epirubicină, NC-6004, cisplatin, docetaxel (de exemplu, TAXOTERE), mitomicină C, ifosfamidă; interferon; inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor EGFR (de exemplu, erlotinib, panitumumab, cetuximab, nimotuzumab); inhibitor al receptorului HER2/neu (de exemplu, trastuzumab); inhibitor dual de kinază (de exemplu, bosutinib, saracatinib, lapatinib, vandetanib); inhibitor multikinază (de exemplu, sorafenib, sunitinib, XL184, pazopanib); inhibitor VEGF (de exemplu, bevacizumab, AV-951, brivanib); radioimunoterapie (de exemplu, XR303); vaccin contra cancerului (de exemplu, GVAX, peptidă survivin); inhibitor COX-2 (de exemplu, celecoxib); inhibitor al receptorului IGF-1 (de exemplu, AMG 479, MK-0646); inhibitor mTOR

(de exemplu, everolim, temsirolim), inhibitor IL-6 (de exemplu, CNTO 328); inhibitor de kinază dependent de ciclină (de exemplu, P276-00, UCN-01); compus direcționat către metabolismul energetic alterat (AEMD) (de exemplu, CPI-613); inhibitor HDAC (de exemplu, vorinostat); agonist al receptorului 2 TRAIL (TR-2) (de exemplu, conatumumab); inhibitor MEK (de exemplu, AS703026, selumetinib, GSK1120212); inhibitor de kinază dual Raf/MEK (de exemplu, RO5126766), inhibitor al semnalizare Notch (de exemplu, MK0752), proteină de fuziune monoclonală anticorp-anticorp (de exemplu, L19IL2), curcumin; inhibitor al Hsp90 (de exemplu, tanespimicină, STA-9090), rIL-2; denileukin diftotox; inhibitor de topoizomerază 1 (de exemplu, irinotecan, PEP02); statină (de exemplu, simvastatină), inhibitor al factorului VIIa (de exemplu, PCI-27483), inhibitor AKT (de exemplu, RX-0201), promedicament activat de hipoxie (de exemplu, TH-302), clorhidrat de metformin, inhibitor de secretază gama (de exemplu, R04929097), inhibitor al reductazei de ribonucleotide (de exemplu, 3-AP), imunotoxină (de exemplu, HuC242-DM4), inhibitor PARP (de exemplu, KU-0059436, veliparib), inhibitor CTLA-4 (de exemplu, CP-675,206, ipilimumab), terapie AdV-tk, inhibitor de proteazom (de exemplu, bortezomib (Velcade), NPI-0052), tiazolidinedionă (de exemplu, pioglitazone), NPC-1C; inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, R763/AS703569), inhibitor CTGF (de exemplu, FG-3019), siG12D LODER și terapie cu radiație (de exemplu, tomoterapie, radiație stereotactică, terapie cu protoni), chirurgie, și o combinație a acestora. În anumite realizări, o combinație de paclitaxel sau un agent paclitaxel, și gemcitabină poate fi utilizată cu anticorpii invenției.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul cancerului pulmonar microcelular (SCLC) includ medicamente aprobate pentru tratamentul SCLC cum ar fi metotrexat (Folex[®], Mexate[®]), everolim (Afinitor[®]), clorhidrat de doxorubicină, fosfat de etoposidă (Etopophos[®]), clorhidrat de topotecan (Hycamtin[®]), clorhidrat de meclortamină (Mustargen[®]), clorhidrat de topotecan. Alți agenți terapeutici care pot fi utilizați sunt carboplatin, cisplatin, oxaliplatin, irinotecan, gemcitabină, SN-38 lipozomală, bendamustină, temozolomidă, belotecan, NK012, FR901228, flavopiridol), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor EGFR (de exemplu, erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab), inhibitor multikinază (de exemplu, sorafenib, sunitinib), inhibitor VEGF (de exemplu, bevacizumab, vandetanib), vaccin contra cancerului (de exemplu, GVAX); inhibitor Bcl-2 (de exemplu, oblimersen de sodiu, ABT-263), inhibitor proteazom (de exemplu, bortezomib (Velcade), NPI-0052), paclitaxel sau un agent paclitaxel; docetaxel, inhibitor al receptorului IGF-1 (de exemplu, AMG 479), inhibitor HGF/SF (de exemplu, AMG 102, MK-0646), clorochină, inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, MLN8237), radioimunoterapie (de exemplu, TF2), inhibitor al Hsp90 (de exemplu, tanespimicină, STA-9090), inhibitor mTOR (de exemplu, everolim), anticorp bispecific Ep-CAM/CD3 (de exemplu, MT110), inhibitor CK-2 (de exemplu, CX-4945), inhibitor HDAC (de exemplu, belinostat), antagonist SMO (de exemplu, BMS 833923), vaccin peptidic contra cancerului, și terapie cu radiație (de exemplu, terapie cu radiație modulată în intensitate (IMRT), radioterapie hipofracționată, radioterapie ghidată de hipoxie), chirurgie, și combinații ale acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul cancerului pulmonar nonmicrocelular includ medicamentele aprobate pentru tratamentul NSCLC incluzând metotrexat (Folex[®], Mexate[®]), paclitaxel (Abraxane[®]), afatinib (Gilotrif[®]), everolim (Afinitor[®]), alectinib (Alecensa[®]), pemetrexat de disodiu (Alimta[®]), bevacizumab (Avastin[®]), carboplatin, ceritinib (Zykadia[®]), crizotinib (Xalkori[®]), ramucirumab (Cyramza[®]), docetaxel, everolim (Afinitor[®]), gefitinib (Iressa[®]), afatinib dimaleat (Gilotrif[®]), clorhidrat de gemcitabină (Gmezar[®]), pembrolizumab (Keytruda[®]), clorhidrat de meclortamină (Mustargen[®]), tartrat de vinorelbină (Navelbine[®]), necitumumab (Portrazza[®]), nivolumab (Opdivo[®]), osimertinib, paclitaxel (Taxol[®]), carboplatin, pemetrexat de disodiu, ramucirumab (Cyramza[®]), osimertinib (Tagrisso[®]). Alți agenți terapeutici care pot fi utilizați sunt vinorelbină, cisplatin, docetaxel, pemetrexat de disodiu, etoposidă, gemcitabină, carboplatin, SN-38 lipozomală, TLK286, temozolomidă, topotecan, pemetrexat de disodiu, azacitidină, irinotecan, tegafur-gimeracil-oteracil de potasiu, sapacitabină), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor EGFR (de exemplu, erlotinib, gefitinib, cetuximab, panitumumab, necitumumab, PF-00299804, nimotuzumab, RO5083945), inhibitor MET (de exemplu, PF-02341066, ARQ 197), inhibitor de kinază PI3K (de exemplu, XL147, GDC-0941), inhibitor de kinază dual Raf/MEK (de exemplu, RO5126766), inhibitor de kinază dual PI3K/mTOR (de exemplu, XL765), inhibitor SRC (de exemplu, dasatinib), inhibitor dual (de exemplu, BIBW 2992, GSK1363089, ZD6474, AZD0530, AG-013736, lapatinib, MEHD7945A, linifanib), inhibitor multikinase (de exemplu, sorafenib, sunitinib, pazopanib, AMG 706, XL184, MGCD265, BMS-690514, R935788), inhibitor VEGF (de exemplu, endostatin, bevacizumab, cediranib, BIBF 1120, axitinib, tivozanib, AZD2171), vaccin contra cancerului (de exemplu, vaccin lipozomal BLP25, GVAX, ADN recombinant și adenovirus care exprimă proteina L523S), inhibitor Bcl-2 (de exemplu, oblimersen de sodiu), inhibitor proteazom (de exemplu, bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, MLN9708), paclitaxel sau un agent paclitaxel, docetaxel, inhibitor al receptorului IGF-1 (de exemplu, cixutumumab, MK-0646, OSI 906, CP-751,871, BIIB022), hidroxyciclorochină, inhibitor al Hsp90 (de exemplu, tanespimicină, STA-9090, AUY922, XL888), inhibitor mTOR (de

exemplu, everolim, temsirolim, ridaforolim), anticorp bispecific Ep-CAM/CD3 (de exemplu, MT110), inhibitor CK-2 (de exemplu, CX-4945), HDAC inhibitor (de exemplu, MS 275, LBH589, vorinostat, valproic acid, FR901228), inhibitor DHFR (de exemplu, pralatrexate), retinoid (de exemplu, bexaroten, tretinoin), conjugat anticorp-medicament conjugate (de exemplu, SGN-15), bisfosfonat (de exemplu, zoledronic acid), vaccin contra cancerului (de exemplu, belagenpumatucel-L), heparină cu masă moleculară mică (LMWH) (de exemplu, tinzaparin, enoxaparin), GSK1572932A, melatonin, talactoferin, dimesna, inhibitor topoizomerază (de exemplu, amrubicin, etoposidă, karenitecin), nelfinavir, cilengitidă, inhibitor ErbB3 (de exemplu, MM-121, U3-1287), inhibitor survivin (de exemplu, YM155, LY2181308), eribulin mesilat, inhibitor COX-2 (de exemplu, celecoxib), pegfilgrastim, inhibitor de kinază 1 asemănător Polo (de exemplu, BI 6727), agonist al receptorului 2 TRAIL (TR-2) (de exemplu, CS-1008), peptidă CNGRC (SEQ ID NO: 225)-conjugat alfa TNF, dicloroacetat (DCA), inhibitor HGF (de exemplu, SCH 900105), SAR240550, agonist al PPAR-gama (de exemplu, CS-7017), inhibitor de secretașă gama (de exemplu, RO4929097), terapie epigenetică (de exemplu, 5-azacitidină), nitroglicerină, inhibitor MEK (de exemplu, AZD6244), inhibitor de kinază dependent de ciclina (de exemplu, UCN-01), colesterol-Fusl, agent antitubulin (de exemplu, E7389), inhibitor farnezil-OH-transferază (de exemplu, lonafarnib), imunotoxină (de exemplu, BB-10901, SS1 (dsFv) PE38), fondaparinux, agent de perturbare vasculară (de exemplu, AVE8062), inhibitor PD-L1 (de exemplu, MDX-1105, MDX-1106), beta-glucan, NGR-hTNF, EMD 521873, inhibitor MEK (de exemplu, GSK1120212), analog de epotilonă (de exemplu, ixabepilonă), inhibitor al axului de kinezină (de exemplu, 4SC-205), agent de țințire a telomerului (de exemplu, KML-001), inhibitor al căii P70 (de exemplu, LY2584702), inhibitor AKT (de exemplu, MK-2206), inhibitor de angiogeneză (de exemplu, lenalidomidă), inhibitor de semnalizare Notch (de exemplu, OMP-21M18), anticorp EM-1 bispecific EGFR/c-Met cum s-a descris în US2014/0141000A1, terapie cu radiație, chirurgie, și combinații ale acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul cancerului ovarian includ medicamentele aprobate pentru tratamentul cancerului ovarian, cum ar fi melfalan (Alkeran®), bevacizumab (Avastin®), carboplatin, ciclofosamidă (Clafen®, Citoxan®), clisplatin, clorhidrat de doxorubicină, clorhidrat de gemcitabină (Gemzar®), clorhidrat de topotecan (Hycamtin®), Olaparib (Lynparza®), carboplatin, cisplatin, paclitaxel (Taxol®), tiotepa și clorhidrat de topotecan. Alți agenți terapeutici care pot fi utilizați sunt, ifosfamidă, olaparib, oxaliplatin, pemetrexat de disodiu, SJG-136, etoposidă, decitabină; imunoterapie (de exemplu, APC8024, oregovomab, OPT-821), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor EGFR (de exemplu, erlotinib), inhibitor dual (de exemplu, E7080), inhibitor multikinază (de exemplu, AZD0530, JI-101, sorafenib, sunitinib, pazopanib), inhibitor VEGF (de exemplu, bevacizumab, BIBF 1120, cediranib, AZD2171), inhibitor PDGFR (de exemplu, IMC-3G3), paclitaxel, inhibitor de topoizomerază (de exemplu, karenitecin, Irinotecan), inhibitor HDAC (de exemplu, valproat, vorinostat), inhibitor al receptorului folat (de exemplu, farletuzumab), inhibitor angiopoietin (de exemplu, AMG 386), analog epotilon (de exemplu, ixabepilon), inhibitor de proteazom (de exemplu, carfilzomib), inhibitor al receptorului IGF-1 (de exemplu, OSI 906, AMG 479), inhibitor PARP (de exemplu, veliparib, AGO 14699, iniparib, MK-4827), inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, MLN8237, ENMD-2076), inhibitor de angiogeneză (de exemplu, lenalidomidă), inhibitor DHFR (de exemplu, pralatrexat), radioagent imunoterapeutic (de exemplu, Hu3S193), statină (de exemplu, lovastatină), inhibitor de topoizomerază 1 (de exemplu, NKTR-102), vaccin contra cancerului (de exemplu, vaccin sintetic cu peptidă lungă p53, vaccin OC-DC autolog), inhibitor mTOR (de exemplu, temsirolim, everolim), inhibitor BCR/ABL (de exemplu, imatinib), antagonist al receptorului ET-A (de exemplu, ZD4054), agonist al receptorului 2 TRAIL (TR-2) (de exemplu, CS-1008), inhibitor HGF/SF (de exemplu, AMG 102), EGEN-001, inhibitor de kinază 1 asemănător cu Polo (de exemplu, BI 6727), inhibitor de secretașă gama (de exemplu, RO4929097), inhibitor Wee-1 (de exemplu, MK-1775), agent antitubulin (de exemplu, vinorelbină, E7389), imunotoxină (de exemplu, denileukin diftotox), SB-485232, agent de perturbare vasculară (de exemplu, AVE8062), inhibitor de integrină (de exemplu, EMD 525797), inhibitor al acului de kinezină (de exemplu, 4SC-205), revlimid, inhibitor HER2 (de exemplu, MGAH22), inhibitor ErrB3 (de exemplu, MM-121), terapie cu radiație, și combinații ale acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unui mielom includ unul sau mai mulți dintre agenții chimioterapeutici sau alți agenți anti-cancer (de exemplu, analogi de talidomidă, de exemplu, lenalidomidă), HSCT (Cook, (2008) J Manag Care Pharm. 14(7 Suppl): 19-25), un anticorp anti-TIM-3 (Hallett și colab., (2011) J of American Society for Blood and Marrow Transplantation 17(8): 1133-145), celule dendritice impulsionate cu antigen tumoral, fuziuni (de exemplu, electrofuziuni) ale celulelor tumorale și celulelor dendritice, sau vaccinarea cu idiotip imunoglobulinic produs de către celulele maligne din plasmă (analizat în Yi (2009) Cancer J 15(6):502-10).

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unui cancer renal, de exemplu, un carcinom cu celule renale (RCC) sau RCC metastatic

include medicamentele aprobate pentru tratamentul RCC, incluzând everolim (Afinitor®), aldesleukin, bevacizumab (Avastin®), axitinib (Inlyta®), cabozantinib-S-Maleat (Cabometyx®), aldesleukin (Proleukin®), lenvatinib mesilat (Lenvima®), sorafenib tosilat (Nexavar®), nivolumab (Opdivo®), pazopanib clorhidrat, sorafenib tosilat, sunitinib (Sutent®), temsirolim (Torisel®) și clorhidrat de pazopanib (Votrient®). Alți agenți terapeutici care pot fi utilizați sunt un agent de țintire (de exemplu, un inhibitor VEGF cum ar fi un anticorp monoclonal la VEGF, de exemplu, bevacizumab, un inhibitor de tirozin kinază VEGF cum ar fi sorafenib, axitinib și pazopanib.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unei leucemii mielogene cronice (AML) include un agent chimioterapeutic (de exemplu, citarabină, hidroxiuree, clofarabină, melfalan, tiotepa, fludarabină, busulfan, etoposidă, cordicepin, pentostatina, capecitabină, azacitidină, ciclofosfamidă, cladribină, topotecan), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor BCR/ABL (de exemplu, imatinib, nilotinib), inhibitor dual (de exemplu, dasatinib, bosutinib), inhibitor multikinază (de exemplu, DCC-2036, ponatinib, sorafenib, sunitinib, RGB-286638), interferon alfa, steroizi, agent apoptotic (de exemplu, omacetaxină mepesuccinat), imunoterapie (de exemplu, celule T asemănătoare Th1 de memorie CD4+ alogeneice/anti-CD3/anti-CD28 legate la microparticule, celule ucigașe autologe induse de citokină (CIK), AHN-12), agent de țintire CD52 (de exemplu, alemtuzumab), inhibitor al Hsp90 (de exemplu, tanespimicină, STA-9090, AUY922, XL888), inhibitor mTOR (de exemplu, everolimus), antagonist SMO (de exemplu, BMS 833923), inhibitor de reductază a ribonucleotidelor (de exemplu, 3-AP), inhibitor JAK-2 (de exemplu, INCB018424), hidroxiclorochină, retinoid (de exemplu, fenretinide), inhibitor de kinază dependent de ciclină (de exemplu, UCN-01), inhibitor HDAC (de exemplu, belinostat, vorinostat, JNJ-26481585), inhibitor PARP (de exemplu, veliparib), antagonist MDM2 (de exemplu, RO5045337), inhibitor de kinază Aurora B (de exemplu, TAK-901), radioimunoterapie (de exemplu, anticorp anti-CD33 marcat cu actiniu-225 HuM 195), inhibitor Hedgehog (de exemplu, PF-04449913), inhibitor STAT3 (de exemplu, OPB-31121), KB004, vaccin contra cancerului (de exemplu, AG858), transplant de măduvă osoasă, transplant de celule stem, terapie cu radiație, și combinații ale acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unei leucemii limfocitare cronice (CLL) includ un agent chimioterapeutic (de exemplu, fludarabină, ciclofosfamidă, doxorubicină, vincristină, clorambucil, bendamustină, clorambucil, busulfan, gemcitabină, melfalan, pentostatina, mitoxantronă, 5-azacitidină, pemetrexat de disodiu), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor EGFR (de exemplu, erlotinib), inhibitor BTK (de exemplu, PCI-32765 (ibrutinib), inhibitor multikinază (de exemplu, MGCD265, RGB-286638), agent de țintire CD-20 (de exemplu, rituximab, ofatumumab, RO5072759, LFB-R603), agent de țintire CD52 (de exemplu, alemtuzumab), prednisolon, darbepoetin alfa, lenalidomidă, inhibitor Bcl-2 (de exemplu, ABT-263), imunoterapie (de exemplu, celule T asemănătoare cu Th1 de memorie CD4+ alogeneice/anti-CD3/anti-CD28 legate la microparticule, celule ucigașe autologe induse de citokină (CIK), inhibitor HDAC (de exemplu, vorinostat, acid valproic, LBH589, JNJ-26481585, AR-42), inhibitor XIAP (de exemplu, AEG35156), agent de țintire CD-74 (de exemplu, milatuzumab), inhibitor mTOR (de exemplu, everolim), LA-101, imunitoxină (de exemplu, CAT-8015, anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2)), agent de țintire CD37 (de exemplu, TRU-016), radioimunoterapie (de exemplu, 131-tositumomab), hidroxiclorochină, perifosină, inhibitor SRC (de exemplu, dasatinib), talidomidă, inhibitor delta PI3K (de exemplu, CAL-101), retinoid (de exemplu, fenretinidă), antagonist MDM2 (de exemplu, RO5045337), plerixafor, inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, MLN8237, TAK-901), inhibitor de proteazom (de exemplu, bortezomib), agent de țintire CD-19 (de exemplu, MEDI-551, MOR208), inhibitor MEK (de exemplu, ABT-348), inhibitor JAK-2 (de exemplu, INCB018424), promedicament activat de hipoxie (de exemplu, TH-302), paclitaxel sau un agent paclitaxel, inhibitor al Hsp90, inhibitor AKT (de exemplu, MK2206), inhibitor HMG-CoA (de exemplu, simvastatină), GNKG186, terapie cu radiație, transplant de măduvă osoasă, transplant de celule stem, și o combinație a acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unei leucemii limfocitare acute (ALL) include un agent chimioterapeutic (de exemplu, prednisolon, dexametazonă, vincristină, asparaginază, daunorubicină, ciclofosfamidă, citarabină, etoposidă, tioguanină, mercaptopurină, clofarabină, anamicină lipozomală, busulfan, etoposidă, capecitabină, decitabină, azacitidină, topotecan, temozolomidă), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor BCR/ABL (de exemplu, imatinib, nilotinib), PE 01910.Na, inhibitor multikinază (de exemplu, sorafenib), agent de țintire CD-20 (de exemplu, rituximab), agent de țintire CD52 (de exemplu, alemtuzumab), inhibitor al Hsp90 (de exemplu, STA-9090), inhibitor mTOR (de exemplu, everolim, rapamicină), inhibitor JAK-2 (de exemplu, INCB018424), inhibitor al receptorului HER2/neu (de exemplu, trastuzumab), inhibitor de proteazom (de exemplu, bortezomib), metotrexat, asparaginază, agent de țintire CD-22 (de exemplu, epratuzumab, inotuzumab), imunoterapie (de exemplu, celule ucigașe autologe induse de citokine (CIK), AHN-12), blinatumomab, inhibitor de kinază dependent de ciclină (de exemplu, UCN-01), agent de țintire CD45 (de exemplu, BC8), antagonist MDM2 (de exemplu,

RO5045337), imunotoxină (de exemplu, CAT-8015, DT2219ARL), inhibitor HDAC (de exemplu, JNJ-26481585), JVRS-100, paclitaxel sau un agent paclitaxel, inhibitor STAT3 (de exemplu, OPB-31121), inhibitor PARP (de exemplu, veliparib), EZN-2285, terapie cu radiație, steroid, transplant de măduvă osoasă, transplant de celule stem, sau o combinație a acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unei leucemii mieloid acute (AML) includ un agent chimioterapeutic (de exemplu, citarabină, daunorubicină, idarubicină, clofarabină, decitabină, vosaroxin, azacitidină, clofarabină, ribavirină, CPX-351, treosulfan, elacitarabină, azacitidină), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor BCR/ABL (de exemplu, imatinib, nilotinib), PE 01910.Na, inhibitor multikinază (de exemplu, midostaurin, SU 11248, chizartinib, sorafenib), imunotoxină (de exemplu, gemtuzumab ozogamicin), proteină de fuziune DT388IL3, inhibitor HDAC (de exemplu, vorinostat, LBH589), plerixafor, inhibitor mTOR (de exemplu, everolim), inhibitor SRC (de exemplu, dasatinib), inhibitor HSP90 (de exemplu, STA-9090), retinoid (de exemplu, bexaroten, inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, BI 811283), inhibitor JAK-2 (de exemplu, INCB018424), inhibitor de kinază asemănătoare cu Polo (de exemplu, BI 6727), cenersen, agent de țintire CD45 (de exemplu, BC8), inhibitor de kinază dependent de ciclină (de exemplu, UCN-01), antagonist MDM2 (de exemplu, RO5045337), inhibitor mTOR (de exemplu, everolim), LY573636-sodiu, ZRx-101, MLN4924, lenalidomidă, imunoterapie (de exemplu, AHN-12), diclorhidrat de histamină, terapie cu radiație, transplant de măduvă osoasă, transplant de celule stem, și o combinație a acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unui mielom multiplu (MM) includ un agent chimioterapeutic (de exemplu, melfalan, amifostină, ciclofosfamidă, doxorubicină, clofarabină, bendamustină, fludarabină, adriamicină, SyB L-0501), talidomidă, lenalidomidă, dexametazonă, prednison, pomalidomidă, inhibitor de proteazom (de exemplu, bortezomib, carfilzomib, MLN9708), vaccin contra cancerului (de exemplu, GVAX), agent de țintire CD-40 (de exemplu, SGN-40, CHIR-12.12), perifosină, acid zoledronic, imunoterapie (de exemplu, MAGE-A3, NY-ESO-1, HuMax-CD38), inhibitor HDAC (de exemplu, vorinostat, LBH589, AR-42), aplidin, inhibitor de kinază dependent de ciclină (de exemplu, PD-0332991, dinaciclib), trioxid de arsenic, CB3304, inhibitor al Hsp90 (de exemplu, KW-2478), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor EGFR (de exemplu, cetuximab), inhibitor multikinază (de exemplu, AT9283), inhibitor VEGF (de exemplu, bevacizumab), plerixafor, inhibitor MEK (de exemplu, AZD6244), IPH2101, atorvastatină, imunotoxină (de exemplu, BB-10901), NPI-0052, agenți radioimunoterapeutici (de exemplu, itriu Y 90 ibritumomab tiuxetan), inhibitor STAT3 (de exemplu, OPB-31121), MLN4924, inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, ENMD-2076), IMG901, ACE-041, inhibitor CK-2 (de exemplu, CX-4945), un anticorp anti-CD38 (de exemplu DARZALEX® (daratumumab), terapie cu radiație, transplant de măduvă osoasă, transplant de celule stem, și o combinație a acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unui cancer la prostată sunt medicamentele aprobate pentru tratamentul cancerului la prostată, cum ar fi acetat de abirateronă (Zytiga®), bicalutamidă (Casodex®), cabazitaxel (Jevtana®), estrogeni conjugați (Premarin®), stradiol (Estrace®), valerat de estradiol (Delestrogen®), estrogeni, esterificat (Menest®), degarelix (Firmagon®), docetaxel (Taxotere®), enzalutamidă (Xtandi®), flutamidă, acetat de goserelin (Zoladex®), Cabazitaxel (Jevtana®), acetat de leuprolid (Lupron®), clorhidrat de mitoxantronă, nilutamidă (Nilandron®) Sipuleucel-T (Provenge®) și diclorură de raiu 223 (Xofigo®). Alte medicamente care pot fi utilizate includ un agent chimioterapeutic (de exemplu, carboplatin, fludarabină), terapie hormonală (de exemplu, acetat de ciproteronă, ketoconazol, aminoglutetimidă, abarelix, degarelix, leuprolid, triptorelin, buserelin), inhibitor de tirozin kinază (de exemplu, inhibitor de kinază dual (de exemplu, lapatanib), inhibitor multikinază (de exemplu, sorafenib, sunitinib), inhibitor VEGF (de exemplu, bevacizumab), TAK-700, vaccin contra cancerului (de exemplu, BPX-101, PEP223), lenalidomidă, TOK-001, inhibitor al receptorului IGF-1 (de exemplu, cixutumumab), TRC105, un inhibitor de kinază Aurora (de exemplu, MLN8237), inhibitor de proteazom (de exemplu, bortezomib), OGX-011, radioimunoterapie (de exemplu, HuJ591-GS), inhibitor HDAC (de exemplu, acid valproic, SB939, LBH589), hidroxiclorochină, inhibitor mTOR (de exemplu, everolim), dovitinib lactat, diindolilmetan, efavirenz, OGX-427, genisteină, IMC-3G3, bafetinib, CP-675.206, terapie cu radiație, chirurgie, sau o combinație a acestora.

Exemple de agenți terapeutici care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției pentru tratamentul unui carcinom cu celule scuamoase de cap și gât (HNSCC) includ metotrexat (Folex®, Mexate®), bleomicină (Blenoxane®), docetaxel (Taxotere®), erbitux (Cetuximab®), hidroxiuree (Hydrea®) sau pembrolizumab (Keytruda®).

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un agonist TLR.

În unele realizări, agonistul TLR3 este agonist TLR4.

În unele realizări, agonistul TLR3 este un agonist TLR7/8.

Exemple de agoniști TLR sunt Pam3Cys, un agonist TLR-1/2; CFA, un agonist TLR-2; MALP2, un agonist TLR-2; Pam2Cys, un agonist TLR-2; FSL-1, un agonist TLR-2; Hib-OMPC, un agonist TLR-2; acid poliribosinic:poliribocitidic (Poli I:C), un agonist TLR-3; acid poliadenozină-poliuridilic (poli AU), un agonist TLR-3; acid Poliinosinic-Policitidili stabilizat cu poli-L-lizină și carboximetilceluloză (Hiltonol®), un agonist TLR-3; lipidă monofosforil A (MPL), un agonist TLR-4; LPS, un agonist TLR-4; flagelin bacterian, un agonist TLR-5; sialil-Tn (STn), un carbohidrat asociat cu mucin MUC1 pe un număr de celule umane canceroase și un agonist TLR-4; imichimod, un agonist TLR-7; resichimod, un agonist TLR-7/8; loxoribină, un agonist TLR-7/8; și dinucleotida CpG nemetilată (CpG-ODN), un agonist TLR-9.

Exemple de agoniști TLR4 sunt anticorpii agonistici care se leagă specific la TLR4.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp care oferă CSF-1R.

Exemple de anticorpi care se leagă la CSF-1R sunt cei descriși în publicația de brevet internațional nr. WO2013132044.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu agonistul LXRβ.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un agonist DR4.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un agonist DR5.

Agoniști DR4 și DR5 adecvați sunt descriși de exemplu în publicația de brevet internațional nr. WO2014159562.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-galectin 1.

Exemple de anticorpi anti-galectin 1 care pot fi utilizați în combinație cu anticorpii invenției sunt cei descriși în publicația de brevet internațional nr. WO2015013389.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un inhibitor BTK.

În unele realizări, inhibitorul BTK este IMBRUVICA® (ibrutinib).

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-HER2.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu un anticorp anti-CD20.

În unele realizări, anticorpii invenției sunt administrați în conjuncție cu (de exemplu, înainte, simultan sau după) transplantul de măduvă osoasă, terapia ablativă cu celule T utilizând agenți chimioterapeutici cum ar fi, fludarabină, terapie cu radiație cu fascicul extern (XRT), ciclofosamidă, și/sau anticorpi cum ar fi OKT3 sau CAMPATH. În unele realizări, anticorpii invenției pot fi administrați după terapia ablativă cu celule B cum ar fi agenții care reacționează cu CD20, de exemplu, Rituxan. De exemplu, într-o realizare, subiecții pot suferi tratamentul standard cu doză mare de chimioterapie urmată de transplantul celulei stem din sângele periferic. În anumite realizări, după transplant, subiecții primesc anticorpii invenției.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați înainte sau după intervenția chirurgicală.

În unele realizări descrise aici, anticorpii invenției sunt administrați în combinație cu terapia cu radiație.

Terapia cu radiație poate fi administrată utilizând diferite metode, incluzând terapia cu fascicul extern, terapie cu radiație internă, radiație cu implant, radiochirurgie stereotactică, terapie cu radiație sistemică, radioterapie și brahiterapie interstițială permanentă sau temporară. Terapia cu fascicul extern implică terapia cu radiație tridimensională, conformală unde este conceput câmpul de radiație, radiația locală (de exemplu, radiație direcționată spre o țintă sau organ preselectate), sau radiația focalizată. Radiația focalizată poate fi selectată dintre radiochirurgie stereotactică, radiochirurgie stereotactică fracționată sau terapie cu radiație modulată în intensitate. Radiația focalizată poate avea fascicul de particule (proton), accelerator liniar de cobalt-60 (foton) (raze x) ca sursă de radiație (vezi de exemplu WO 2012/177624). „Brahiterapia”, se referă la terapia cu radiație livrată de un material radioactiv închis spațial, inserat în corp la, sau lângă o tumoră sau alt situs de boală proliferativă a țesutului, și include expunerea la izotopi radioactivi (de exemplu, La-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, și izotop radioactivi de Lu). Surse adecvate de radiație pentru utilizare ca condiționant celular includ atât solide cât și lichide. Sursa de radiație poate fi un radionuclid, cum ar fi I-125, I-131, Yb-169, Ir-192 ca sursă solidă, I-125 ca sursă solidă, sau alți radionuclizi care emit fotoni, particule beta, radiație gama, sau alte radiații terapeutice. Materialul radioactiv poate fi de asemenea un fluid făcut din orice soluție de radionuclide, de exemplu, o soluție de I-125 sau I-131, sau un fluid

radioactiv poate fi produse utilizând o suspensie dintr-un fluid adecvat conținând particule mici de radionuclizi solizi, cum ar fi Au-198, Y-90. Radionuclidele pot fi realizate într-un gel sau microsferă radioactive.

În unele realizări, anticorpul invenției sunt administrați în combinație cu decarbazină pentru tratamentul melanomului. Fără a fi legată de nici o teorie particulară, utilizarea combinată a blocării PD-1 și/sau TIM-3 și chimioterapiei se crede că este facilitată de moartea celulei care este o consecință a acțiunii citotoxice a majorității compușilor chimioterapeutici, care poate conduce la niveluri crescute de antigeni tumorali în calea de prezentare a antigenului. Alte terapii de combinație care pot conduce la sinergie cu blocarea PD-1 și/sau TIM-3 prin moartea celulei sunt radiația, chirurgia, și lipsirea de hormoni. Fiecare din aceste protocoale creează o sursă de antigen tumoral în gazdă. Inhibitorii angiogenezei pot fi de asemenea combinați cu blocarea PD-1 și/sau TIM-3. Inhibarea angiogenezei conduce la moartea celulei tumorale care poate hrăni antigenul tumoral în căile gazdei de prezentare a antigenului.

Anticorpul PD-1 monospecific ai invenției pot fi de asemenea utilizați în combinație cu anticorpul bispecific. Anticorpul bispecific pot fi utilizați pentru a ținti doi antigeni separați. De exemplu anticorpul bispecific receptorului anti-Fc/antigenului anti-tumoral (de exemplu, Her-2/neu) au fost utilizați pentru a ținti macrofagele la situsurile de tumoare. Țintirea bispecifică poate activa mai eficient răspunsurile specifice tumorale. Brațul celulei T al acestor respondenți ar fi mărit prin utilizarea blocării PD-1 și/sau TIM-3. Alternativ, antigenul poate fi livrat direct la DC-uri prin utilizarea anticorpilor bispecifici care se leagă la antigenul tumoral și la un marker de suprafață celulară specific celulei dendritice.

Anticorpul invenției pot fi utilizați în forme neconjunctate sau conjunctate la un al doilea agent, de exemplu, un medicament citotoxic, radioizotop, sau o proteină, de exemplu, o proteină toxină sau o proteină virală. Moleculele de anticorp pot fi utilizate pentru a livra o varietate de agenți terapeutici, de exemplu, un radical citotoxic, de exemplu, un medicament terapeutic, un radioizotop, molecule de plante, fungi, sau de origine bacteriană, sau proteine biologice (de exemplu, proteină toxină) sau particule (de exemplu, o particulă virală recombinantă, de exemplu, printr-o proteină de acoperire virală), sau amestecuri ale acestora.

Boli infecțioase

Invenția furnizează de asemenea anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui subiect care a fost expus la o toxină sau patogen particulare cu anticorpul invenției pentru un timp suficient pentru a trata subiectul.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui subiect având o boală infecțioasă, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul invenției către subiectul care are nevoie de aceasta pentru un timp suficient pentru a trata boala infecțioasă.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui subiect având o infecție virală, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul invenției către subiectul care are nevoie de aceasta pentru un timp suficient pentru a trata infecția virală.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui subiect având o infecție bacteriană, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul invenției către subiectul care are nevoie de aceasta pentru un timp suficient pentru a trata infecția bacteriană.

Invenția furnizează de asemenea anticorpul invenției pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui subiect având o infecție fungică, cuprinzând administrarea unei cantități eficiente terapeutic din anticorpul invenției către subiectul care are nevoie de aceasta pentru un timp suficient pentru a trata infecția fungică.

În tratamentul infecției (de exemplu, acută și/sau cronică), administrarea anticorpilor invenției poate fi combinată cu tratamente convenționale în plus față de, sau în locul stimulării apărării imune naturale a gazdei la infecție. Apararea imună naturală a gazdei la infecție include inflamație, febră, apărarea gazdei mediată de anticorp, apărarea gazdei mediată de limfocitele T, incluzând secreția limfokina și celulele T citotoxice (în special în timpul infecției virale), lizarea și posonizarea mediate de complement (fagocitoză facilitată), și fagocitoză. Abilitatea anticorpilor invenției de a reactiva celulele T disfuncționale ar fi utilă pentru a trata infecțiile cronice, în particular cele în care imunitatea mediată de celulă este importantă pentru recuperarea completă.

Similar cu aplicația lor la tumori cum s-a discutat mai sus, anticorpul invenției pot fi utilizați singuri, sau ca un adjuvant, în combinație cu vaccinuri, pentru a stimula răspunsul imun la patogeni, toxine, și auto-antigeni. Exemple de patogeni pentru care această abordare terapeutică poate fi utilă includ patogeni pentru care nu există în prezent nici un vaccin eficient, sau patogeni pentru care vaccinurile convenționale nu sunt complet eficiente. Acestea includ HIV, hepatită (A, B, & C), gripă, herpes, giardia,

malaria, Leishmania, Staphylococcus aureus și Pseudomonas Aeruginosa. Blocările PD-1 și/sau TIM-3 pot fi utile împotriva infecțiilor stabilite de către agenți cum ar fi HIV care a prezentat antigeni alterați în decursul infecțiilor. Acești noi epitopi sunt recunoscuți ca străini la momentul administrării anticorpilor invenției, provocând astfel un răspuns puternic cu celule T care nu este atenuat de semnale negative prin PD-1 sau TIM-3.

Virusuri

Pentru infecțiile care rezultă din cauze virale, anticorpilor invenției pot fi combinați cu terapii standard pentru tratarea infecțiilor virale. Astfel de terapii standard variază depinzând de tipul de virus, deși în aproape toate cazurile, administrarea de ser uman conținând anticorpi (de exemplu, IgA, IgG) specifici virusului poate fi eficientă.

Exemple de virusuri patogene care determină infecții care pot fi tratate cu anticorpilor invenției includ HIV, hepatită (A, B, sau C), virusul herpes (de exemplu, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, și CMV, virusul Epstein Barr), adenovirus, virus gripal, flavivirusuri, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, cornovirus, virus sinctial respirator, virusul oreionului, rotavirus, virusul pojarului, virusul rubeolei, parvovirus, vaccinia virus, virus HTLV, virus dengue, papillomavirus, virus molluscum, poliovirus, virusul turbării, virus JC și virusul encefalitei arbovirale.

În unele realizări, infecția virală este o infecție gripală virală. Infecția gripală poate conduce la febră, tuse, mialgie, durere de cap și stare de rău, care apar adesea în sezoanele epidemice. Gripa este de asemenea asociată cu un număr de tulburări postinfecțioase, cum ar fi encefalită, miopericardită, sindrom Goodpasture, și sindrom Reye. Infecția gripală suprimă de asemenea apărarea antibacteriană pulmonară normală, astfel încât pacienții care se recuperează după gripă au un risc crescut de a dezvolta pneumonie bacteriană. Proteinele gripale de suprafață virală prezintă variație marcată antigenic, care rezultă din mutație și recombinare. Astfel, limfocitele T citolitice sunt vehiculul primar al gazdei pentru eliminarea virusului după infecție. Gripa este clasificată în trei tipuri primare: A, B și C. Gripa A este unică prin aceea că infectează atât oameni cât și multe alte animale (de exemplu, porci, cai, păsări și foci) și este cauza principală a gripei pandemice. O celulă poate fi infectată cu două tulpini de gripă A diferite, genomi ARN segmentați a două tipuri parentale de virus amestecați în timpul replicării pentru a crea un replicant hibrid, conducând la noi tulpini epidemice. Gripa B nu se replică la animale și astfel are mai puțină variație genetică și gripa C are numai un singur serotip.

Cele mai convenționale terapii sunt paliative ale simptomelor care rezultă din infecție, în timp ce răspunsul imun al gazdei elimină de fapt boala. Totuși, anumite tulpini (de exemplu, gripa A) pot cauza boli mai serioase și deces. Gripa A poate fi tratată atât clinic cât și profilactic prin administrarea de inhibitori de amine ciclice amantadine și rimantadine, care inhibă replicarea virală. Totuși, utilitatea clinică a acestor medicamente este limitată din cauza incidenței relativ ridicate a reacțiilor adverse, spectrului lor anti-viral îngust (numai gripa A), și predilecția virusului de a deveni rezistent. Administrarea de anticorp IgG seric la proteinele de suprafață majore ale gripei, hemaglutinină și neuraminidază poate preveni infecția pulmonară, în timp ce IgA mucozal este necesar pentru a preveni infecția tractului respirator superior și traheei. Cel mai eficient tratament curent pentru gripă este vaccinarea cu administrarea virusului inactivat cu formol sau β -propiolactonă.

În unele realizări, infecția este o infecție hepatică, de exemplu, o infecție cu hepatită B sau C.

Virusul hepatitei B (HB-V) este cel mai infecțios patogen cunoscut născut în sânge. Este o cauză majoră a hepatitei acute și cronice și a carcinomului hepatic, precum și a infecțiilor de lungă durată, cronice. După infecție, virusul se replică în hepatocite, care se înmagazinează apoi de asemenea pe suprafața antigenului HBsAg. Detecția nivelurilor excesive de HBsAg în ser este utilizată ca metodă standard pentru diagnosticarea unei infecții cu hepatită B. O infecție acută poate rezolva sau se poate dezvolta într-o infecție persistentă cronică. Tratamentele curente HBV cronică includ α -interferon, care crește expresiade antigen leucocitar uman de clasă I (HLA) pe suprafața hepatocitelor, facilitând prin urmare recunoașterea lor de către limfocitele T citotoxice. Suplimentar, analogii de nucleozidă ganciclovir, famciclovir și lamivudină au prezentat de asemenea o oarecare eficacitate în tratamentul infecției HBV în studiile clinice. Tratamente suplimentare pentru HBV includ α -interferon PEG-ilat, adenfovir, entecavir și telbivudină. În timp ce imunitatea pasivă poate fi conferită prin administrarea parentală a anticorpilor serici anti-HBsAg, vaccinarea HBsAg inactivat sau recombinant conferă de asemenea rezistență la infecție. Anticorpilor invenției pot fi combinați cu tratamente convenționale pentru infecțiile cu hepatită B pentru avantaj terapeutic.

Infecția cu virusul hepatitei C (HC-V) poate conduce la o formă cronică de hepatită, conducând la ciroză. În timp ce simptomele sunt similare cu infecțiile care rezultă din hepatita B, în contrast distinct cu HB-V, gazdele infectate pot fi asimptomatice timp de 10-20 ani. Anticorpilor invenției pot fi administrați ca monoterapie, sau combinați cu standardul de îngrijire pentru infecția cu hepatită C. De exemplu, anticorpilor invenției pot fi administrați cu unul sau mai mulți dintre Sovaldi (sofosbuvir) Olysio (simeprevir), plus ribavirin sau interferon PEG-ilat. Deși regimurile care includ Incivek (telaprevir) sau

Victralis (boceprevir) plus ribavirin și interferon PEG-ilat sunt de asemenea aprobate, ele sunt asociate cu efecte secundare crescute și durate de tratament mai lungi.

Tratamentul convențional pentru infecția HC-V include administrarea unei combinații de α -interferon și ribavirin. O potențială terapie promițătoare pentru infecția HC-V este inhibitorul de protează telaprevir (VX-960). Tratamentele suplimentare includ bavituximab (un anticorp care se leagă la fosfolipida anionică fosfatidilserină într-o manieră dependentă de B2-glicoproteina I, Peregrine Pharmaceuticals), anticorpul proteinei E2 cu înveliș viral anti-HPV (de exemplu, ATL 6865-Ab68+Ab65, XTL Pharmaceuticals) și Civacir® (globulină imună umană anti-HCV policlonală). Anticorpul invenției pot fi combinați cu unul sau mai multe din aceste tratamente pentru infecțiile cu hepatită C pentru avantaj terapeutic. Proteaza, polimeraza și inhibitorii NS5A care pot fi utilizați în combinație cu anticorpul invenției pentru a trata specific infecția cu hepatită C le include pe cele descrise în US 2013/0045202.

Într-o altă realizare, infecția este un virus de pojar. După o incubare de 9-11 zile, gazdele infectate cu virusul de pojar dezvoltă febră, tuse, guturai și conjunctivită. În 1-2 zile, se dezvoltă o eczemă eritematoasă, maculopapulară, care se împrăștie repede pe întregul corp. Deoarece infecție suprimă de asemenea imunitatea celulară, gazda este la un risc mai mare de a dezvolta superinfecții bacteriene, incluzând mediul otitic, pneumonia și encefalomielită postinfecțioasă. Infecția acută este asociată cu morbiditatea și mortalitatea semnificative, în special la adolescenții subnutriți.

Tratamentul pentru pojar include administrarea pasivă de IgG umană grupată, care poate preveni infecția la subiecții neimuni, chiar dacă este dată până la o săptămână după expunere. Totuși, imunizarea anterioară cu virus viu, atenuat este cel mai eficient tratament și previne boala la mai mult de 95% din cei imunizați. Deoarece există un serotip al acestui virus, o singură imunizare sau infecție conduce de obicei la protecția pe viață de o infecție ulterioară.

Într-o mică proporție a gazdelor infectate, pojarul se poate dezvolta în SSPE, care este o tulburare neurologică progresivă cronică care rezultă dintr-o infecție persistentă a sistemului nervos central. SSPE este cauzată de variante clonale ale virusului de pojar cu defecte care interferează cu ansamblul virion și înmugurește. Pentru acești pacienți, ar fi de dorit reactivarea celulelor T cu anticorpul invenției astfel încât să faciliteze eliminarea virală.

Într-o altă realizare, infecția este HIV. HIV atacă celulele CD4⁺, incluzând limfocite T, monocite-macrofage, celule dendritice foliculare și celule Langerhan, și celulele ajutătoare/inductoare CD4⁺ sunt depletate. Ca rezultat, gazda dobândește un defect sever în imunitatea mediată de celule. Infecția cu HIV conduce la SIDA la cel puțin 50% din indivizi, și este transmisă prin contact sexual, administrare de sânge sau produse din sânge infectat, inseminare artificială cu material seminal infectat, expunere la ace sau seringi care conțin sânge și transmiterea de la o mamă infectată la sugar în timpul nașterii.

O gazdă infectată cu HIV poate fi asimptomatică, sau poate dezvolta o boală acută asemănătoare mononucleozei—febră, durere de cap, gât inflamă, stare de rău și eczemă. Simptomele pot progresa la disfuncția imună progresivă, incluzând febră persistentă, transpirări noaptea, pierdere în greutate, diaree neexplicată, eczemă, psoriazis, dermatită seboreică, herpes zoster, candidoză orală și leucoplazie păroasă orală. Infecțiile oportuniste cu paraziți ai gazdei sunt comune la pacienții ale căror infecții se dezvoltă în SIDA.

Tratamentele pentru HIV includ terapii antivirale incluzând analogi de nucleozidă, zidovudină (AST) fie singur sau în combinație cu didanozină sau zalcitabină, dideoxiinosină, dideoxicitidină, lamivudină, stavudină; inhibitori transcripțivi inverși cum ar fi delavirdină, nevirapină, lovirodină, și inhibitori de proteinază cum ar fi sachinavir, ritonavir, indinavir și nelfinavir. Tratamentele pentru HIV includ EDURANT® (rilpivirină). Anticorpul invenției pot fi combinați cu tratamente convenționale pentru infecțiile HIV pentru avantaj terapeutic.

Într-o altă realizare, infecția este o infecție cu citomegalovirus (CMV). Infecția CMV este adesea asociată cu infecția persistentă, latentă și recurentă. CMV infectează și rămâne latentă în monocite și celulele progenitoare granulocite-monocite. Simptomele clinice ale CMV includ simptome asemănătoare mononucleozei (adică, febră, glande umflate, sate de rău), și o tendință de a dezvolta iritații alergice ale pielii la antibiotice. Virusul este transmis prin contact direct. Virusul este înmagazinat în urină, salivă, material seminal și într-o măsură mai mică în alte fluide corporale. Transmiterea poate apare de asemenea de la o mamă infectată la fătul ei sau nou născut și prin transfuzii de sânge și transplanturi de organe. Infecția CMV conduce la deprecierea generală a imunității celulare, caracterizată prin răspunsuri blastogenice alterate la mitogeni nespecifici și antigeni CMV specifici și abilitate citotoxică diminuată.

Tratamentele infecției CMV includ ganciclovir anti-viral, foscarnet și cidovir, dar aceste medicamente sunt de obicei prescrise numai la pacienții imunocompromiși. Anticorpul invenției descrise aici pot fi combinați cu tratamente convenționale pentru infecțiile cu citomegalovirus pentru avantaj terapeutic.

Într-o altă realizare, infecția este infecție cu virusul Epstein-Barr (EBV). EBV poate stabili infecții persistente și latente și în primul rând atacă celulele B. Infecția cu EBV conduce la afecțiunea clinică de mononucleoză infecțioasă, care include febră, inflamația gâtului, adesea cu exudat,

limfadenopatie generalizată și splenomegalie. Hepatita este de asemenea prezentă, care se poate dezvolta în icter.

În timp ce tratamentele tipice pentru infecțiile EBV sunt paliative ale simptomelor, EBV este asociat cu dezvoltarea anumitor cancere cum ar fi limfom Burkitt și cancer nazofaringeal. Astfel, eliminarea infecției virale înainte de a se dezvolta complicații ar fi de un mare beneficiu. Anticorpilor invenției pot fi combinați cu tratamentele convenționale pentru infecțiile cu virusul Epstein-Barr pentru avantaj terapeutic.

Într-o altă realizare, infecția este infecție cu virusul Herpes simplex (HSV). HSV este transmisă prin contact direct cu o gazdă infectată. O infecție directă poate fi asimptomatică, dar conduce de obicei la vezicule care conțin particule infecțioase. Boala se manifestă ca cicluri de perioade active ale bolii, în care leziunile apar și dispar pe măsură ce virusul infectează latent ganglionul nervos pentru focare ulterioare. Leziunile pot fi pe față, organe genitale, ochi și/sau mâini. În unele cazuri, o infecție poate cauza de asemenea encefalită.

Tratamentele pentru infecțiile cu herpes sunt direcționate în primul rând către rezolvarea focarelor simptomatice, și includ medicamente antivirale sistemice cum ar fi: aciclovir (de exemplu, Zovirax®), valaciclovir, famciclovir, penciclovir, și medicații topice cum ar fi docosanol (Abreva®), tromantadină și zilactin. Eliminarea infecțiilor latente de herpes ar fi de mare beneficiu clinic. Anticorpilor invenției pot fi combinați cu tratamentele convenționale pentru infecțiile cu virusul herpes pentru avantaj terapeutic.

Într-o altă realizare, infecția este cu virusul T-limfotropice uman (HTLV-1, HTLV-2). HTLV este transmis prin contact sexual, alăptare la sân sau expunere la sânge contaminat. Virusul activează celulele Th1, conducând la supraproliferarea lor și supraproducția de citokine înrudite cu Th1 (de exemplu, IFN- γ și TNF- α). Acest lucru conduce în schimb la o supresie de limfocite Th2 și reducere a producției de citokine Th2 (de exemplu, IL-4, IL-5, IL-10 și IL-13), determinând o reducere în abilitatea unei gazde infectate de a monta un răspuns imun adecvat la organismele invadatoare necesitând un răspuns dependent de Th2 pentru eliminare (de exemplu, infecții parazite, producție de anticorpi mucozali și umorali).

Infecțiile HTLV conduc la infecții oportuniste conducând la bronșiectazie, dermatită și superinfecții cu Staphylococcus spp. și Strongyloides spp. conducând la moarte din cauza sepsisului polimicrobian. Infecția HTLV poate conduce de asemenea direct la leucemie cu celule T la adult/limfom și boala neuronului motor superior de demielinare progresivă cunoscută ca HAM/TSP. Eliminarea infecțiilor latente HTLV ar fi de mare beneficiu clinic. Anticorpilor invenției pot fi combinați cu tratamentele convenționale pentru infecțiile HTLV pentru avantaj terapeutic.

Într-o altă realizare, infecția este cu virus papiloma uman (HPV). HPV afectează în primul rând cheratinocitele și are loc în două forme: cutanat și genital. Transmiterea se crede că apare prin contact direct și/sau activitate sexuală. Ambele infecții HPV cutanată și genitală pot conduce la negi și infecții latente și uneori la infecții recurente, care sunt controlate de către imunitatea gazdei care controlează simptomele și blochează apariția negilor, dar lasă gazda capabilă să transmită infecția altora.

Infecția cu HPV poate conduce de asemenea la anumite cancere, cum ar fi cancerul cervical, anal, vulvar, penian și orofarinian. Nu există remedii cunoscute pentru infecția HPV, dar tratamentul curent este aplicarea topică de Imichimod, care stimulează sistemul imunitar să atace zona afectată. Eliminarea infecțiilor latente HPV ar fi de mare beneficiu clinic. Anticorpilor invenției pot fi combinați cu tratamentele convenționale pentru infecțiile HPV pentru avantaj terapeutic.

Infecții bacteriene

Unele exemple de bacterii patogene care determină infecții care pot fi tratate cu anticorpi invenției includ sifilis, clamidia, bacteria rickettsială, micobacteria, stafilococi, streptococi, pneumococi, meningococi și conococi, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difterie, salmonela, bacili, holeră, tetanus, botulism, antrax, ciumă, leptospiroză, și bacteria bolii Lyme. Anticorpilor invenției pot fi utilizați în combinație cu modalitățile de tratament existente pentru infecțiile anterior menționate. De exemplu, tratamentele pentru sifilis includ penicilină (de exemplu, penicilină G.), tetraciclină, doxiciclină, ceftriaxonă și azitromicină.

Boala Lyme, cauzată de Borrelia burgdorferi este transmisă la oameni prin mușcăturile de căpușe. Boala se manifestă inițial ca eczemă localizată, urmată de simptome asemănătoare gripei incluzând stare de rău, febră, durere de cap, rigiditatea gâtului și artralgii. Mai târziu manifestările pot include artrită migratoare și poliarticulară, implicare neurologică și cardiacă cu paralizii ale nervului cranian și radiculopatie, miocardită și aritmii. Unele cazuri de boală Lyme devin persistente, conducând la deteriorare ireversibilă analoagă cu sifilisul terțiar. Terapia curentă pentru boala Lyme include în primul rând administrarea de antibiotice. Tulpinile rezistente la antibiotic pot fi tratate cu hidroxichlorochină sau metotrexat. Pacienții refractari la antibiotice cu durere neuropată pot fi tratați cu gabapentin. Minociclină poate fi de ajutor în boala Lyme târzie/cronică cu alte manifestări neurologice sau inflamatorii.

Alte forme de boală Lyme, cum ar fi cele care rezultă din *B. recurrentis*, *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parikeri*, *B. hispanica*, *B. duttonii* și *B. persica*, de asemenea leptospiroze (De exemplu, *L. interrogans*), de obicei se rezolvă spontan în afară de cazul când titrurile de sânge ating concentrații care să determine obstrucția intrahepatică.

5 **Fungi și paraziți**

Unele exemple de fungi patogeni care determină infecții care pot fi tratate cu anticorpii invenției includ *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* și *Histoplasma capsulatum*.

10 Unele exemple de paraziți patogeni care determină infecții tratabile cu anticorpii invenției descrise aici include *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Tripanosoma brucei*, *Tripanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, și *Nippostrongylus brasiliensis*.

15 **Utilizări de diagnoză și truse**

Truse

Invenția furnizează de asemenea o trusă cuprinzând anticorpii antagonistic care se leagă specific la PD-1 al invenției.

20 Invenția furnizează de asemenea o trusă cuprinzând anticorpii PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3 al invenției.

Trusa poate fi utilizată pentru utilizări terapeutice și ca trusă de diagnoză.

Trusa poate fi utilizată pentru a detecta prezența de PD-1, TIM-3, sau PD-1 și TIM-3 într-o mostră biologică.

25 În unele realizări, trusa cuprinde anticorpii invenției descrise aici și reactivi pentru detectarea anticorpului. Trusa poate include unul sau mai multe alte elemente incluzând: instrucțiuni pentru utilizare; alți reactivi, de exemplu, o etichetă, un agent terapeutic, sau un agent util pentru chelație, sau o altfel de cuplare, un anticorp la o etichetă sau agent terapeutic, sau o compoziție radioprotectoare; dispozitive sau alte materiale pentru prepararea anticorpului pentru administrare; purtători acceptabili farmaceutici; și

30 dispozitive sau alte materiale pentru administrare la un subiect.
În unele realizări, trusa cuprinde anticorpii invenției într-un recipient și instrucțiuni pentru utilizarea trusei.

În unele realizări, anticorpii din trusă este etichetat.

35 În unele realizări, trusa cuprinde anticorpii antagonistic care se leagă specific la PD-1 cuprinzând VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56.

În unele realizări, trusa cuprinde anticorpii PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic cuprinzând HC1, LC1, HC2 și LC2 ale

SEQ ID NO: 186, 188, 190 și 193, respectiv;

SEQ ID NO: 186, 188, 191 și 194, respectiv;

40 SEQ ID NO: 186, 188, 192 și 195, respectiv;

SEQ ID NO: 186, 188, 248 și 194, respectiv;

SEQ ID NO: 241, 188, 244, 195, respectiv;

SEQ ID NO: 241, 188, 245, 194, respectiv;

SEQ ID NO: 243, 188, 246, 194, respectiv; sau

45 SEQ ID NO: 243, 188, 247, 195, respectiv.

Metode de detectare a PD-1, TIM-3 sau PD-1 și TIM-3

Invenția furnizează de asemenea o metodă de detectare a PD-1 într-o mostră, cuprinzând obținerea mostrei, punerea în contact a mostrei cu anticorpii antagonistic care se leagă specifică la PD-1 al invenției, și detectarea anticorpului legat la PD-1 în mostră.

50 Invenția furnizează de asemenea o metodă de detectare PD-1 și TIM-3 într-o mostră, cuprinzând obținerea mostrei, punerea în contact a mostrei cu anticorpii PD-1/TIM-3 bispecific antagonistic cuprinzând un prim domeniu de legare specifică la PD-1 și un al doilea domeniu de legare specifică la TIM-3 al invenției, și detectarea anticorpului legat la PD-1 și TIM-3 în mostră.

55 În unele realizări, mostra poate fi derivată din urină, sânge, ser, plasmă, salivă, ascite, celule în circulație, celule tumorale în circulație, celule care nu sunt asociate țesutului (*adică*, celule libere), țesuturi (*de exemplu*, țesut tumoral rezecat chirurgical, biopsii, incluzând aspirare cu ac fin), preparări histologice, și altele asemenea.

Anticorpii invenției legați la PD-1, TIM-3 sau PD-1 și TIM-3 pot fi detectați utilizând metodele cunoscute. Metodele exemplificative includ marcarea directă a anticorpilor utilizând etichete fluorescente sau chemiluminescente, sau radioetichete, sau atașarea la anticorpii invenției a unui radical care este cu ușurință detectabil, cum ar fi etichete de biotină, enzimă sau epitop. Exemple de etichete și radicali sunt

60

ruteniu, ^{111}In -DOTA, acid ^{111}In -dietilentriaminpentaacetic (DTPA), peroxidază din hrean, fosfatază alcalină și beta-galactosidază, poli-histidină (etichetă HIS), coloranți de acridină, coloranți de cianină, coloranți de fluoron, coloranți de oxazin, coloranți de fenantridină, coloranți de rodamină, și coloranți Alexafluor®.

Anticorpul invenției pot fi utilizați într-o varietate de teste pentru a detecta PD-1, TIM-3 sau PD-1 și TIM-3 în mostră. Teste exemplificative sunt analiză de culoare Western, radioimunotest, rezonanță plasmonică de suprafață, imunoprecipitare, dializă de echilibru, imunodifuzie, imunotest de electrochemiluminiscență (ECL), imunohistochimie, sortare celulară activată fluorescent (FACS) sau test ELISA.

Prezenta invenție va fi acum descrisă cu referire la următoarele exemple specifice, nelimitative.

Exemplul 1. Metode generale

Reacție limfocitară mixtă umană purificată (MLR)

A fost utilizată o reacție limfocitară mixtă umană purificată (test MLR) pentru a măsura modificările în producția de citokine indusă prin adăugarea anticorpilor de test la co-culturile de celule T CD4⁺ și celule dendritice.

Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) au fost izolate dintr-un leukopak (Biologic Specialty Corporation) utilizând un gradient Ficoll. Celulele T CD4⁺ au fost apoi proaspăt izolate prin selecție negativă din PBMC-uri utilizând Miltenyi AutoMACS și perle de izolare a celulelor T CD4⁺ per instrucțiunile fabricantului sau au fost cumpărate comercial ca celule T CD4⁺ congelate (Hemacare Corporation). A fost utilizat un donator de celule dendritice (Hemacare Corporation). Post-izolare sau dezghețare, celulele T CD4⁺ și celulele dendritice au fost spălate și resuspendate în mediu de test (mediu RPMI1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% penicilină/streptomycină, IX aminoacizi neesențiali, și IX piruvat de sodiu-Invitrogen). Celulele T CD4⁺ umane purificate au fost diluate până la 1×10^6 celule/mL și însemănțate la 100.000 celule/100 μL /godeu. Celulele dendritice au fost diluate până la $0,1 \times 10^6$ cells/mL și însemănțate la 5.000 celule/50 μL /godeu în plăci cu fundul în formă de U. Anticorpul de test sau anticorpul de control au fost preparați la o concentrație 4X în mediu de test rezultând IX când s-au adăugat 50 μL de anticorp la 150 μL de celule.

S-au adăugat 10-puncte diluții seriale de anticorpi de test sau de control la godeuri la o concentrație finală de: 30, 10, 3,33, 1,11, 0,37, 0,12, 0,04, 0,01, 0,0046 și 0,0015 nM. Celulele T CD4⁺ plus celulele dendritice și celulele dendritice singure au fost incluse ca controale pentru a măsura secreția bazală de citokine. Celulele au fost menținute la 37°C, 5 %CO₂ timp de 5 zile. În ziua 5, 100 μL de supernatant de cultură de țesut a fost îndepărtat din plăcile de cultură și transferat în plăci cu fundul în formă de V. Supernatantul a fost congelat cel puțin peste noapte la -80°C. Producția cumulativă de citokine a fost măsurată în supernatantul de cultură de țesut utilizând plăci 10-plex de citokine umane Th1/Th2 Meso Scale Discovery (MSD) urmând protocolul fabricantului. Pe scurt, plăcile MSD au fost blocate cu 1% blocant B peste noapte la 4°C. Următoarea zi, blocantul a fost îndepărtat și plăcile au fost spălate utilizând spalătorul de placă Biotek 406. A fost preparată și adăugată în duplicat la plăci o curbă standard în 8 puncte. Supernatantul dezghețat de cultură de țesut a fost adăugat la 25 μL /godeu. Plăcile au fost etanșate și agitate viguros timp de 1,5 ore. Fără standarde de îndepărtare sau supernatant, 25 μL de anticorp de detecție au fost adăugați la fiecare godeu. Plăcile au fost etanșate, și agitate viguros timp de 1,5 ore. Plăcile au fost spălate, s-a adăugat tamponul citit și plăci au fost citite utilizând cititorul de placă Meso Scale Discovery.

Concentrațiile de citokine au fost calculate cu software-ul MSD. Concentrația de citokine în mostrele necunoscute este calculată prin compararea semnalului de ieșire necunoscut cu semnalul de ieșire și concentrațiile de citokine cunoscute în curba standard. Concentrațiile calculate au fost încărcate în software-ul Spotfire TIBCO pentru vizualizare. După o inspecție vizuală a datelor, a fost utilizată procedura anormală MAD-mediană cu un prag de 3,5 pentru a identifica și exclude anormalitățile pe datele transformate log. Analiza robustă a concentrației efective jumătate maximală (Robust EC50) a fost efectuată pe fiecare citokină pentru fiecare anticorp.

Test CMV

A fost utilizat un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) pentru a măsura modificările în producție de citokine indusă prin adăugarea de anticorpi de test la culturile de celule mononucleare din sângele periferic (PBMC-uri) cu întregul antigen CMV (pentru anticorpul PD-1) sau cu un grup de 138 de peptide 15-mer care se suprapun prin fosfoproteina 65 kd (pp65) (pentru mAb-urile TIM-3 și mAb-urile bispecifice PD1/TIM-3).

Post-dezghețare, PBMC-urile (Astarte Biologics și Hemcare Corporation) au fost spălate și resuspendate în mediu de test (mediu RPMI1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 1% penicilină/streptomycină, IX aminoacizi neesențiali, și IX piruvat de sodiu-Invitrogen). PBMC-urile au fost diluate la $1,5 \times 10^6$ celule/mL și însemănțate la 150.000 celule/100 μL /godeu. Antigenul CMV (Astarte Biologics) a fost preparat la o concentrație 4X de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ în mediu de test rezultând 0,1 $\mu\text{g/mL}$ când s-

au adăugat 50 μ L de antigen la 100 μ L de celule și 50 μ L de anticorp. Anticorpii au fost preparați la o concentrație 4X în mediu de test rezultând IX când s-au adăugat 50 μ L de anticorp la celule și peptidă.

Diluțiile seriale de anticorpi de test au fost adăugate la godeuri la o concentrație finală între 150 - 0,001 nM. Celulele plus antigenul CMV sau grupul pp65, celulele singure, și controlul cu izotip preparat la o concentrație finală de 50 sau 30 nM au fost incluse ca controale pentru a măsura secreția bazală de citokine. Celulele au fost menținute la 37°C, 5%CO₂ timp de 6 zile. Pentru analiza MSD, în ziua 6, 100 μ L de supernatant de cultură de țesut a fost îndepărtat din plăcile de cultură și transferat în plăci cu fundul în formă de V. Supernatant a fost congelat cel puțin peste noapte la -80°C. Producția cumulativă de citokine a fost măsurată în supernatantul de cultură de țesut utilizând plăci 10-plex de citokine umane Th1/Th2 Meso Scale Discovery (MSD) urmând protocolul fabricantului. Pe scurt, plăcile MSD au fost blocate cu 1% blocant B peste noapte la 4°C. Următoarea zi, blocantul a fost îndepărtat și plăcile au fost spălate utilizând spălătorul de placă Biotek 406. A fost preparată și adăugată în duplicat la plăci o curbă standard în 8 puncte. Supernatantul de cultură de țesut a fost adăugat la 25 μ L/godeu, plăcile au fost etanșate și agitate viguros timp de 1,5 ore. Fără standarde de îndepărtare sau supernatant, 25 μ L de anticorp de detecție au fost adăugați la fiecare godeu. Plăcile au fost etanșate, și agitate viguros timp de 1,5 ore. Plăcile au fost spălate, s-a adăugat tampon de citire și plăcile au fost citite utilizând cititorul de placă Meso Scale Discovery.

Concentrațiile de citokine au fost calculate cu software-ul MSD. Concentrația de citokine în mostrele necunoscute este calculată prin compararea semnalului de ieșire necunoscut cu semnalul de ieșire și concentrațiile de citokine cunoscute în curba standard. Concentrațiile calculate au fost încărcate în software-ul Spotfire TIBCO pentru vizualizare. După o inspecție vizuală a datelor, a fost utilizată o procedură anormală MAD-mediană cu un prag de 3,5 pentru a identifica și exclude anomalitățile pe datele transformate log. Analiza robustă a concentrației efective jumătate maximală (Robust EC₅₀) a fost efectuată pe fiecare citokină pentru fiecare anticorp.

Pentru anticorpii TIM-3 și anticorpii bispecfici PD 1/TIM-3, în ziua 6, după ce supernatantul a fost colectat pentru analiza MSD, celulele au fost spălate o dată cu PBS și ulterior colorate pentru deosebirea viu/mort și următorii markeri ai suprafeței celulare: CD3, CD4, CD8, CD137, PD-1 și TIM-3. Citometria de flux a fost efectuată pe o LSR Fortessa (BD). Datele au fost analizate utilizând software-ul Flow Jo. Celulele CD137+ au fost identificate pe baza metodei Fluorescence Minus One (FMO) pe celulele viabile CD8+ și CD4+ tratate cu CMV.

Pentru experimentele de tratament secvențial, testele de rechemare CMV au fost efectuate ca mai sus cu stimulare cu grupul de peptide pp65 timp de șase zile. În ziua șase, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost restimulate cu grupul pp65 în prezența anticorpilor anti-TIM-3. Douăzeci și patru de ore mai târziu, supernatantul a fost îndepărtat și nivelurile IFN- γ au fost măsurate prin MSD, cum s-a descris mai sus.

Test de inhibare al ligandului PD-1

Conceperea testului de inhibare a ligandului a fost pe bază de MSD (Mescoscale Discovery). O placă MSD a fost acoperită direct cu ligand (cynoPDL1-ECD, huPDL1-ECD sau huPDL2-ECD) și incubată peste noapte la 4°C. Următoarea zi, soluția de acoperire a fost îndepărtată și placa a fost blocată. O concentrație fixată de PD-1 biotinitat (huPD1-ECD) a fost preincubată cu anticorpi sau cu un anticorp de control al izotipului ca control negativ. Depinzând de panoul anticorpilor ce urmează să fie testați, anticorpii au fost testați ca titrații sau la o concentrație fixată. Placa MSD a fost spălată și PD-1 biotinitat/amestecul de anticorpi a fost adăugat la placa MSD acoperită cu ligand. Placa a fost spălată și PD-1 biotinitat legat la ligand a fost detectat cu streptavidină rutenilată. Inhibarea legării PD-1 de către un anticorp a condus la un semnal scăzut în testul MSD. A fost determinată legarea maximală a PD-1 biotinitat în absența inhibitorului și uneori utilizată pentru a normaliza datele la un procentaj de semnal maximal al PD-1 biotinitat. MAb-urile care au fost pozitive pentru inhibarea legării ligandului la o concentrație au fost de asemenea testate în răspunsuri la doză pentru inhibarea diferiților liganzi PD-1.

Legarea celulei Jurkat

Celulele Jurkat au fost stimulate peste noapte cu 20 ng/ml de PHA, recoltate, spălate, și verificate pentru viabilitate. Celulele au fost apoi incubate la 6-10°C timp de 45-60 minute cu diferite concentrații de anticorpi de test, spălate și incubate la 6-10°C timp de 45-60 minute cu IgG anti-uman de capră marcat cu FITC. Celulele au fost spălate și fixate cu BD Citofix, congelate peste noapte și analizate pe un citometru de flux MACSQuant. Procentajul de celule pozitive PD-1 la fiecare concentrație de anticorp a fost reprezentată grafic vs concentrația log a anticorpului și valorile EC₅₀ au fost generate în Prism.

Măsurători de afinitate

MAb-uri PD-1

MAb-urile anti-PD-1 au fost testate pentru afinitatea de legare la huPD1-ECD și cynoPD-1-ECD. Măsurătorile de afinitate utilizând rezonanța plasmonică de suprafață (SPR) au fost efectuate utilizând un sistem ProteOn XPR36. A fost preparată o suprafață biosenzorială prin cuplarea unui amestec

de suprafață de strat polimeric de alginat modificat Fc anti-IgG a unui cip GLC utilizând instrucțiunile fabricantului pentru chimia de cuplare a aminei. MAB-urile de test au fost capturate și interacțiunile lor cu analiții (huPD1-ECD sau cynoPD1-ECD) au fost monitorizate în tampon pe bază de PBS la 25°C. Datele colectate au fost procesate și ajustate la un model de legare Langmuir 1:1. Rezultatul pentru fiecare mAb a fost raportat în format de k_{on} (Pe-rată), k_{off} (rata off) și K_D (constantă de disociere la echilibru).

Test de inhibare al ligandului TIM-3

ELISA concurențiale TIM-3/galectin-9 au fost făcute prin legarea a 1 μg/ml himeră Fc-TIM-3 umană recombinantă (R&D Systems-cat#: 2365-TM-05) în PBS pe godeul unei plăci White Maxisorp cu 96 de godeuri (Nunc). Plăcile au fost spălate și blocate cu StartigBlock T20 (Pierce) și la godeuri s-a adăugat inhibitor la o concentrație de 10 μg/ml. Fără spălare, s-au adăugat 7,5 μg/ml galectin-9 la godeuri și s-au incubat timp de 30 min. S-a adăugat apoi anticorp policlonal anti-galectin-9-anticorp de biotină (R&D Systems) la 0,5 μg/mL și incubat timp de 30 minute. Plăcile au fost spălate și s-a adăugat neutravidină-HRP-conjugată (Pierce) și plăcile au fost incubate timp de 45 minute suplimentare. Plăcile au fost spălate și substratul de chemiluminiscent POD (Roche) a fost adăugat imediat înainte de citirea plăcilor și luminiscenta a fost citită pe un luminometru.

Generarea antigenilor utilizați în studiu

Clonarea, expresia și purificarea antigenilor a fost făcută utilizând metode standard. Diferitele fragmente de proteină au fost exprimate ca etichete de hexahistidină sau proteine de fuziune Fc. Secvențele de aminoacizi ale proteinelor utilizate fără secvențe marcate sunt prezentate în **SEQ ID NO: 1-9,138 și 89**.

PD1 uman cu lungime completă (huPD1); **SEQ ID NO: 1**

PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT
DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPK
AQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLSLVLLVW
VLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDY GELDFQWREKTPEPPVPCV
PEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPE DGHCSWPL

Domeniul extracelular al PD1 uman (huPD1-ECD); **SEQ ID NO: 2**

PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT
DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPK
AQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTL

Macaca fascicularis (cynomolgous, la care se face referire aici ca cyno) PD1 (cPD1); **SEQ ID NO: 3)**

PGWFLESPDRPWNAPTTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQ
TDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTRLNPGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAP
KAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQALVVG VVGGLLSLVLLV
WVLAVICSRAAQGTIEARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDY GELDFQWREKTPEPPAP
CVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPARRGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL

Domeniul extracelular al PD1 de cyno (cPD1-ECD); **SEQ ID NO: 4**

PGWFLESPDRPWNAPTTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQ
TDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRVTRLNPGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAP
KAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQAL

PD-L1 uman cu lungime completă (huPD-L1); **SEQ ID NO: 5**

FTVTVPKDLVYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEED
LKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRIT
VKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTT
NSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNER
Domeniul extracelular al PD-L1 uman (huPDL1-ECD) **SEQ ID NO: 6**
FTVTVPKDLVYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEED
LKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRIT
VKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTT

NSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERT

Domeniul extracelular al PD-L1 de cynomolgus (cynoPDL1-ECD) **SEQ ID NO: 7**

AFTVTVPKDLVVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEE
DLKVQHSNRYRQAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRI
TVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTT
TNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERT
Domeniul extracelular al PD-L2 uman (huPDL2-ECD) SEQ ID NO: 8
LFTVTVPKELYIIHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKVENDTSPHRERATLL
EEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIYGVAWDYKYLTCLKVKASYRKINTHLK
VPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSPANTSHSRTPEGLYQVTSVLRLKPPPG
RNFSCVFWNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPT
Domeniul extracelular al PD1 de soarece (musPD1-ECD) SEQ ID NO: 9
LEVPNGPWRSLTFYPAWLTVSEGANATFTCSLSNWSLMLNWNRLSPSNQTEK
QAAFCNGLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHNMILDTRRNDSGIYLCGAISLHPKAKIE

- 5 ESPGAELVTERILETSTRYPSPSPKPEGRFQ
TIM-3 uman cu lungime completă, **SEQ ID NO: 138**
SEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDV
NYWTSRYWLNQDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKP
AKVTPAPTRQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSR
LANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEIKNLSLISLANL
PPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYVEEPPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP
Domeniul extracelular al TIM-3 uman (huTIM-3-ECD) **SEQ ID NO: 89**
SEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDV
NYWTSRYWLNQDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLVIKP
AKVTPAPTRQRDFTAAFPRLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSR
LANDLRDSGATIR

10 **Exemplul 2. Selecție de anticorpi anti-PD-1 umani din biblioteci de afişare pe bacteriofagi**

- Fab-urile de legare la PD-1 au fost selectate dintre bibliotecile de afişare pe bacteriofagi pIX *de novo* cum s-a descris în Shi și colab., J Mol Biol 397:385-96, 2010, publicația de brevet internațional nr. WO2009/085462 și publicația de brevet S.U.A. nr. US2010/0021477. Pe scurt, bibliotecile au fost generate prin diversificarea eşafodajelor umane unde genele VH ale liniei germinative IGHV1-69*01, IGHV3-23*01, și IGHV5-51*01 au fost recombinate cu minigena IGHJ-4 umană *prin* bucla H3, și genele kapa VL ale liniei germinative umane 012 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01), și B3 (IGKV4-1*01) au fost recombinate cu minigena IGKJ-1 pentru a asambla domeniile VH și VL complete. Pozițiile în regiunile variabile ale lanțului greu și ușor în jurul buclelor H1, H2, L1, L2 și L3 corespunzător pozițiilor identificate a fi frecvent în contact cu proteina și antigenii peptidici au fost alese pentru diversificare. Diversitatea secvenței la pozițiile selectate a fost limitată la reziduuri care apar la fiecare poziție în familiile de gene ale liniei germinative IGHV sau IGLV ale genelor IGHV sau IGLV respective. Diversitatea la bucla H3 a fost generată prin utilizarea buclelor sintetice de dimensiune scurtă până la medie de lungimi 7-14 aminoacizi. Distribuția de aminoacizi la H3 a fost concepută pentru a imita variația observată de aminoacizi în anticorpii umani. Conceperea bibliotecii este detaliată în Shi și colab., (2010) J Mol Biol 397:385-96. Eşafodajele utilizate pentru a genera bibliotecile au fost denumite în conformitate cu originea genei liniei lor germinative VH și VL umane. Cele trei biblioteci ale lanțului greu au fost combinate cu cele patru lanțuri ușoare ale liniei germinative sau combinate cu bibliotecile diversificate ale lanțului ușor pentru a genera 12 combinații VH:VL unice. Aceste biblioteci au fost combinate mai târziu suplimentar pe baza versiunilor de biblioteci pentru a genera biblioteci suplimentare pentru experimente de panoramare împotriva PD-1.

- Bibliotecile au fost panoramate împotriva huPD1-ECD, cynoPD1-ECD, musPD1-ECD, huPD1-Fc și/sau musPD1-Fc. Proteinele recombinante au fost biotilate (bt) și capturate pe perle magnetice de streptavidină (Dynal), apoi expuse la biblioteci Fab pIX *de novo* la o concentrație finală de 100nM sau 10nM. Bacteriofagii nespecifici au fost spălați în PBS-Tween și bacteriofagii legați au fost recuperați prin infecția cu celule *E. coli* MC1061F'. Bacteriofagii au fost amplificați din aceste celule peste noapte și panoramarea a fost repetată pentru un total de trei sau patru runde. După runda finală de biopanoramare, Fab monoclonal a fost selectat pentru legare la huPD1-ECD, huPD1-Fc, musPD1-Fc și/sau cynoPD1-Fc în două formate ELISA. În formatul 1, Fab a fost capturat pe o placă ELISA cu anticorp anti-Fd și diferitele forme de btPD1 au fost adăugate la Fab-ul capturat, urmate de detecția de bt-PD1 cu

Streptavidin:HRP. În formatul 2, diferitele forme de bPD1 au fost capturate pe plăci ELISA cu Streptavidin și Fab-ul secretat a fost adăugat la antigenul capturat, urmat de detecția Fab cu GoatAntiFab'2HRP. Clonele care au demonstrat legare la proteine au fost secvențiate în regiunile variabile ale lanțului greu și ușor.

Fab-urile din selecțiile de PD-1 uman sau PD-1 de șoarece au fost apoi testate pentru reticularitate la cynoPD1-Fc secretată în supernatant de celulă de mamifer. Fab a fost capturat pe o placă ELISA cu anticorp anti-Fd și supernatantul cynoPD1-Fc a fost adăugat la Fab-ul capturat, urmat de detecție de cynoPD1-Fc cu GoatAntiHumanFc:HRP. Pe baza caracteristicilor de legare la cynoPD1-Fc, anticorpul selectat a fost ales pentru caracterizare ulterioară.

Fab-urile selectate au fost alese pentru caracterizare ulterioară și au fost clonate ca IgG2sigma/k. IgG2sigma are funcții efectoare desființate și are substituții V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S în comparație cu IgG2 de tip sălbatic. IgG2sigma este descris în brevetul S.U.A. nr. 8.961.967. Anticorpul a fost evaluat pentru abilitatea lor de a bloca legarea PD-1 uman la PD-L1 de cynomolgus, afinitatea la proteinele PD-1 umane și de cynomolgus, și abilitatea lor de a se lega la celulele care exprimă endogen PD-1 uman (celule Jurkat). Anticorpul a fost ulterior evaluat pentru abilitatea lor de a bloca lagarea PD-L1 uman și PD-L2 uman la huPD1.

Pe baza rezultatelor, au fost aleși câțiva anticorpi pentru maturarea afinității. Caracteristicile anticorpilor selectați aleși pentru maturarea afinității sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7.

mAb	Inhibare ligand; IC ₅₀ (μg/ml)			Legare Jurkat; EC ₅₀ μg/ml	Afinitate SPR ProteOn		
	cynoPD-L1	huPD-L1	huPD-L2		k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	K _D (nM)
PD1B11	0,017-0,018	0,019	0,029	0,03-0,24	4,68E+05	8,96E-03	19,2
PD1B70	0,010-0,021	0,040	0,059	0,69-1,32	1,84E+05	3,04E-02	166
PD1B71	0,014-0,015	0,024	0,035	0,13-0,47	2,31E+05	2,77E-02	120
Hu: uman							
Cyno: cynomolgus							

Exemplul 3. Maturarea afinității anticorpilor anti-PD-1 umani

Anticorpul PD1B70, PD1B71 și PD1B114 (omolog apropiat de PD1B11), au fost maturați de afinitate în format Fab utilizând biblioteci de afișare pe bacteriofagi cu diversitate la pozițiile VL selectate și la HCDR1 și HCDR2. Conceperea bibliotecilor de maturarea afinității pentru fiecare Fab este prezentată în Tabelul 8. Numerotarea reziduurilor este în conformitate cu PD1B114 VH SEQ ID NO: 41 în Tabelul 8.

Tabelul 8.

Diversificarea VH a PD1B114, PD1B70 și PD1B71		
Poziție	Aminoacid părinte	Reziduuri utilizate pentru diversificare
30	S	D, K, S
31	S	D, N, S, T
32	Y	A, D, S, Y
33	A	A, D, G, S, W, Y
35	S	H, N, S
50	G	A, E, G, N, R, T, W, Y
52	I	A, D, I, N, R, S
54	I	E, I, N, S, Y
55	F	E, F, Q, S, Y
57	T	D, N, R, S, T, Y
59	N	E, G, N, Q, R, Y

Diversificarea VL a PD1B114, PD1B70 și PD1B71		
Poziție	Aminoacid părinte	Reziduuri utilizate pentru diversificare
30	S	D, N, R, S
31	S	N, S, T
32	Y	D, N, R, S, Y
49	Y	E, H, K, Y
50	D	D, G, S, W, Y
53	N	D, N, S, T, Y
91	R	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
92	s	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
93	N	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
94	W	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
96	L	F, I, L, N, R, W, Y

Au fost construite bibliotecile și s-au generat bacteriofagi. Bibliotecile de bacteriofagi VH și VL au fost apoi utilizate pentru panoramarea bacteriofagilor împotriva proteinelor recombinante biotilate huPD 1-ECD și cynoPD1-ECD. După panoramarea bacteriofagă, au fost selectate Fab-uri solubile pentru legare la PD-1 atât uman cât și de cyno. Fab-urile selectate au fost clonate ca izotip IgG2sigma și caracterizate pentru legarea lor la celula Jurkat și inhibarea ligandului PD-L1 de cynomolgus la concentrații de 1 µg/ml și 10 µg/ml.

Tabelul 9 prezintă rezultatele caracterizării anticorpilor parentali și maturați de afinitate.

Tabelul 9.

mAb	Inhibarea ligandului la concentrația indicată*		Legare la celula Jurkat; EC ₅₀ (µg/ml)
	1 µg/ml	10 µg/ml	
PD1B11	5%	5%	0,05
PD1B114	8%	13%	0,47
PD1B149	7%	7%	0,08
PD1B160	4%	3%	0,08
PD1B162	7%	6%	0,05
PD1B164	6%	3%	0,06
PD1B183	5%	5%	0,08
PD1B184	4%	4%	0,08
PD1B185	8%	5%	0,09
PD1B187	7%	5%	0,09
PD1B192	5%	5%	0,06
PD1B70	6%	6%	0,69
PD1B175	6%	5%	0,09
PD1B71	6%	9%	0,13
PD1B177	7%	8%	0,05
*valoare indică procentajul de ligand nebloca			

Anticorpii maturați de afinitate au fost evaluați în experimente de afinitate cum s-a descris mai sus utilizând analize SPR ProteOn pentru legare la huPD1-ECD și cynoPD1-ECD. Caracteristicile de legare ale mAb-urilor la PD-1 cyno sunt prezentate în **Tabelul 10** și la PD-1 uman în **Tabelul 11**. STDEV au fost calculate pentru 3 sau mai mult replicare generate pentru proteinele umane și cyno. Dacă au fost calculate mai puțin de 3 replicare, a fost indicat INTERVALUL. INTERVALUL este definit ca valorile scăzute și ridicate pentru replicarele testate. Pentru mostrele din **Tabelul 10** sau **Tabelul 11** fără valoare

indicată în INTERVAL sau STDEV, a fost efectuat doar un experiment. Variantele cu maturarea de afinitate cea mai bună au avut afinități pentru PD-1 uman și de cyno într-un singur digit al intervalului nM după câștiguri de ~4-20 ori în afinitate în comparație cu mAb-urile lor parentale.

Tabelul 10.

Mostră	antigen: PD-1 de cyno					
	k_{on}	STDEV. k_{on}	k_{off}	STDEV. k_{off}	K_D	STDEV. K_D
	(1/Ms)	sau INTERVAL	(1/s)	sau INTERVAL	(nM)	sau INTERVAL
PD1B70	2,10 E+05	(1,99-2,25) E+05	2,58 E-02	(2,45-2,75) E-02	123	109-138
PD1B175	2,14 E+05	(1,98-2,30) E+05	6,40 E-03	(6,06-6,73) E-03	30	26-34
PD1B71	3,04 E+05	2,35 E+04	2,03 E-02	7,27 E-04	66,8	5,68
PD1B177	2,92 E+05	(2,80-3,04) E+05	1,89 E-03	(1,84-1,93) E-03	6,47	6,1-6,9
PD1B114	2,94 E+05	1,69 E+04	2,39 E-02	1,45 E-03	81,5	6,8
PD1B149	3,20 E+05	(3,04-3,36) E+05	3,57 E-03	(3,48-3,65) E-03	11,2	(10,9-11,4)
PD1B160	3,17 E+05	(3,16-3,17) E+05	1,66 E-03	(1,63-1,68) E-03	5,23	5,1-5,3
PD1B162	3,87 E+05	(3,84-3,89) E+05	9,79 E-04	(9,59-9,98) E-04	2,53	2,5-2,6
PD1B164	2,67 E+05	(2,67-2,67) E+05	2,87 E-04	(2,82-2,91) E-04	1,07	1,06-1,09
PD1B11	2,93 E+05	(2,85-3,01) E+05	9,17 E-03	(0,8-1,00) E-02	31,3	(27,7-35,1)
PD1B183	3,20 E+05	(3,04-3,37) E+05	8,39 E-03	(8,01-8,76) E-03	26,3	23,9-28,8
PD1B184	2,38 E+05	(2,08-2,68) E+05	2,74 E-03	(2,55-2,92) E-03	11,5	9,5-14,1
PD1B185	3,11 E+05	(2,80-3,43) E+05	9,47 E-03	(9,38-9,55) E-03	30,5	27,5-34,1
PD1B187	2,94 E+05	(2,20-3,70) E+05	1,57 E-03	(1,28-1,85) E-03	5,32	3,5-8,4
PD1B192	3,07 E+05	(2,90-3,24) E+05	5,04 E-03	(4,86-5,22) E-03	16,4	15,0-18,0

5

Tabelul 11.

Mostră	Antigen: PD-1 uman		
	k_{on}	k_{off}	K_D
	(1/Ms)	(1/s)	(nM)
PD1B70	4,15E+05	4,18E-02	101
PD1B175	4,22E+05	9,72E-03	23
PD1B71	5,48E+05	2,73E-02	49,9
PD1B177	5,15E+05	2,57E-03	5
PD1B114	5,17E+05	2,79E-02	54,1
PD1B149	5,32E+05	6,20E-03	~12*
PD1B160	5,40E+05	3,71E-03	6,87
PD1B162	6,49E+05	3,86E-03	5,95
PD1B164	4,48E+05	1,31E-03	2,92
PD1B11	5,16E+05	8,52E-03	~17*
PD1B183	5,27E+05	8,44E-03	16
PD1B184	4,45E+05	5,09E-03	11,4
PD1B185	5,85E+05	7,65E-03	13,1
PD1B187	5,35E+05	2,78E-03	5,2
PD1B192	5,41E+05	1,17E-02	~228

	Antigen: PD-1 uman		
Mostră	k_{on}	k_{off}	K_D
	(1/Ms)	(1/s)	(nM)
*Valorile nu au trecut criteriile de acceptare ale datelor ($\chi^2 > 20\%$) și au fost prin urmare considerate aproximări.			

Exemplul 4. Variantă combinatorială de producție a mAb-urilor PD-1

După analiza rezultatelor de afinitate, au fost luate în considerare secvențele combinatoriale.

PD1B11 și PD1B114 au secvențe foarte similare. Deoarece PD1B11 a avut aproximativ o afinitate de 3 ori mai strânsă cu PD-1 uman și o afinitate de 2 ori mai strânsă cu PD-1 de cyno în comparație cu PD1B114, au fost produși anticorpi având combinații de diferite regiuni CDR ale acestora. HCDR3 a PD1B11 a fost plasată în PD1B164 și PD1B162 (variante maturate de afinitate ale PD1B114), utilizând mutageneza direcționată la situs în timp ce HCDR2 a PD1B164 (variantă maturată de afinitate a PD1B114) a fost plasată în PD1B187 (varianta maturată de afinitate a PD1B11). Lanțurile grele rezultate au fost împerecheate cu lanțurile ușoare parentale conducând la noi anticorpi PD1B194, PD1B195 și respectiv PD1B196.

PD1B175 și PD1B177 au conținut ambii lanțuri ușor parental chiar dacă anticorpii au fost generați utilizând biblioteci VL diversificate în timpul maturării de afinitate. Într-o încercare de a crește afinitățile anticorpului, lanțul greu PD1B175 a fost împerecheat cu lanțurile ușoare maturate de afinitate PD1L185 sau PD1L187, și lanțul greu PD1B177 a fost împerecheat cu lanțurile ușoare maturate de afinitate PD1L186, PD1L168 sau PD1L190, conducând la anticorpii PD1B197, PD1B198, PD1B199, PD1B200 și PD1B201. Împerecherea VH și VL ale anticorpilor este prezentată în Tabelul 20 din Exemplul 5.

Secvențele HCDR, LCDR, VH și VL ale acestor anticorpi sunt prezentate în **Tabelele 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21 și 22 din Exemplul 5**. Anticorpii au fost clonați ca mAb-uri IgG2sigma/k și exprimați tranzient în celule expi HEK293 pentru măsurători de afinitate.

Afinitățile anticorpilor rezultați au fost determinate cum s-a descris mai sus. **Tabelul 12** prezintă afinitățile măsurate ale variantelor de mAb-uri combinatoriale față de PD-1 de cyno și **Tabelul 13** prezintă afinitățile față de PD-1 uman. STDEV au fost calculate pentru 3 sau mai multe replicare generate pentru proteinele umane și de cyno. Dacă au fost calculate mai puțin de 3 replicare, este indicat INTERVALUL. INTERVALUL este definit ca valori scăzute și ridicate pentru replicarele testate. Pentru mostrele fără INTERVAL sau STDEV, a fost efectuat doar un experiment.

Tabelul 12.

Mostră	Legare la PD-1 de cyno					
	k_{on}	STDEV. k_{on}	k_{off}	STDEV. k_{off}	K_D	STDEV. K_D
	(1/Ms)	sau INTERVAL	(1/s)	sau INTERVAL	(nM)	sau INTERVAL
PD1B70 (Părinte)	2,50E+05	(2,25-2,74) E+05	2,22 E-02	(2,18-2,26) E-02	88,98	(79,6-100)
PD1B197	2,75E+05	1,27 E+04	1,26 E-03	4,04 E-05	4,6	0,3
PD1B198	3,72E+05	1,61 E+04	4,16 E-03	9,29 E-05	11,18	0,54
PD1B11 (Părinte)	3,50E+05	(3,49-3,50) E+05	9,42 E-03	(9,38-9,46) E-03	26,95	(26,8-27,1)
PD1B194	3,22E+05	2,86 E+04	1,93 E-04	5,86E-06	0,6	0,06
PD1B195	4,32E+05	(4,30-4,34) E+05	4,08 E-04	(3,96-4,19) E-04	0,94	(0,91-0,97)
PD1B196	3,03E+05	6,66 E+03	1,76 E-04	9,85 E-06	0,58	0,03
PD1B71 (Părinte)	3,77E+05	(3,37-4,17) E+05	1,96 E-02	(1,85-2,07) E-02	51,99	(44,4-61,4)
PD1B199	3,40E+05	7,94 E+03	1,77 E-04	1,55 E-05	0,52	0,05
PD1B200	3,80E+05	2,21 E+04	4,22 E-04	1,99 E-05	1,11	0,08
PD1B201	3,05E+05	1,80 E+04	2,93 E-04	2,35 E-05	0,96	0,1

Tabelul 13.

Mostră	Legare la PD-1 uman					
	k_{on}	STDEV. k_{on}	k_{off}	STDEV. k_{off}	K_D	STDEV. K_D
	(1/Ms)	sau INTERVAL	(1/s)	sau INTERVAL	(nM)	sau INTERVAL
PD1B70 (Părinte)	7,69 E+05	(7,37-8,00) E+05	3,49 E-02	(3,41-3,56) E-02	45,35	(42,6-43,8)
PD1B197	6,58 E+05	2,26 E+04	3,24 E-03	1,74 E-04	4,9	0,3
PD1B198	8,95 E+05	6,44 E+04	9,34 E-03	9,90 E-04	10,43	1,34
PD1B11 (Părinte)	9,33 E+05	(8,84-9,82) E+05	9,05 E-03	(8,67-9,43) E-03	9,7	(9,6-9,81)
PD1B194	8,97 E+05	1,45 E+05	9,60 E-04	2,78 E-05	1,07	0,18
PD1B195	1,23 E+06	1,79 E+05	1,52 E-03	6,51 E-05	1,23	0,19
PD1B196	8,83 E+05	6,39E+04	3,66 E-04	2,01E-05	0,41	0,04
PD1B71 (Părinte)	9,55 E+05	(9,33-9,76) E+05	2,25 E-02	(2,19-2,30) E-02	23,52	(22,4-24,7)
PD1B199	9,33 E+05	6,92 E+04	5,64 E-04	1,98 E-05	0,6	0,05
PD1B200	1,05 E+06	1,40 E+05	1,22 E-03	3,21 E-05	1,17	0,16
PD1B201	8,58 E+05	8,22 E+04	9,57 E-04	3,06 E-05	1,12	0,11

Exemplul 5. Caracterizarea structurală a anticorpilor anti-PD1 derivați din biblioteci de afişare pe bacteriofagi

Secvențele ADNc și translațiile de aminoacizi ale anticorpilor au fost obținute utilizând tehnici standard prin generarea anticorpilor utilizând diferite campanii. După determinarea secvenței de polipeptidă, unele ADNc-uri ale anticorpului care codifică regiunile variabile sau anticorpii cu lungime completă au fost optimizate codonic utilizând metode standard pentru expresie la scară extinsă.

Tabelul 14 prezintă secvențe HCDR1 ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 15 prezintă secvențe HCDR2 ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 16 prezintă secvențe HCDR3 ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 17 prezintă secvențe LCDR1 ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 18 prezintă secvențe LCDR2 ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 19 prezintă secvențe LCDR3 ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 20 prezintă împerecherea VH și VL a anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 21 prezintă secvențe VH ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 22 prezintă secvențe VL ale anticorpilor PD-1 selectați.

Tabelul 14.

Anticorp	HCDR1					
	Secvență					SEQ ID NO:
PD1B114	S	Y	A	I	S	10
PD1B149	S	Y	A	I	S	10
PD1B160	S	Y	A	I	S	10
PD1B162	S	Y	A	I	S	10
PD1B164	S	Y	A	I	S	10
PD1B11	S	Y	A	I	S	10
PD1B183	S	Y	A	I	S	10
PD1B184	S	Y	A	I	S	10
PD1B185	S	Y	A	I	S	10
PD1B187	S	Y	A	I	S	10
PD1B192	S	Y	A	I	S	10

Anticorp	HCDR1					
	Secvență					SEQ ID NO:
PD1B71	S	Y	A	I	S	10
PD1B177	D	Y	V	I	s	11
PD1B70	S	Y	A	I	S	10
PD1B175	S	Y	V	I	H	12
PD1B194	S	Y	A	I	S	10
PD1B195	S	Y	A	I	S	10
PD1B196	S	Y	A	I	S	10
PD1B197	S	Y	V	I	H	12
PD1B198	S	Y	V	I	H	12
PD1B199	D	Y	V	I	S	11
PD1B200	D	Y	V	I	s	11
PD1B201	D	Y	V	I	s	11

Tabelul 15.

Anticorp	HCDR2																	
	Secvență															SEQ ID NO:		
PD1B114	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B149	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B160	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B162	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B164	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B11	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B183	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B184	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B185	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B187	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B192	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B71	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B177	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
PD1B70	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B175	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B194	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B195	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B196	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B197	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B198	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B199	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
PD1B200	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
PD1B201	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15

Tabelul 16.

Anticorp	HCDR3														
	Secvență														SEQ ID NO:
PD1B114	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16
PD1B149	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16
PD1B160	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16
PD1B162	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16
PD1B164	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16
PD1B11	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B183	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B184	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B185	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B187	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B192	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B71	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y				18
PD1B177	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y				18
PD1B70	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y				19
PD1B175	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y				19
PD1B194	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B195	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B196	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17
PD1B197	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y				19
PD1B198	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y				19
PD1B199	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y				18
PD1B200	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y				18
PD1B201	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y				18

5 Tabelul 17.

Anticorp	LCDR1											
	Secvență											SEQ ID NO:
PD1B114	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B149	R	A	S	Q	s	V	R	N	Y	L	A	21
PD1B160	R	A	S	Q	s	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B162	R	A	S	Q	s	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B164	R	A	S	Q	s	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B11	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B183	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B184	R	A	S	Q	s	V	R	N	Y	L	A	21
PD1B185	R	A	S	Q	s	V	R	N	Y	L	A	21
PD1B187	R	A	S	Q	s	V	R	S	Y	L	A	23

Anticorp	LCDR1											
	Secvență											SEQ ID NO:
PD1B192	R	A	S	Q	s	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B71	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B177	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B70	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B175	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B194	R	A	S	Q	s	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B195	R	A	S	Q	s	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B196	R	A	S	Q	s	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B197	R	A	S	Q	s	V	s	N	Y	L	A	24
PD1B198	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B199	R	A	S	Q	s	V	s	s	Y	L	A	20
PD1B200	R	A	S	Q	s	V	D	N	Y	L	A	25
PD1B201	R	A	S	Q	s	V	s	N	Y	L	A	24

Tabelul 18.

Anticorp	LCDR2							
	Secvență							SEQ ID NO:
PD1B114	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B149	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B160	D	A	S	D	R	A	T	27
PD1B162	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B164	D	A	S	Y	R	A	T	28
PD1B11	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B183	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B184	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B185	D	A	S	D	R	A	T	27
PD1B187	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B192	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B71	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B177	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B70	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B175	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B194	D	A	S	Y	R	A	T	28
PD1B195	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B196	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B197	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B198	D	A	S	S	R	A	T	29
PD1B199	D	A	S	T	R	A	T	30
PD1B200	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B201	D	A	S	N	R	A	T	26

Tabelul 19.

Anticorp	LCDR3									
	Secvență									SEQ ID NO:
PD1B114	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31
PD1B149	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32
PD1B160	Q	Q	R	G	N	W	P	L	T	33
PD1B162	Q	Q	R	E	Y	W	P	L	T	34
PD1B164	Q	Q	R	D	Y	W	P	L	T	35
PD1B11	Q	Q	R	s	N	W	P	L	T	31
PD1B183	Q	Q	R	G	Y	W	P	L	T	36
PD1B184	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32
PD1B185	Q	Q	R	W	N	W	P	L	T	37
PD1B187	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32
PD1B192	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32
PD1B71	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31
PD1B177	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31
PD1B70	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31
PD1B175	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31
PD1B194	Q	Q	R	D	Y	W	P	L	T	35
PD1B195	Q	Q	R	E	Y	W	P	L	T	34
PD1B196	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32
PD1B197	Q	Q	R	A	Y	W	P	L	T	38
PD1B198	Q	Q	R	A	E	W	P	L	T	39
PD1B199	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32
PD1B200	Q	Q	R	S	A	W	P	L	T	40
PD1B201	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32

Tabelul 20.

5

Anticorp	ID peptidă VH	SEQ ID NO VH:	ID peptidă VL	SEQ ID NO VL:
PD1B114	PD1H24	41	PH9L3	49
PD1B149	PD1H24	41	PD1L128	50
PD1B160	PD1H131	42	PD1L101	51
PD1B162	PD1H131	42	PD1L67	52
PD1B164	PD1H131	42	PD1L71	53
PD1B11	PD1H3	43	PH9L3	49
PD1B183	PD1H3	43	PD1L109	54
PD1B184	PD1H3	43	PD1L128	50
PD1B185	PD1H3	43	PD1L132	55
PD1B187	PD1H3	43	PD1L148	56
PD1B192	PD1H3	43	PD1L133	57

Anticorp	ID peptidă VH	SEQ ID NO VH:	ID peptidă VL	SEQ ID NO VL:
PD1B71	PD1H108	44	PH9L3	49
PD1B177	PD1H164	45	PH9L3	49
PD1B70	PD1H107	46	PH9L3	49
PD1B175	PD1H163	47	PH9L3	49
PD1B194	PD1H170	48	PD1L71	53
PD1B195	PD1H170	48	PD1L67	52
PD1B196	PD1H170	48	PD1L148	56
PD1B197	PD1H163	47	PD1L185	58
PD1B198	PD1H163	47	PD1L187	59
PD1B199	PD1H164	45	PD1L86	60
PD1B200	PD1H164	45	PD1L168	61
PD1B201	PD1H164	45	PD1L190	62

Tabelul 21.

ID peptidă VH	SEQ ID NO VH:	Secvență VH
PD1H24	41	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDNAVYYCARPGLAAAYDTGNLDYWGQGT LVTVSS
PD1H131	42	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFDNTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDNAVYYCARPGLAAAYDTGNLDYWGQGT LVTVSS
PD1H3	43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDNAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGT LVTVSS
PD1H108	44	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDNAVYYCARGTLDRTGHLDYWGQGT LVT
		VSS
PD1H164	45	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYVISWVRQ APGQGLEWMGGIPIYGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDNAVYYCARGTLDRTGHLDYWGQGT LVT
		VSS
PD1H107	46	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDNAVYYCARGYVRATGMLDYWGQGT LVT
		TVSS

ID peptidă VH	SEQ ID NO VH:	Secvență VH
PD1H163	47	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFKSYVIHWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARGYVRATGMLDYWGQGT LTVSS
PD1H170	48	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVRQ APGQGLEWMGGIPIFDTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGT LTVSS

Tabelul 22.

ID peptidă VL	SEQ ID NO VL:	Secvență VL
PH9L3	49	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRNWPLTFGQGTKVEIK
PD1L128	50	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRNILAWYQQKPG QAPRLLIHDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK
PD1L101	51	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPG QAPRLLIKDASDRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRGNWPLTFGQGTKVEIK
PD1L67	52	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK
PD1L71	53	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASYRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRDYWPLTFGQGTKVEIK
PD1L109	54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIKDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRGYWPLTFGQGTKVEIK
PD1L132	55	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRNILAWYQQKPG QAPRLLIYDASDRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRWNWPLTFGQGTKVEIK
PD1L148	56	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK
PD1L133	57	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPG QAPRLLIHDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFA VYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIK

ID peptidă VL	SEQ ID NO	Secvență VL
PD1L185	58	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRAYWPLTFGQGGTKVEIK
PD1L187	59	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIEDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRAEWPLTFGQGGTKVEIK
PD1L186	60	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIHDASTRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRNYWPLTFGQGGTKVEIK
PD1L168	61	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPG QAPRLLIHDAENRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRSAWPLTFGQGGTKVEIK
PD1L190	62	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRNYWPLTFGQGGTKVEIK

Toți anticorpii anti-PD-1 au fost identificați ca având cadrele VH1-69 (SEQ ID NO: 170) și IGKV3-11 (L6) (SEQ ID NO: 171).

SEQ ID NO: 170

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFS SYAIS WVRQAPGQGLEWMG

5

GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

SEQ ID NO: 171

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT

GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNWP

Exemplul 6. Generarea și caracterizarea anticorpilor PD-1 la șoareci

- BALB/c au fost imunizați intraperitoneal cu huPD1-ECD și evaluați pentru titruri IgG specifice.
- 10 Odată ce s-au obținut suficiente titruri, splenocitele au fost izolate și fuzionate cu celulele FO. Hibridoamele rezultate au fost placcate în plăci cu 96 de godeuri și cultivate timp de 10 zile. Au fost identificate clonele specifice antigenului prin captură standard ELISA pentru legare la huPD1-ECD. Hibridoamele PD-1-specifice umane au fost testate suplimentar pentru afinitatea lor față de PD-1 uman și de cyno, legarea la celulele Jurkat și inhibarea PD-L1 de cyno. Pe baza rezultatelor, clona PD1B28 a fost
- 15 selectată pentru umanizare utilizând adaptarea cadrului.

- Procedeul de adaptare al cadrului a fost făcut cum s-a descris în mod esențial în publicația de brevet S.U.A. nr. 2009/0118127 și Fransson și colab., (2010) J Mol Biol 398:214-231. Pe scurt, secvențele lanțurilor grele și ușoare au fost comparate cu secvențele liniei germinative umane (numai alelele „01” începând cu 01 oct. 2007) utilizând căutarea BLAST împotriva bazei de date IMGT (Kaas, și colab., (2004) Nucl Acid Res 32, D208-D210; Lefranc și colab., (2005) Nucl Acid Res 33, D593-D597).
- 20 Din acest set de gene ale liniei germinative umane, genele redundante (100% identice la nivel de aminoacizi) și cele cu reziduuri de cisteină neîmperecheate au fost îndepărtate. Genele liniei germinative umane rămase care se potrivesc cel mai bine în ambele regiuni cadru și CDR au fost alese ca, cadre umane acceptoare. Câteva cadre umane ale liniei germinative VL și VH au fost selectate pe baza
- 25 omologiei globale de secvență și a lungimilor CDR precum și a similarității CDR. FR-4 a fost selectat pe baza similarității de secvență a genelor liniei germinative IGHJ/IGJK. Apoi, regiunile CDR ale PD1B28 au fost transferate în cadre umane acceptoare selectate pentru a genera variante HFA, cu excepția regiunii corespunzătoare HCDR1 a V_H. Pentru această regiune o combinație de CDR și HV, sau o HCDR2 mai scurtă (la care se face referire ca Kabat-7, vezi publicația de brevet S.U.A. nr. 2009/0118127) a fost
- 30 transferată din anticorpusul non-uman în FR-urile umane deoarece reziduurile HCDR2 rămase nu au fost găsite în contact în complexii antigen-anticorp ai structurilor cunoscute (Almagro, (2004) J Mol Recognit. 17:132). Mutațiile inverse au fost introduse în anumite poziții reziduale în anticorpii umanizați.

Mutații inverse PD1B131: VH: V37I_Q39L_W47S_R98S, VL: Y49K. PD1B132: VHW47S_R98S, VL: Y49K (numerotarea reziduurilor în conformitate cu Chotia). Anticorpul selectat a fost exprimat ca IgG2sigma/k. Anticorpul rezultat a fost caracterizat pentru legarea sa la PD-1 recombinant și PD-1 exprimat pe celule (celule Jurkat), și inhibarea ligandului lor (PD-L1 de cyno și PD-L1 uman). Caracteristicile anticorpilor umanizați selectați sunt prezentate în **Tabelul 23**. Secvențele VH și VL ale anticorpilor generați sunt prezentate în **Tabelul 24** și respectiv **Tabelul 25**.

Tabelul 23.

mAb	Legarea celulei Jurkat față de PD1B28	Afinitate PD-1 uman			Inhibare PD-L1, IC ₅₀ (ng/ml)	
		k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	K _D (pM)	PD-L1 uman	PD-L1 de cyno
PD1B28	100%	9,70 E+05	1,18 E-04	122	67	96
PD1B131	100%	8,27 E+05	1,05 E-04	127	79	96
PD1B132	100%	9,14 E+05	8,80 E-05	96	55	79

10 **Tabelul 24.**

mAb	ID VH	ID VL	Secvență VH	SEQ ID NO VH:
PD1B131	PD1H130	PD1L62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFAFSRYDMSWIRLAPGK GLESVAYISGGGANTYYLDNV KGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCASPYLSYFDVW GQGTLVTVSS	63
PD1B132	PD1H129	PD1L62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFAFSRYDMSWVRQAPGK GLESVAYISGGGANTYYLDNV KGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCASPYLSYFDVW GQGTLVTVSS	64

Tabelul 25.

mAb	ID VH	ID VL	Secvență VL	SEQ ID NO VL:
PD1B131	PD1H130	PD1L62	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSLSDYLHWYQQKPGQAP RLLIKSASQISGIPARFSGSGSG TEFTLTISLQSEDAVYYCQNG HSFPYTFGQGTKLEIK	65
PD1B132	PD1H129	PD1L62	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSLSDYLHWYQQKPGQAP RLLIKSASQISGIPARFSGSGSG TEFTLTISLQSEDAVYYCQNG HSFPYTFGQGTKLEIK	65

Secvențele CDR ale PD1B131 și PD1B132 sunt prezentate mai jos:

HCDR1 (SEQ ID NO: 66)

RYDMS

HCDR2 (SEQ ID NO: 67)

5 YISGGGANTYYLDNVKG

HCDR3 (SEQ ID NO: 68)

PYLSYFDV

LCDR1 (SEQ ID NO: 69)

RASQSLSDYLH

10 LCDR2 (SEQ ID NO: 70)

SASQSIG

LCDR3 (SEQ ID NO: 71)

QNGHSFPYT

Exemplul 7. Efectul comutării izotipului asupra proprietăților anticorpului anti-PD-1

15 Regiunile variabile ale anticorpilor PD1B196 și PD1B199 (ale izotipului IgG2sigma/κ) au fost clonate ca iztipuri IgG4 S228P și regiuni variabile din anticorpul PD1B132 (al IgG2) în izotipul IgG2sigma pentru a evalua diferențele posibile în funcționalitate și dezvoltare.

Anticorpii au fost denumiți PD1B244 (VH/VL PD1B196 pe IgG4 S228P) PD1B245 (VH/VL PD1B199 pe IgG4 S228P) și PD1B243 (VH/VL PD1B132 pe IgG2sigma).

20 Comutarea izotipului nu a avut nici un efect consistent asupra proprietăților anticorpului deși, pentru unii anticorpi, unele modificări în valorile EC₅₀ au fost văzute în testul CMV.

Exemplificativei mai jos sunt secvențele de aminoacizi ale lanțului greu și lanțului ușor ale diferiților anticorpi. **Tabelul 26** prezintă rezumatul SEQ ID NO ale VH, VL, lanțului greu și lanțului ușor: pentru anticorpii selectați.

25

Tabelul 26.

Anticorp	ID peptidă VH	SEQ ID NO VH:	ID peptidă VL	SEQ ID NO VL:	SEQ ID NO HC:	SEQ ID NO LC:
PD1B114	PD1H24	41	PH9L3	49	212	213
PD1B149	PD1H24	41	PD1L128	50	214	215
PD1B160	PD1H131	42	PD1L101	51	216	217
PD1B162	PD1H131	42	PD1L67	52	218	219
PD1B164	PD1H131	42	PD1L71	53	220	221
PD1B183	PD1H3	43	PD1L109	54	222	223
PD1B184	PD1H3	43	PD1L128	50	224	225
PD1B185	PD1H3	43	PD1L132	55	226	227
PD1B192	PD1H3	43	PD1L133	57	228	229
PD1B243	PD1H129	64	PD1L62	65	74	75
PD1B244	PD1H170	48	PD1L148	56	72	73
PD1B245	PD1H164	45	PD1L86	60	76	77

SEQ ID NO: 72 HC al PD1B244

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ
 KSLSLSLGK

SEQ ID NO: 73 LC al PD1B244

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 74 HC al PD1B243

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLESVAYISGG
 GANTYYLDNVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYSYFDVWG
 5 QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
 SLGK

SEQ ID NO: 75 LC al PD1B243

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLLIKASQSISG
 IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNGHSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 76 HC al PD1B245

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSDYVISWVRQAPGQGLEWMGGIPIY
 GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTLDRTHLDY
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK
 10 SLSLSLGLK

SEQ ID NO: 77 LC al PD1B245

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDASTRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 212 HC al PD1B114

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGN
LDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK
TVERKCCVECPPCAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 213 LC al PD1B114

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 **SEQ ID NO 214 HC al PD1B149**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGN
LDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK
TVERKCCVECPPCAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 215 LC al PD1B149

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRN YLAWYQQKPGQAPRLLIHDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 216 HC al PD1B160

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGN
LDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK
TVERKCCVECPPCAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 217 LC al PD1B160

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPGQAPRLLIKDASDRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRGNWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 218 HC al PD1B162

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGN
 LDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDK
 TVERKCCVECPPCAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 219 LC al PD1B162

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQREYWPLTFGQGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 220 HC al PD1B164

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGN
 LDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDK
 TVERKCCVECPPCAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 221 LC al PD1B164

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASYRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRDYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 222 HC al PD1B183

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
 DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKT
 VERKCCVECPPCAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQ
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 LPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 223 LC al PD1B183

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIKDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRGYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 224 HC al PD1B184

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT
VERKCCVECPGPCAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 225 LC al PD1B184

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRNILAWYQQKPGQAPRLIHDAENRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

5 **SEQ ID NO: 226 HC al PD1B185**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT
VERKCCVECPGPCAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 227 LC al PD1B185

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRNILAWYQQKPGQAPRLIYDASDRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRNWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 228 HC al PD1B192

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKT
VERKCCVECPGPCAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

10 **SEQ ID NO: 229 LC sau PD1B192**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPGQAPRLIHDAENRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Exemplul 8. Caracterizarea anticorpilor PD-1 în teste pe bază de celule

- 15 Anticorpii selectați au fost caracterizați în teste MLR și CMV utilizând protocoalele descrise în
Exemplul 1. Valorile EC₅₀ pentru inducerea IFN- γ din testele MLR și CMV sunt prezentate în **Tabelul**

27. În cele mai multe cazuri, anticorpii anti-PD-1 au prezentat o creștere dependentă de doză în nivelurile IFN- γ în ambele teste MLR și CMV.

Tabelul 27.

Origine	mAb	EC ₅₀ MLR, nM	EC ₅₀ CMV, nM
Afișare pe bacteriofagi	PD1B3	0,29	0,06
	PD1B91	0,05	0,03
	PD1B194	NT	NC
	PD1B195	NT	1,64
	PD1B196	0,14	0,31
	PD1B199	0,63	NC
	PD1B200	NT	3,81
	PD1B201	NT	2,60
	PD1B244	0,08	0,03
HFA	PD1B132	NT	0,07
	PD1B243	0,07	0,02
		NT: netestat	
		NC: fără convergență	
		HFA: adaptare cadru uman	

În plus față de IFN- γ , nivelurile secretate de citokine suplimentare au fost de asemenea afectate de blocarea PD-1 în cele două teste. După stimularea CMV, anticorpii anti-PD-1 au condus la o inducere dependentă de doză a TNF- α și IL-4, în timp ce în testul MLR ei au crescut nivelurile de TNF- α și IL-2.

Exemplul 9. Generare de anticorpi anti-TIM-3 umani utilizând biblioteci de afișare pe bacteriofagi

Bibliotecile Fab pIX *de novo* descrise în Exemplul 2 au fost panoramate împotriva domeniului extracelular al proteinei de fuziune TIM-3-Fc umană recombinantă (R&D Systems, #2365-TM; reziduurile Ser22-Arg200 ale TIM-e cu lungime completă) (huTIM-3-Fc).

Proteina recombinantă a fost biotinitată (bt) și capturată pe perle magnetice de streptavidină (Dyna), apoi expusă la bibliotecile Fab pIX *de novo* la o concentrație finală de 100nM. Bacteriofagii nespecifici au fost spălați în PBS-Tween și bacteriofagii legați au fost recuperați prin infecție cu celule E.coli MC1061F'. Bacteriofagii au fost amplificați din aceste celule peste noapte și panoramarea a fost repetată pentru un total de trei runde. După runda finală de biopanoramare, Fab-ul monoclonal a fost selectat pentru legare la TIM-3-Fc uman biotinitat capturat pe plăci ELISA cu Streptavidină și Fab-ul secretat a fost adăugat la antigenul capturat, urmat de detecție Fab-ului cu kapa:HRP uman anti capră. Anticorpii selectați au fost exprimați și clonați pe diferite izotipuri IgG cum s-a indicat mai jos, și caracterizați mai departe.

Exemplul 10. Generare de anticorpi anti-TIM-3 la șoareci

Șoarecii balb/c au fost imunizați cu proteină de fuziune TIM-3-Fc umană recombinantă (R&D Systems, catalog #2365-TM) în decursul a 18 zile. Splinele au fost recoltate, și o populație îmbogățită de celule B a fost fuzionată cu celule FO de mielom de șoarece pentru a genera hibridoame care secretă mAb-uri. Supernatanții hibridomului au fost selectați pentru legare prin ELISA la proteina TIM-3-Fc și la o Fc umană IgG1 nerelevantă. Supernatanții specifici TIM-3 au fost apoi testați pentru abilitatea pentru a se lega la TIM-3 care exprimă celulele THP-1.

V-genele HC și LC mAb-urilor selectați au fost clonate din hibridoame pozitive TIM-3 utilizând tehnici de biologie moleculară standard (RT-PCR urmată de ligarea fragmentului PCR în vectori de expresie plasmidică). mAb-urile au fost exprimate recombinant, și ELISA a fost repetată pentru a confirma legarea specifică la TIM-3. Modelele moleculare pentru secvențele de anticorp murin ce urmează să fie adaptate cadrului uman au fost construite utilizând MOE (CCG, Montreal) și inspectate vizual. Au fost identificate potențialele poziții problemă care ar putea influența legarea la antigen, împachetarea VL/VH și/sau reziduurile miezului care ar putea afecta stabilitatea domeniului. Pentru ambele VL și VH, multiple cadre umane au fost propuse cu sau fără mutații inverse la secvențele cadru de șoarece dacă au fost identificate poziții problemă. Secvențele concepute au fost clonate în plasmide ale lanțului greu și ușor și exprimate în celule Expi293F. Anticorpul exprimat în supernatanți de cultură au fost cuantificați și evaluați pentru legare la celulele HEK293 transfectate cu TIM-3 uman recombinant.

Exemplul 11. Izotipuri de anticorpi anti-TIM-3

VH și VL ale anticorpilor anti-TIM-3 izolați au fost clonate pe diferite izotipuri ale lanțului greu, opțional cu diferite substituții Fc, și alotipuri cu lanțuri ușoare κ în decursul caracterizării anticorpului pentru a evalua efectul, dacă există vreunul, al comutării izotipului pe funcționalitate sau dezvoltarea anticorpilor. Diferitele izotipuri utilizat sunt prezentate în **Tabelul 28**.

Tabelul 28.

Izotip	Substituție în comparație cu tipul sălbatic*	Scopul substituției
IgG2sigma	V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S	Desființarea funcțiilor efectoare
IgG2sigma_K409R	V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S, K409R	Desființarea funcțiilor efectoare, îmbunătățirea formării heterodimerului în anticorpuspecific
IgG2sigma_F405L	V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S, F405L	Desființarea funcțiilor efectoare, îmbunătățirea formării heterodimerului în anticorpuspecific
IgG4_PAA	S228P, F234A, L235A	Stabilitatea anticorpului, desființarea funcțiilor efectoare
IgG4_PAA_F405L_R409K	S228P, F234A, L235A, F450L, R409K	Stabilitatea anticorpului, desființarea funcțiilor efectoare, îmbunătățirea formării heterodimerului în anticorpuspecific
IgG4_S228P	S228P	Stabilitatea anticorpului
IgG1	De tip sălbatic	
IgG1 sigma	L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S, P331S	Desființarea funcțiilor efectoare
IgG1 sigma_K409R	L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S, P331S, K409R	Desființarea funcțiilor efectoare, îmbunătățirea formării heterodimerului în anticorpuspecific
IgG1sigma_F405L	L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S, P331S, F405L	Desființarea funcțiilor efectoare, îmbunătățirea formării heterodimerului în anticorpuspecific
IgG1_AA	L234A, L235A	Desființarea funcțiilor efectoare
*Numerotarea reziduurilor în conformitate cu indicele EU		

Diferitele alotipuri utilizate în anticorpii generați sunt prezentate în Tabelul 29. Unii dintre anticorpi au avut alotipuri himerice. Anticorpii TM3B105 și TM3B403 de exemplu diferă printr-o substituție de aminoacizi într-o regiune constantă la poziția 189. SEQ ID NO ale lanțurilor grele și ușoare ale TM3B105: 240 și respectiv 79; SEQ ID NO ale lanțurilor grele și ușoare ale TM3B403: 78 și respectiv 79. Este de așteptat ca cei doi anticorpi să aibă aceleași caracteristici.

Tabelul 29.

Izotip/Alotip/Substituții
IgG2sigma_G2m(n-)/(n) _K409R
IgG2sigma_G2m(n-) _K409R
IgG2sigma _G2m(n-)/(n)
IgG2sigma_F405L
IgG2_K409R
IgG2sigma _G2m(n-)
IgG2

Izotip/Alotip/Substituții
IgG4_S228P
IgG4_S228P_F405L_R409K
IgG4_nG4m(a)_PAA_F405L_R409K
IgG4_PAA
IgG1sigma
IgG1_G1m(17)
IgG1_G1m(17,1)_AA

În general, anticorpul anti-TIM-3 cu Fc IgG2sigma au avut activitate mai mare în testul CMV decât anticorpul anti-TIM-3 cu Fc hulgG4. În plus, anticorpul cu Fc hulgG2 au demonstrat o funcționalitate care a fost intermediară între IgG2sigma și IgG4. Alotipul nu a avut efect asupra activității anticorpului.

5 Exemplul 12. Caracterizarea structurală a anticorpilor anti-TIM-3

Secvențele ADNc și translațiile de aminoacizi ale anticorpilor au fost obținute utilizând tehnici standard prin generarea anticorpilor utilizând diferite campanii. După determinarea secvenței de polipeptidă, unii anticorpi ADNc care codifică regiunile variabile sau anticorpul cu lungime completă au fost optimizați codonic utilizând metode standard pentru expresia pe scară extinsă. Anticorpul TM3B103, TM3B105, M3B108, TM3B109 și TM3B113 au fost izolați din bibliotecile cu afișare pe bacteriofagi. Anticorpul TM3B189, TM3B190, TM3B193, TM3B195 și TM3B196 au fost generați prin șoareci imunizați.

Tabelul 30 prezintă secvențele HCDR1 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 31 prezintă secvențele HCDR2 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

15 **Tabelul 32** prezintă secvențele HCDR3 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 33 prezintă secvențele LCDR1 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 34 prezintă secvențele LCDR2 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 35 prezintă secvențele LCDR3 ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 36 prezintă secvențele VH ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

20 **Tabelul 37** prezintă secvențele VL ale anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 38 prezintă cadrul anticorpilor anti-TIM-3 selectați.

Tabelul 30.

Nume mAb	HCDR1						
	Secvență						SEQ ID NO:
TM3B103	N	Y	W	M	S		90
TM3B105	S	Y	A	M	S		91
TM3B109	S	Y	A	M	S		91
TM3B108	G	Y	W	M	H		92
TM3B113	D	Y	W	M	S		93
TM3B189	S	Y	V	M	Y		94
TM3B190	S	D	Y	A	W	N	95
TM3B193	D	T	Y	L	H		96
TM3B195	S	Y	W	M	Q		97
TM3B196	S	Y	G	V	H		98
TM3B291	S	Y	W	M	Q		97

25 Tabelul 31.

mAb	HCDR2																		
	Secvență																		
TM3B103	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	99	SEQ ID NO:

mAb	HCDR2																	
	Secvență																	SEQ ID NO:
TM3B105	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	99
TM3B109	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	99
TM3B108	A	I	S	Y	S	G	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	100
TM3B113	V	I	K	Y	S	G	G	S	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	101
TM3B189	Y	I	N	P	Y	N	D	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	G	102
TM3B190	Y	I	N	Y	S	G	R	T	S	Y	N	P	S	L	K	S		103
TM3B193	R	I	D	P	T	N	G	N	I	K	Y	D	P	K	F	Q	G	104
TM3B195	A	I	Y	P	G	D	G	D	I	R	Y	T	Q	N	F	K	G	105
TM3B196	V	I	W	S	D	G	S	T	T	Y	N	S	A	L	K	S		106
TM3B291	A	I	Y	P	G	D	G	D	I	R	Y	T	Q	N	F	K	G	105

Tabelul 32.

mAb	HCDR3																
	Secvență																SEQ ID NO:
TM3B103	D	H	W	D	P	N	F	L	D	Y							107
TM3B105	S	P	Y	A	P	L	D	Y									108
TM3B109	N	E	E	P	D	D	R	L	D	Y							109
TM3B108	G	T	N	W	L	D	Y										110
TM3B113	E	L	E	G	V	F	D	Y									111
TM3B189	D	D	Y	D	V	A	P	F	A	Y							112
TM3B190	G	G	N	F	D	Y											113
TM3B193	P	Y	Y	G	F	F	D	Y									114
TM3B195	W	E	K	S	T	T	V	V	Q	R	N	Y	F	D	Y		115
TM3B196	Q	A	N	Y	R	Y	D	S	A	M	D	Y					116
TM3B291	W	E	K	S	T	T	V	V	Q	R	N	Y	F	D	Y		115

Tabelul 33.

mAb	LCDR1																	
	Secvență																SEQ ID NO:	
TM3B103	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A					117	
TM3B105	R	A	S	Q	S	V	N	D	Y	L	A						118	
TM3B109	K	S	S	Q	S	V	L	A	S	S	N	N	K	N	Y	L	A	119
TM3B108	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A					117	
TM3B113	R	A	S	Q	S	V	S	N	S	T	L	A					120	
TM3B189	R	A	S	E	S	L	D	S	Y	G	N	S	Y	I	H		121	
TM3B190	Q	A	T	Q	D	I	V	K	N	L	N						122	
TM3B193	K	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A						123	
TM3B195	K	A	S	E	N	V	G	T	F	V	S						124	
TM3B196	K	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N		125	
TM3B291	K	A	S	E	N	V	G	T	F	V	S						124	

Tabelul 34.

mAb	LCDR2							
	Secvență							SEQ ID NO:
TM3B103	G	A	S	S	R	A	T	126
TM3B105	D	A	S	N	R	A	T	127
TM3B109	W	A	S	T	R	E	S	128
TM3B108	G	A	S	S	R	A	T	126
TM3B113	T	A	S	S	R	A	T	129
TM3B189	L	A	S	N	L	E	S	130
TM3B190	Y	V	T	E	L	A	E	131
TM3B193	S	A	T	Y	R	Y	T	132
TM3B195	G	A	S	N	R	Y	T	133
TM3B196	T	A	A	N	L	Q	s	134
TM3B291	G	A	S	N	R	Y	T	133

5 **Tabelul 35.**

mAb	LCDR3									
	Secvență									SEQ ID NO:
TM3B103	Q	Q	Y	G	S	S	P	L	T	135
TM3B105	Q	Q	G	G	H	A	P	I	T	136
TM3B109	Q	Q	Y	Y	S	T	P	L	T	137
TM3B108	Q	Q	Y	G	S	S	P	L	T	135
TM3B113	Q	Q	S	Y	T	S	P	W	T	139
TM3B189	Q	Q	N	N	E	D	P	F	T	140
TM3B190	L	Q	F	Y	E	F	P	L	T	141
TM3B193	Q	Q	H	Y	S	T	P	Y	T	142
TM3B195	G	Q	S	Y	S	Y	P	T		143
TM3B196	Q	Q	S	N	E	D	P	F	T	144
TM3B291	G	Q	S	Y	S	Y	P	T		143

Tabelul 36.

Nume mAb	Nume VH	Secvență VH	SEQ ID NO:
TM3B103	TM3H21	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y W M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K D H W D P N F L D Y W G Q G T L V T V S S	145
TM3B105	TM3H24	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S P Y A P L D Y W G Q G T L V T V S S	146

Nume mAb	Nume VH	Secvență VH	SEQ ID NO:
TM3B108	TM3H30	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSG YWMHWVRQAPGKGLEWVSAISYSGSSTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGTNWLDYWGQGT LTVVSS	147
TM3B109	TM3H31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKNEEPDDRDL DYWGQGT LTVVSS	148
TM3B113	TM3H65	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YWMSWVRQAPGKGLEWVSVIKYSGGSKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKELEGVFDYWGQGT LTVVSS	149
TM3B189	TM3H141	EVQLQQSGPELLKPGASVKMSCKASGYTFT SYVMYWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTK YNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSRLTSED SAVYYCTRDDYDVAPFAYWGQGT LTVVSA	150
TM3B190	TM3H96	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITS DYAWN WIRQFPGNKLEWMGYINYSGRTSY NPSLKSRI SITRDT SKNQFFLQLNSVTTEDTA TYYCTSGGNFDYWGQGT TLTVSS	151
TM3B193	TM3H99	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFHIKD TYLHWVKQRPEQGLEWIGRIDPTNGNIKYD PKFQ GKATITSDTSSNTAYLQLSSLTSED TAV YYCARPYGFFDYWGQGT TLTVSS	152
TM3B195	TM3H144	EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFT SYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDIR YTQNFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASE DSAVYYCARWEKSTTVVQRNYFDYWGQGT TLTVSS CORRECT?	153
TM3B196	TM3H102	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTISGFSLSY GVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTTYNS ALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA MYYCARQANYRYDSAMDYWGQGT SVTVS S	154
TM3B291	TM3H162	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYPGDGDIR YTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARWEKSTTVVQRNYFDYWGQGT TVTVSS	172

Tabelul 37.

Nume mAb	Nume VL	Secvență VL	SEQ ID NO:
TM3B103	PH9L1	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSS YLAWEYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPLTFGQGTKVEIK	155
TM3B105	TM3L33	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQSVNDY LAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFS GSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQGGHA PITFGQGTKVEIK	156
TM3B108	PH9L1	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSS YLAWEYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPLTFGQGTKVEIK	155
TM3B109	PYYL6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLA SSNNKNYLAWEYQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	157
TM3B113	TM3L12	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSNS TLAWYQQKPGQAPRLLIYTASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSYTS PWTFGQGTKVEIK	158
TM3B189	TM3L61	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESLDSY GNSYIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP ARFSGSGSKTDFTLTIDPVEADDPATYYCQQ NNEDPFTFGSGTKLEIK	159
TM3B190	TM3L62	DIVMTQSPSSMSASLGDRITITCQATQDIVKN LNWYQQKPGKPPSFLIHYVTELAEGVPSRFS GSGSGSDYSLTISNLESEDFADYYCLQFYEPF LTFGAGTKLELK	160
TM3B193	TM3L52	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVN TAVAWYQQKPGQSPKLLIYSATYRYTGVPD RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YSTPYTFGSGTKLEIK	161
TM3B195	TM3L67	DVQMIQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVG TFVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNRYTGVPD RFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQS YSYPTFGSGTKLEM	162
TM3B196	TM3L64	DIQMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDY DGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYTAANLQS GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC	163

Nume mAb	Nume VL	Secvență VL	SEQ ID NO:
		QQSNEDPFTFGSGTKLEIK	
TM3B291	TM3L85	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASENVGT FVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVP FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGQSYS YPTFGQGTKLEIK	173

Tabelul 38.

Nume mAb	Nume VH	Cadru VH		Nume VL	Cadru VL	
		Nume	SEQ ID NO:		Nume	SEQ ID NO:
TM3B103	TM3H21	IGHV3-23	174	PH9L1	IGKV3-20	180
TM3B105	TM3H24	IGHV3-23	174	TM3L33	IGKV3-11	171
TM3B108	TM3H30	IGHV3-23	174	PH9L1	IGKV3-20	180
TM3B109	TM3H31	IGHV3-23	174	PYYL6	IGKV4-1	181
TM3B113	TM3H65	IGHV3-23	174	TM3L12	IGKV3-20	180
TM3B189	TM3H141	IGHV1-02	175	TM3L61	IGKV4-1	181
TM3B190	TM3H96	IGHV4-30	176	TM3L62	IGKV1-39	182
TM3B193	TM3H99	IGHV1-03	177	TM3L52	IGKV1-33	183
TM3B195	TM3H144	IGHV1-03	177	TM3L67	IGKV1-39	182
TM3B196	TM3H102	IGHV2-26	178	TM3L64	IGKV4-1	181
TMB291	TM3H162	IGHV5-51	179	TM3L85	IGKV1-39	182

IGHV3-23 SEQ ID NO: 174

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS

5 AISGSGGSTYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK

IGHV1-02 SEQ ID NO: 175

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMH WVRQAPGQGLEWMG

RINPNSGGTNYAQKFQG RVTSTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTVVYYCAR

IGHV4-30 SEQ ID NO: 176

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRPPGKGLEWIGYIYYS

GSTYYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR

10 IGHV1-03 SEQ ID NO: 177

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMG

WINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR

IGHV2-26 SEQ ID NO: 178

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRPPGKALEWLA

HIFSNDEKSYSTSLKSRLTISKDT SKSQVVL TMTNMDPVD TATYYCARI

IGHV5-51 SEQ ID NO: 179

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPG

15 DSDTRYSPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR

IGKV3-20 SEQ ID NO: 180

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY

GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGGSSP

IGKV3-11 SEQ ID NO: 171

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT

GIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWP

20 IGKV4-1SEQ ID NO: 181

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY

GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

IGKV1-39 SEQ ID NO: 182

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY

AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPI

GKV1-33 SEQ ID NO: 183

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIY

5 DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQYDNL

Exemplul 13. Caracterizarea anticorpilor anti-TIM-3

Anticorpilor selectați au fost caracterizați pentru legarea lor la celulele umane sau de cyno, și abilitatea lor de a bloca legarea ligandului galectin 9. Tabelul 39 prezintă caracteristicile anticorpilor selectați în aceste teste. Datele de legare celulară reprezintă valorile EC_{50} calculate ale legării anticorpilor la celulele transfectate cu proteina recombinantă TIM-3 indicată exprimată în unități $\mu\text{g/ml}$. Inhibarea galectin-9 reprezintă nivelul maximal de inhibare al legării galectin-9 la TIM-3 uman văzut cu anticorpul indicați. Anticorpilor testați au fost testați ca izotipuri IgG2sigma.

Testele de mapare ale epitopului au fost efectuate prin acoperirea proteinei huTIM-3-Fc recombinante pe plăci MSD. Plăcile au fost blocate și spălate, urmate de adăugarea amestecului de mAb-uri anti-TIM-3 marcate tag cu MSD, incubate cu creșterea concentrațiilor de mAb-uri anti-TIM-3 nemarcate. După incubare cu agitare ușoară la temperatura camerei, plăcile au fost spălate și analizate cu un SECTOR Imager 6000. S-a considerat că anticorpilor care au concurat unul cu celălalt pentru legare la TIM-3 uman se leagă la epitopi similari. Inhibarea pozitivă a fost notată dacă >75% din legare a fost inhibată. Inhibarea parțială a fost de 40-75% din inhibare. Inhibarea < 40% a fost denumită negativă.

Tabelul 39.

mAb	EC_{50} a legării celulare, $\mu\text{g/ml}$		Inhibare galectin 9, % inhibare	Epitop Bin
	Celule umane	Celule de cyno		
TM3B103	0,71	0,09	71,2	1
TM3B105	0,46	0,03	69,8	1
TM3B107			74,8	2
TM3B108	0,42	0,03	64,2	1
TM3B109			77,0	1
TM3B113			75,6	2
TM3B189	0,74	0,19	76,4	3
TM3B190	0,35	0,08	60,7	1
TM3B193			47,4	3
TM3B219	0,60	0,10	38,0	3
TM3B196			57,0	4

Exemplul 14. Dezvoltarea unui test funcțional *in vitro* pentru a caracteriza anticorpilor anti-TIM-3

Evaluarea funcțională a receptorilor inhibitori cum ar fi PD-1 poate fi făcută utilizând celule T de la un donator normal care sunt stimulate de celulele dendritice alogeneice sau de antigeni specifici, cum ar fi toxoidul de tetanus sau CMV. În aceste setări, modificările în funcționarea celulelor T cu tratament cu anticorpi pot fi detectate prin măsurarea nivelurilor de citokine supernatante sau a markerilor de activare ai celulelor T. Efectele asupra anticorpilor anti-TIM-3 pot fi foarte variabile în aceste tipuri de teste, cu mici modificări globale în starea de activare sau funcționalitate grupului de celule T (non-antigen-specific). Pe de altă parte, utilizarea abordărilor cu tetramer pentru a urma subpopulațiile/clonele de celule T singure în aceste teste, nu furnizează rezoluția necesară pentru a detecta efectele funcționale ale anticorpilor anti-TIM-3, din cauza frecvenței scăzute și profilului funcțional eterogen al acestor clone ale celulelor T. În plus, această abordare necesită identificarea anterioară a epitopilor recunoscuți de către celulele T specifice CMV fiecărui donator.

CD137 a fost descris recent ca marker surogat pentru celulele T activate specifice antigenului (Wolf și colab., (2007) Blood 110(1):201-210; Klinger și colab., (2013) PLoS One 8(9): e74231). În

testele noastre, utilizarea CD137 a permis identificarea celulelor T CD8⁺ și CD4⁺ specifice antigenului care se extind ca răspuns la stimularea cu antigen CMV și permit detecția efectelor funcționale ale anticorpilor anti-TIM-3. În plus față de expresia CD137, secreția de citokine de către MSD a fost de asemenea evaluată în aceste teste.

Activitatea anticorpilor anti-TIM-3 selectați a fost testată în pBMC-urile stimulate cu pp65 CMV. În aceste teste, anticorpul anti-TIM-3 a crescut activarea celulelor T, după cum s-a evidențiat prin expresia CD137 crescută asupra ambelor celule T CD8⁺ și CD4⁺. În plus, anticorpul anti-TIM-3 selectat a ameliorat de asemenea secreția de IFN- γ și TNF- α în acest test.

Tabelul 40 prezintă rezultatele testului CMV unde expresia ameliorată a suprafeței CD137 a fost evaluată pe celulele CD8⁺ sau CD4⁺ pentru anticorpul TIM-3 selectat. Tabelul prezintă valorile p generate utilizând testul T bidirecțional (varianță inegală).

Tabelul 40.

	CD8 ⁺ CD137 ⁺ , valori p			CD4 ⁺ CD137 ⁺ , valori p		
	Medie	Dev Std	n	Medie	Dev Std	n
TM3B103	0,043	0,025	5	0,071	0,112	3
TM3B105	0,029	0,036	6	0,01	0,017	3
TM3B107	0,182	0,188	5	0,157	0,125	3
TM3B108	0,022	0,018	5	0,01	0,01	3
TM3B109	0,035	0,041	5	0,017	0,015	3
TM3B113	0,082	0,064	6	0,05	0,026	3
TM3B189	0,027	0,026	6	0,007	0,011	3
TM3B190	0,078	0,159	6	0,004	0,005	3
TM3B193	0,467	0,252	3	0,1	NA	1
TM3B195	0,035	0,043	7	0,01	0,01	3
TM3B196	0,328	0,183	6	0,733	0,058	3
TM3B197	0,473	0,303	4	0,3	NA	1

Exemplul 15. Generare de anticorpi PD-1/TIM-3 bispecfici

Anticorpul PD-1 și TIM-3 monospecifici selectați au fost exprimați ca IgG1/ κ , IgG2/ κ sau IgG4/ κ . Substituțiile au fost făcute la pozițiile 405 și 409 (numerotare EU) în anticorpul monospecific pentru a promova ulterior schimbarea brațului *in vitro* și formarea anticorpilor bispecfici. Anticorpul IgG1 și IgG2 anti-PD-1 și anti-TIM-3 au fost modificați genetic pentru a avea o substituție F405L și una K409R, respectiv, pentru a promova schimbarea brațului și generarea anticorpilor bispecfici. Pe IgG4, poziția 409 WT este R, prin urmare anticorpul IgG4 anti-PD-1 nu a fost modificat genetic și anticorpul IgG4 anti-TIM-3 a fost modificat genetic pentru a avea substituțiile F405L și R409K. În plus față de substituțiile pozițiilor 405 și 409, mAb-urile IgG4 au fost modificate genetic pentru a avea substituția S228P și anticorpul IgG2 a fost opțional modificat genetic pentru a include substituția IgG2sigma (V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S).

Anticorpul monospecific a fost exprimat și purificat utilizând metode standard utilizând o coloană de proteină A (coloană HiTrap MabSelect SuRe). După eluare, grupurile au fost dializate în D-PBS, pH 7,2.

Anticorpul PD-1/TIM-3 bispecific a fost generat prin combinarea unui mAb PD-1 monospecific și a unui mAb TIM-3 monospecific în schimbarea brațului Fab cum s-a descris în publicația de brevet internațional nr. WO2011/131746. Pe scurt, la aproximativ 1-20 mg/ml la un raport molar de 1:1 al fiecărui anticorp în PBS, pH 7-7,4 și 75 mM 2-mercaptoetanamină (2-MEA) au fost amestecate împreună și incubate la 25-37°C timp de 2-6 ore, urmate de îndepărtarea a 2-MEA prin dializă, diafiltrare, filtrare de flux tangențial și/sau filtrarea celulei centrifugate utilizând metode standard.

Anticorpul bispecific a fost purificat suplimentar după schimbarea brațului Fab *in vitro* utilizând cromatografie cu interacțiune hidrofobă pentru a minimiza anticorpul PD-1 și TIM-3 parental rezidual utilizând metode standard.

Anticorpul anti-PD-1 monospecific selectat și anticorpul anti-TIM-3 au fost combinați în matrice în schimbarea brațului Fab *in vitro* pentru a genera anticorpi bispecfici. **Tabelul 41, Tabelul 42**

și **Tabelul 43** prezintă secvențele VH, VL, HC și LC anticorpilor bispecfici generați și izotipurile lor. Alotipurile anticorpului G2 au fost G2m(n)/(n-) sau G2m(n-).

În unele experimente, s-au utilizat anticorpi de control care au fost monovalenți fie pentru PD-1 sau TIM-3 cu al doilea braț fiind legat inert la gp120. Brațul de legare la gp120 a avut o VH din SEQ ID NO: 184 și VL din SEQ ID NO: 185. **Tabelul 44** prezintă anticorpii de control generați.

SEQ ID NO: 184 VH al mAb de legare al gp120

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVRQAPGQRFWMGWNP

YNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDS

PQDNYYMDVWGKGTIVVSS

SEQ ID NO: 185 VL al mAb de legare al gp120

EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISIRSRRAVWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRAS

GISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK

Tabelul 41.

mAb	Braț de legare PD-1				
	VH1	SEQ ID NO VH1:	VL1	SEQ ID NO VL1:	Izotip
PTBB 14	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG2sigma
PTBB15	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG2sigma
PTBB 16	PD1H129	64	PD1L62	65	IgG2sigma
PTBB17	PD1H129	64	PD1L62	65	IgG2sigma
PTBB24	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG2sigma
PTBB30	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG2sigma
PTBB27	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG2
PTBB28	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG2
PTBB 18	PD1H129	64	PD1L62	65	IgG4 S228P
PTBB20	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG4 S228P
PTBB21	PD1H170	48	PD1L148	56	IgG4 S228P

Tabelul 42.

mAb	Braț de legare TIM-3				
	VH2	SEQ ID NO VH2:	VL2	SEQ ID NO VL2:	Izotip
PTBB 14	TM3H144	153	TM3L67	162	IgG2sigma
PTBB15	TM3H24	146	TM3L33	156	IgG2sigma
PTBB 16	TM3H144	153	TM3L67	162	IgG2sigma
PTBB 17	TM3H24	146	TM3L33	156	IgG2sigma
PTBB24	TM3H162	172	TM3L85	173	IgG2sigma
PTBB30	TM3H24	146	TM3L33	156	IgG2sigma
PTBB27	TM3H162	172	TM3L85	173	IgG2
PTBB28	TM3H24	146	TM3L33	156	IgG2
PTBB 18	TM3H24	146	TM3L33	156	IgG4 S228
PTBB20	TM3H24	146	TM3L33	156	IgG4 S228
PTBB21	TM3H162	172	TM3L85	173	IgG4 S228

Tabelul 43.

mAb	SEQ ID NO:			
	Braț de legare PD-1		Braț de legare TIM-3	
	HC1	LC1	HC2	LC2
PTBB 14	186	188	190	193
PTBB15	186	188	191	194
PTBB 16	187	189	190	193
PTBB 17	187	189	191	194
PTBB24	186	188	192	195
PTBB30	186	188	248	194
PTBB27	241	188	244	195
PTBB28	241	188	245	194
PTBB 18	242	189	246	194
PTBB20	243	188	246	194
PTBB21	243	188	247	195

SEQ ID NO: 186

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
 DYWGQGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKT
 VERKCCVECPGPCPAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQ
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPMLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO: 187

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLSVAYISGG
 GANTYYLDNVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYSYFDVWG
 QGTLLTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVERKC
 CVECPGPCPAPPA AASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPMLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

SEQ ID NO: 188

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGTKVEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 189

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLLIKSASQSISG
IPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYCQNGHSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 190

EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPG
DGDIRYTNFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARWEKSTTVVQR
NYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVD
KTKVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 191

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ
GTLVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTKVERKCC
VECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPMLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5

K

SEQ ID NO: 192

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYP
GDGDIRYTNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWEKSTTVVQ
RNYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKV
DKTKVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSAEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 193

DVQMIQSPKSMMSVGERVTLCKASENVGTFVSWYQQKPDQSPKLLIYGASNR
YTGVPRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQSYSYPTFGSGTKLEMKRTV
AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO: 194

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQGGHAPITFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 195

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRY
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYSYPTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 241
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT
VERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 242
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLESVAYISGG
GANTYYLDNVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYSYFDVWG
QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
5 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SLGK
SEQ ID NO: 243
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
DTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSL
DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK

SEQ ID NO: 244
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYP
GDGDIRYTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWEKSTTVVQ
RNYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKV
DKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN

10 HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 245

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ERKCC
 VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
 TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPMLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

GK

SEQ ID NO: 246

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYG
 PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

LSLGK

5 SEQ ID NO: 247

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYP
 GDGDIRYTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWEKSTTVVQ
 RNYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKV
 DKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDP
 EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN

HYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 248

EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
 GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYAPLDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ERKCC
 VECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSAEDPEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPMLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

K

10 **Tabelul 44.**

MAb control	Braț 1 VH/VL cu substituție F405L	Braț 2 VH/VL cu substituție K409R	Izotip
TM3B342	gp120	TM3B195	IgG2sigma
TM3B343	gp120	TM3B299	IgG2sigma
B23B74	gp120	B23B32	IgG2sigma

MAb control	Braț 1 VH/VL cu substituție F405L	Braț 2 VH/VL cu substituție K409R	Izotip
PTBB23	gp120	TM3B291	IgG2sigma
PD1B355	PD1B246	gp120	IgG2sigma
PD1B356	PD1B248	gp120	IgG2sigma

Exemplul 16. Caracterizarea anticorpilor PD-1/TIM-3bispecfici

Anticorpii bispecfici antagonistici generați au fost testați în testul CMV pentru abilitatea lor de a ameliora răspunsurile celulei T specifice la antigen. Funcționalitatea a fost măsurată prin evaluarea expresiei CD137 pe ambele celule T CD4⁺ și CD8⁺ și prin nivelurile de IFN- γ și TNF- α în supernatanții de cultură cum s-a descris în Exemplul 14. **Tabelul 45 și Tabelul 46** sumarizează activitatea anticorpilor PD-1/TIM-3 bispecfici în acest test pentru diferite citiri. Așa cum se arată în aceste tabele, moleculele bispecifice selectate au condus la creșterea semnificativă a expresiei CD137 pe celulele T CD4⁺ și CD8⁺ și a nivelurilor de IFN- γ și TNF- α secretate. În general, bispecificii PD-1/TIM-3 cu hIgG2sigma Fc au avut cea mai robustă activitate, urmați de acele molecule cu hIgG2 și apoi cu hIgG4.

Tabelul 45.

mAb		Semnificație statistică			
		CD137 ⁺ CD4 ⁺		CD137 ⁺ CD8 ⁺	
Izotip	nume	p med	Dev St	p med	Dev St
		valoare		valoare	
IgG2sigma	PTBB 14	0,1144	0,1591	0,0002	0,0001
IgG2sigma	PTBB15	0,0467	0,0988	0,0001	0,0000
IgG2sigma	PTBB16	0,0017	0,0023	0,0001	0,0000
IgG2sigma	PTBB17	0,4148	0,5051	0,0001	0,0001
IgG2sigma	PTBB24	0,0031	0,0051	0,0001	0,0000
IgG2	PTBB27	0,0009	0,0011	0,0001	0,0000
IgG2	PTBB28	0,0003	0,0002	0,0001	0,0000
IgG4	PTBB18*	0,0353		0,0071	
IgG4	PTBB20	0,6025	0,1710	0,0004	0,0004
IgG4	PTBB21	0,1071	0,1372	0,0059	0,0081
*o valoare p raportată					

Tabelul 46.

mAb		Semnificație statistică			
		IFN- γ		TNF- α	
Izotip	nume	Valoare p med	Dev St	Valoare p med	Dev St
IgG2sigma	PTBB 14	0,0001	0,0000	0,0112	0,0157
IgG2sigma	PTBB15	0,0001	0,0000	0,0005	0,0008
IgG2sigma	PTBB 16	0,0001	0,0000	0,0012	0,0016
IgG2sigma	PTBB17	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000
IgG2sigma	PTBB24	0,0001	0,0001	0,0008	0,0008
IgG2	PTBB27	0,0026	0,0030	0,3406	0,4757
IgG2	PTBB28	0,0001	0,0000	0,1437	0,1229
IgG4	PTBB18	0,0001	#DIV/0!	0,0008	#DIV/0!
IgG4	PTBB20	0,0544	0,0768	0,1754	0,2140
IgG4	PTBB21	0,0174	0,0245	0,2685	0,1103
*o valoare p raportată					

Exemplul 17. Anticorpi anti-PD1 suprareglează expresia TIM-3 pe tumori

Efectul tratamentului cu anticorpi anti-PD-1 în expresia TIM-3 pe tumori a fost evaluat în modelul de carcinom la colon CT26 sau MC38 pe șoarece.

Șoarecii balb/c au fost implantați subcutanat cu 1×10^6 tumori de carcinom la colon CT26. Șapte zile după implantul celulei tumorale, tumorile au fost măsurate și șoarecii au fost randomizați după dimensiunea tumorii. Tratamentul cu PBS sau 10mg/kg anticorpi PD-1 anti-șoarece (clonă RMP1-14, BioXCell) a început în ziua 7 după implantul celulei tumorale și a continuat bisăptămănal pentru restul studiului. Pentru a analiza expresia celulei T a TIM-3, tumorile au fost recoltate în ziua 22 și disociate utilizând GentleMACS (Miltenyi). Colorarea pentru citometrie de flux a fost efectuată cu viu/mort și markeri pentru CD3, CD4, CD8 și TIM-3. Citometria de flux a fost efectuată pe un LSR Fortessa (BD). Datele au fost analizate utilizând software-ul Flow Jo.

Șoarecii femele C57B1/6 de tip sălbatic au fost implantați subcutanat cu 5×10^5 celule de carcinom de colon MC-38 suspendate în PBS. Tumorile au fost măsurate și șoarecii au fost randomizați după dimensiunea tumorii ($50-100 \text{ mm}^3$). Tratamentul cu PBS sau 10mg/kg Pd-1 anti-șoarece (clonă RMP1-14, BioXCell) a început după randomizare și a continuat bisăptămănal pentru restul studiului. Pentru a profila celulele T care se infiltrează în tumori, tumorile au fost recoltate și disociate utilizând GentleMACS (Miltenyi) la 12, 15, 19, sau 22 zile după implant.

Colorarea pentru citometria de flux a fost efectuată cu viu/mort și markeri pentru CD45, Thy1, CD3, CD4, CD8, TIM-3, CD137, OX40, GITR, TIGIT. Datele despre citometria de flux au fost colectate pe o LSR Fortessa (BD). Datele au fost analizate utilizând software-ul FlowJo (v9.9.4) și vizualizate cu GraphPad Prism. Statisticile au fost generate cu GraphPad Prism.

Analiza expresiei TIM-3 pe celulele T CD8+ izolate din tumori CT26 în ziua 22 a dezvăluit o creștere a expresiei TIM-3 în mostrele tratate cu PD-1, în comparație cu controlul cu PBS. **Figura 1A** prezintă intensitatea fluorescență medie a expresiei TIM-3 în cele două grupuri de tratament.

Expresia TIM-3 a fost de asemenea crescută în tumorile MC-38 în mostrele tratate cu mAb anti-PD-1 în comparație cu controlul cu PBS. **Figura 1B** prezintă intensitatea fluorescență medie a expresiei TIM-3 în populația TIL CD8+. **Figura 1C** prezintă procentajul (%) frecvenței relative a celulelor CD8+ TIM-3+ din total TIL-uri CD8+.

Aceste date arată că TIM-3 este suprareglat ca răspuns la tratamentul cu anti-PD-1, care susține raționamentul pentru țintirea TIM-3 la subiecții tratați cu PD-1.

Expresia CD137, OX40 și GITR a fost de asemenea analizată pe celulele T CD8+ care se infiltrează în tumorile MC38 izolate de la șoarecii tratați cu anticorpi PD-1 anti-șoarece. Aceste rezultate au arătat că atât frecvența cât și nivelul (gMFI) expresiei receptorilor costimulatori ai familiei TNF CD137, OX40 și GITR au fost crescute după blocarea PD-1. **Figura 2A** și **Figura 2B** arată gMFI și frecvența relativă a expresiei CD137 pe TIL-urile CD8, respectiv. **Figura 3A** și **Figura 3B** arată gMFI și frecvența relativă a expresiei OX40 pe TIL-urile CD8, respectiv, și **Figura 4A** și **Figura 4B** arată gMFI și expresia relativă a GITR pe TIL-urile CD8, respectiv.

Aceste date susțin raționamentul pentru țintirea CD137, OX40 și/sau GITR la subiecții tratați cu PD-1.

Exemplul 18. Activitatea anticorpilor anti-TIM-3 după blocarea PD-1

Activitatea anticorpilor anti-TIM-3 a fost de asemenea testată după blocarea anticorpului anti-PD-1 în testul CMV. În aceste experimente, PBMC-urile de la un donator normal (pozitiv pentru ser CMV) au fost incubate cu grupuri de peptide pp65 și anticorpi anti-PD-1 timp de 5 zile. În ziua 5, supernatantii au fost recoltați și celulele au fost re-stimulate cu grupuri de peptide pp65 în prezența fie a anticorpului anti-TIM-3 sau fie a anticorpului anti-PD-1. Nivelurile IFN- γ în supernatant au fost măsurate 24 de ore mai târziu. Tratamentul cu anticorpi anti-TIM-3 după 5 zile de blocare anti-PD-1 a condus la o creștere semnificativă a nivelurilor IFN- γ . Acest efect a fost semnificativ ($p=0,0183$) în comparație cu tratamentul continuat cu anti-PD-1. În experiment, au fost utilizați anticorpii anti-TIM-3 TM3B403 și anticorpii anti-PD-1 PD1B244. **Figura 5** prezintă niveluri crescute de IFN- γ în testul CMV, unde PBMC-urile au fost tratate cu anticorpii anti-TIM-3 TM3B105 după 5 zile de tratament cu anti-PD-1 PD1B244. Valorile reprezintă media a șase replicare biologice utilizate pentru fiecare afecțiune.

Exemplul 19. Maparea epitopului anticorpilor anti-TIM-3

S-a efectuat spectrometrie de masă cu schimb de soluție de hidrogen/deuteriu (HDX-MS) pentru a identifica epitopii de legare ai TMB403 și TMB291. Pentru experimente, VH și VL ai TMB403 și TMB291 au fost clonate ca Fab-uri IgG1 cu o etichetă de hexahistidină în C-terminal. Fab-urile, au fost generate din transfectările tranzitorii de celule Expi HEK293 în flacoane de agitare în suspensie. Au fost utilizate TIM-3 IgG1 Fc Chimera, Ser22-Arg200 (Accession # Q8TDQ0), produse în linia celulară de mielom de șoarece (derivată NS0) de la R&D Systems (Catalog # 2365-TM).

Pentru schimbul H/D, procedurile utilizat pentru a analiza perturbația Fab au fost similare cu cele descrise anterior (Hamuro și colab., Biomolecular Techniques 14: 171-182, 2003; Horn și colab., Biochemistry 45: 8488-8498, 2006) cu unele modificări. Pe scurt, proteina de fuziune TIM-3/Fc umană

deglicozilată sau TIM-3-Fc uman deglicozilat plus amestec Fab au fost incubate cu tampon marcat cu oxid de deuteriu la 0°C timp de mai multe ori până la 2 ore. Schimbul de deuteriu a fost stins prin adăugare de clorhidrat de guanidină și mostra stinsă a fost supusă la digestie cu pepsină pe-coloană și analiză LC-MS. Spectrele de masă au fost înregistrate în numai în mod MS. Pentru calcularea încorporării de deuteriu, spectrul de masă pentru o peptidă dată a fost combinat de-a lungul maximului cromatografiei ionice extrase și s-a calculat media ponderată m/z. Creșterea masei față de masa peptidului nativ (0 min) față de masa medie ponderată corespunde cu nivelul de incorporare al deuteriului. Aproximativ 98,4% din proteină ar putea fi mapată la peptide specifice.

Nivelurile de deuteriu la peptidele identificate au fost monitorizate din deplasarea masei pe LC-MS. Au fost reprezentate grafic curbele de acumulare de deuteriu selectate, care arată diferențe semnificative în nivelurile și/sau pantele de deuteriu, în timpul schimbului de peptide. Proteina de fuziune Tim-3/Fc umană deglicozilată a prezentat o reducere semnificativă a absorbției de deuteriu după legare la TM3B403 la secvențele ³²WGKGACPVFECGNVVL⁴⁷, (SEQ ID NO: 261) și după legare la TM3B291 la secvențele ⁹⁰RIQIPGIMNDEKF¹⁰², (SEQ ID NO: 262). Aceste regiuni cu reducere semnificativă în absorbția de deuteriu după legare la Fab-uri pot fi privite astfel ca epitopi principali ai mAb-urilor.

Un segment, ⁵⁰DERDVNY⁵⁶, (SEQ ID NO: 263) a demonstrat o reducere modestă în schimbarea deuteriului după legarea la TM3B403 sau TM3B291. Această regiune poate fi de asemenea considerată ca epitop potențial pentru ambii anticorpi.

Epitopii majori de legare pentru TM3B403 sau TM3B291 sunt diferiți. Totuși, ei pot partaja regiunea de protecție modestă similară, ⁵⁰DERDVNY⁵⁶, (SEQ ID NO: 263) pe baza rezultatelor de mapare HDX. Pentru a ajuta la evaluarea dacă această regiune contribuie la regiunea comună a epitopului de legare pentru ambele molecule Fab, s-a efectuat ELISA concurențială. Proteina Tim-3/Fc umană recombinantă a fost acoperită direct pe plăcile care au fost apoi blocate și spălate. Un amestec de Fab TM3B291 marcat cu Ruteniu (Ru) care a fost preincubat cu diferite concentrații de TM3B105 sau TM3B291 nemarcate. Plăcile au fost incubate, spălate și tamponul T de citire MSD a fost dispensat în fiecare godeu urmat de citirea cu un SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Analiza concurențială a demonstrat că TM3B403 a concurat pentru legare la TIM-3 cu TM3B291. Acest rezultat ar putea indica că regiunea modest protejată, DERDVNY (SEQ ID NO: 263) este o parte din epitop pentru ambii anticorpi sau că anticorpii pot bloca steric legarea fiecăruia cu celălalt din cauza proximității strânse a epitopilor lor.

Exemplul 20. Blocarea TIM-3 crește expresia TIGIT pe TIL-urile CD8⁺

Efectul tratamentului cu anticorp anti-TIM-3 pe expresia TIGIT în tumori a fost evaluat în modelele de carcinom de colon CT26 și MC38 pe șoarece. Studiile au fost efectuate cum s-a descris în Exemplul 17 cu excepția faptului că s-au utilizat 10 mg/ml de anticorp anti-TIM-3 RMT3-23 (Bioxcell).

Expresia TIGIT pe TIL-urile CD8⁺ (**Figura 19A, Figura 20A**) și frecvența relativă a TIGIT+ TIL-uri (**Figura 19B, Figura 20B**) au fost ridicate în ambele modele tumorale CT26 (**Figura 19A, Figura 19B**) și MC38 (**Figura 20A, Figura 20B**) după blocarea TIM-3.

Exemplul 21. Expresia TIM-3 este crescută după blocarea PD-1 *ex vivo* în PBMC-urile pacientului cu melanom

PBMC-urile de la tratamentul pacienților cu melanom naiv au fost stimulate cu grupuri de peptide de antigen de melanom (NY-ESO, gp100, MART-1) în prezența anticorpilor de blocare a funcționării anti-PD-1 sau anti-TIM-3. Expresia TIM-3 a fost evaluată pe celulele restimulate cu peptidă în ziua 6. Rezultatele au prezentat o creștere semnificativă în frecvența celulelor T CD8⁺ TIM-3⁺ în mostrele tratate cu anti-PD-1 în comparație cu controalele sau PBMC-urile tratare cu TIM-3 (**Figura 21**).

În ziua 0, PBMC-urile congelate din tratamentul pacienților cu melanom naiv au fost rapid dezghețate într-o baie cu apă la 37°C. Celule au fost dezghețate, spălate și numărate în mediu RPMI complet (RPMI + 10% FBS + 1% piruvat de sodiu + 1% NEAA + 1% pen/strep). Celule au fost plăci la 200.000 celule pe godeu într-o placă cu 96 de godeuri, cu fundul în formă de U în prezența sau absența anticorpilor de blocare a funcționării anti-PD-1 sau anti-TIM-3 (PD1B244 și respectiv TM3B403) și 1μg/mL de grupuri de peptidă de antigen de melanom (NY-ESO, gp100, MART-1) timp de 6 zile la 37°C. Celulele au fost restimulate cu grupul de peptidă în ziua 6 și analizate prin citometrie de flux pentru expresia PD-1 și TIM-3 precum și pentru activarea celulelor T și markerilor de proliferare.

Exemplul 22. Anticorpii anti-TIM-3 cresc frecvența celulelor NK activate în PBMC-urile stimulate cu IL-2

Efectele anticorpului anti-TIM-3 TM3B403 asupra frecvenței celulelor NK activate au fost determinate în testele unde PBMC-urile umane au fost stimulate cu IL-2 (20U). Frecvența CD69 și CD25, markerilor de activare ai celulelor NK, a fost evaluată prin citometrie de flux 48 ore post-tratament la un interval de concentrații mAb. TM3B403 a crescut frecvența celulelor NK activate când activarea a fost evaluată prin procentajul de celule CD69 pozitive (**Figura 22A**) sau procentajul celulelor CD25 pozitive (**Figura 22B**).

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> DeAngelis, Nikki A Powers, Gordon Sabins, Nina Chi Santulli-Marotto, Sandra Verona, Raluca
 Wiehagen, Karla R
 5 <120> Anticorpi care se leagă specific la PD-1 și utilizări ale lor
 <130> JBI5071WOPCT
 <140> Va fi atribuit
 <141> 01-11-2016
 <150> 62/250.095
 10 <151> 03-11-2015
 <160> 312
 <170> Versiune patentln 3.5
 <210> 1
 <211> 268
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80

 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

 Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

 Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly

130

135

140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser
145 150 155 160

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175

Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205

Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225 230 235 240

Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
245 250 255

Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
260 265

<210> 2

<211> 149

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn

85

90

95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu
145

<210> 3

<211> 268

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 3

Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Ala Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser

145 150 155 160
 Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
 165 170 175
 Gln Gly Thr Ile Glu Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
 180 185 190
 Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
 195 200 205
 Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Ala Pro Cys Val Pro Glu
 210 215 220
 Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Leu Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Pro Arg Pro
 245 250 255
 Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 260 265
 <210> 4
 <211> 149
 <212> **PRT**
 5 <213> *Macaca fascicularis*
 <400> 4
 Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Ala Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Arg Leu
 65 70 75 80
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95
 Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala

100

105

110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Ala Leu
 145

<210> 5

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr

165

170

175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg
210 215 220

<210> 6

<211> 221

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr

165

170

175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr
210 215 220

<210> 7

<211> 222

<212> PRT

5 <213> Macaca fascicularis

<400> 7

Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly
1 5 10 15

Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp
20 25 30

Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile
35 40 45

Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn Tyr
50 55 60

Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala
65 70 75 80

Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg
85 90 95

Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys
100 105 110

Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp
115 120 125

Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
130 135 140

Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly
145 150 155 160

Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn Val

165

170

175

Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr Cys
180 185 190

Ile Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val
195 200 205

Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr
210 215 220

<210> 8

<211> 201

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp

165

170

175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr
195 200

10 <210> 9

<211> 143

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro Ala
1 5 10 15

Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Leu
20 25 30

Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu Met Leu Asn Trp Asn Arg Leu Ser Pro
35 40 45

Ser Asn Gln Thr Glu Lys Gln Ala Ala Phe Cys Asn Gly Leu Ser Gln
50 55 60

Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg His
65 70 75 80

Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly Ile
85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu His Pro Lys Ala Lys Ile Glu Glu
100 105 110

Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile Leu Glu Thr Ser
115 120 125

Thr Arg Tyr Pro Ser Pro Ser Pro Lys Pro Glu Gly Arg Phe Gln
130 135 140

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCDR1 a anticorpului PD-1

<400> 10

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCDR1 a anticorpului PD-1

<400> 11

Asp Tyr Val Ile Ser
1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCDR1 a anticorpului PD-1

<400> 12

Ser Tyr Val Ile His
1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCDR2 a anticorpului PD-1

<400> 13

Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

5 <210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10 <223> HCDR2 a anticorpului PD-1

<400> 14

Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

15 <210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

20 <223> HCDR2 a anticorpului PD-1

<400> 15

Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Tyr	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

25 <210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCDR3 a anticorpului PD-1

<400> 16

Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asn	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				

30 <210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Secvență artificială

35 <220>

<223> HCDR3 a anticorpului PD-1

<400> 17

Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr
1				5					10				

40 <210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCDR3 a anticorpului PD-1

45 <400> 18

Gly	Thr	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	His	Leu	Asp	Tyr
1				5					10	

<210> 19

<211> 11

50 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>
 <223> HCDR3 a anticorpului PD-1
 <400> 19
 Gly Tyr Val Arg Ala Thr Gly Met Leu Asp Tyr
 1 5 10
 5 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> LCDR1 al anticorpului PD-1
 <400> 20
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR1 al anticorpului PD-1
 <400> 21
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10
 20 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> LCDR1 al anticorpului PD-1
 <400> 22
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 23
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR1 al anticorpului PD-1
 35 <400> 23
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR1 al anticorpului PD-1
 <400> 24
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10
 45 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 50 <223> LCDR1 al anticorpului PD-1
 <400> 25
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <223> LCDR2 al anticorpului PD-1
 <400> 26
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 5 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> LCDR2 al anticorpului PD-1
 <400> 27
Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 28
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR2 al anticorpului PD-1
 20 <400> 28
Asp Ala Ser Tyr Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR2 al anticorpului PD-1
 <400> 29
Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 30 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <223> LCDR2 al anticorpului PD-1
 <400> 30
Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 31
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 45 1 5
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 32
Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 33
 55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 33
 Gln Gln Arg Gly Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 5 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 34
 Gln Gln Arg Glu Tyr Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 35
 Gln Gln Arg Asp Tyr Trp Pro Leu Thr
 20 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 36
 Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro Leu Thr
 1 5
 30 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 37
 Gln Gln Arg Trp Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 38
 Gln Gln Arg Ala Tyr Trp Pro Leu Thr
 45 1 5
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 39
 Gln Gln Arg Ala Glu Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 40
 55 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD-1
 <400> 40
 Gln Gln Arg Ser Ala Trp Pro Leu Thr
 1 5
 5 <210> 41
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> PD1H24
 <400> 41
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Asn Leu Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 15 <210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> PD1H131
 <400> 42
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 20

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Asn Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1H3

<400> 43

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> PD1H108

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Leu Asp Arg Thr Gly His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1H164

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Tyr Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Leu Asp Arg Thr Gly His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15

<220>

<223> PD1H107

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Val Arg Ala Thr Gly Met Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1H163

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Lys Ser Tyr
20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Val Arg Ala Thr Gly Met Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 123

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1H170

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

5 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PH9L3

<400> 49

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L128

<400> 50

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10 <223> PD1L101

<400> 51

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

20 <223> PD1L67

<400> 52

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Glu Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L71

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15

<220>

<223> PD1L109

<400> 54

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L132

<400> 55

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Trp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> PD1L148

<400> 56

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 57

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L133

<400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15

<220>

<223> PD1L185

<400> 58

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ala Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L187

<400> 59

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Glu Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ala Glu Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L86

<400> 60

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L168

<400> 61

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ala Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L190

<400> 62

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 63

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1H130

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

10

Asp Met Ser Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64

<211> 117

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1H129

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1L62

10 <400> 65

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>
 <223> PD1 anticorp HCDR1
 <400> 66
Arg Tyr Asp Met Ser
 1 5
 5 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <223> HCDR2 al anticorpului PD1
 <400> 67
Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 68
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> HCDR3 al anticorpului PD1
 <400> 68
Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val
 20 1 5
 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <223> LCDR1 al anticorpului PD1
 <400> 69
Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Tyr Leu His
 1 5 10
 <210> 70
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR2 al anticorpului PD1
 35 <400> 70
Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> LCDR3 al anticorpului PD1
 <400> 71
Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr Thr
 45 1 5
 <210> 72
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <223> PD1B244 HC
 <400> 72

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205	

```

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210                               215                               220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225                               230                               235                               240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                               245                               250                               255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
                               260                               265                               270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                               275                               280                               285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
290                               295                               300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                               310                               315                               320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
                               325                               330                               335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                               340                               345                               350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355                               360                               365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370                               375                               380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                               390                               395                               400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
                               405                               410                               415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                               420                               425                               430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
                               435                               440                               445

Gly Lys
450

```

<210> 73

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1B244 LC

<400> 73

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 74

<211> 444

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1B243 HC

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 75

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1B243 LC

<400> 75

140

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 76

<211> 447

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1B245 HC

<400> 76

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	20	25	30	
Val	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Tyr	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Gly	Thr	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	His	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 77

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> PD1B245 LC

<400> 77

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 78

<211> 443

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM3 al lanțului greu

<400> 78

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Lys	Ser	Pro	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	180	185	190	
Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn				

195

200

205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 79

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM-3 al lanțului ușor

<400> 79

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asp Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gly His Ala Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 80

<211> 450

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Anticorp TIM-3 al lanțului greu

<400> 80

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Ile	Arg	Tyr	Thr	Gln	Asn	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Trp	Glu	Lys	Ser	Thr	Thr	Val	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Phe	Asp	100	105	110	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	115	120	125	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	130	135	140	
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	145	150	155	160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	165	170	175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	180	185	190	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	195	200	205	

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
 210 215 220
 Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala
 225 230 235 240
 Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 81

<211> 213

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Anticorp TIM-3 al lanțului ușor

<400> 81

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 82

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Gena HCDR1 a PD-1

<220>

10 <221> ICARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (1)..(1)

<223> Xaa poate fi Ser sau Asp

<220>

<221> ICARACTERISTICĂ_DIV.

15 <222> (3)..(3)

<223> Xaa poate fi Val sau Ala

<220>

<221> ICARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (5)..(5)

20 <223> Xaa poate fi His sau Ser

<400> 82
Xaa Tyr Xaa Ile Xaa
 1 5
 <210> 83
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena HCDR2 a PD-1
 <220>
 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa poate fi Tyr sau Phe
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa poate fi Gly sau Asp
 <400> 83
Gly Ile Ile Pro Ile Xaa Xaa Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly
 <210> 84
 20 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena 1 HCDR3 a PD-1
 25 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa este Asn sau Ser
 <400> 84
Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Xaa Leu Asp Tyr
 30 1 5 10
 <210> 85
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 35 <220>
 <223> gena 2 HCDR3 a PD-1
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (2)..(2)
 40 <223> Xaa este Thr sau Tyr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa este Leu sau Val
 45 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa este Asp sau Arg
 <220>
 50 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa este Arg sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 55 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa este His sau Met

<400> 85
 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gly Xaa Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 86
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena LCDR1 a PD-1
 <220>
 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa este Ser, Arg sau Asp
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa este Ser sau Asn
 <400> 86
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 87
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena LCDR2 a PD-1
 25 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa este Asn, Asp, Tyr, Ser sau Thr
 <400> 87
 Asp Ala Ser Xaa Arg Ala Thr
 30 1 5
 <210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 35 <220>
 <223> gena LCDR3 a PD-1
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (4)..(4)
 40 <223> Xaa este Ser, Asn, Gly, Glu, Asp, Trp sau Ala
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa este Asn, Tyr, Glu sau Ala
 45 <400> 88
 Gln Gln Arg Xaa Xaa Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 89
 <211> 179
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 89

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR1

<400> 90

Asn Tyr Trp Met Ser

1 5

10 <210> 91

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1

<400> 91

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 92

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR1

<400> 92
Gly Tyr Trp Met His
 1 5
 <210> 93
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1
 <400> 93
Asp Tyr Trp Met Ser
 10 1 5
 <210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 15 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1
 <400> 94
Ser Tyr Val Met Tyr
 1 5
 <210> 95
 20 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1
 25 <400> 95
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5
 <210> 96
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1
 <400> 96
Asp Thr Tyr Leu His
 1 5
 35 <210> 97
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1
 <400> 97
Ser Tyr Trp Met Gln
 1 5
 <210> 98
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR1
 <400> 98
Ser Tyr Gly Val His
 50 1 5
 <210> 99
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 55 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR2

<400> 99

Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 100

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR2

<400> 100

Ala	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

10 Gly

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15 <220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR2

<400> 101

Val	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Gly	Ser	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 102

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR2

25 <400> 102

Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 103

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR2

<400> 103

Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

40 <220>

<223> anticorp TIM-3 al HCDR2

<400> 104

Arg	Ile	Asp	Pro	Thr	Asn	Gly	Asn	Ile	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 105

45 <211> 17

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR2
 5 <400> 105
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Tyr Thr Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly
 <210> 106
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR2
 <400> 106
 Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 15 <210> 107
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <223> anticorp TIM-3 al HCDR2
 <400> 107
 Asp His Trp Asp Pro Asn Phe Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 108
 Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr
 1 5
 30 <210> 109
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 35 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 109
 Asn Glu Glu Pro Asp Asp Arg Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 110
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 45 <400> 110
 Gly Thr Asn Trp Leu Asp Tyr
 1 5
 <210> 111
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 111

Glu Leu Glu Gly Val Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 112
 Asp Asp Tyr Asp Val Ala Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10
 10 <210> 113
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 113
 Gly Gly Asn Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 114
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 114
 Pro Tyr Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr
 1 5
 25 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 <400> 115
 Trp Glu Lys Ser Thr Thr Val Val Gln Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 116
 35 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al HCDR3
 40 <400> 116
 Gln Ala Asn Tyr Arg Tyr Asp Ser Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 117
 <211> 12
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 117
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 50 <210> 118
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 55 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 118

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asp Tyr Leu Ala
1 5 10
 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 119
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ala Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala
 10

 <210> 120
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 120
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Thr Leu Ala
1 5 10
 20 <210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 121
Arg Ala Ser Glu Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Tyr Ile His
1 5 10 15
 <210> 122
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 122
Gln Ala Thr Gln Asp Ile Val Lys Asn Leu Asn
1 5 10
 35 <210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 40 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 <400> 123
Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10
 <210> 124
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR1
 50 <400> 124
Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe Val Ser
1 5 10
 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT

	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR1
	<400> 125
5	Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
	1 5 10 15
	<210> 126
	<211> 7
	<212> PRT
10	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR2
	<400> 126
	Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
	1 5
	<210> 127
15	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR2
20	<400> 127
	Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
	1 5
	<210> 128
	<211> 7
	<212> PRT
25	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR2
	<400> 128
	Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
	1 5
30	<210> 129
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
	<220>
35	<223> anticorp TIM-3 al LCDR2
	<400> 129
	Thr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
	1 5
	<210> 130
	<211> 7
40	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR2
	<400> 130
	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
45	1 5
	<210> 131
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
50	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR2
	<400> 131
	Tyr Val Thr Glu Leu Ala Glu
	1 5
	<210> 132
55	<211> 7
	<212> PRT

<213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR2
 <400> 132
 5 **Ser Ala Thr Tyr Arg Tyr Thr**
 1 5
 <210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR2
 <400> 133
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 134
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR2
 20 <400> 134
 Thr Ala Ala Asn Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR3
 <400> 135
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5
 30 <210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <223> anticorp TIM-3 al LCDR3
 <400> 136
 Gln Gln Gly Gly His Ala Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 137
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> anticorp TIM-3 al LCDR3
 <400> 137
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 45 1 5
 <210> 138
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 138

160

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp
20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg
35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn
50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr
65 70 75 80

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile
85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys
100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125

Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn
145 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly Ile Tyr Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala Gly Leu
180 185 190

Ala Leu Ala Leu Ile Phe Gly Ala Leu Ile Phe Lys Trp Tyr Ser His
195 200 205

Ser Lys Glu Lys Ile Gln Asn Leu Ser Leu Ile Ser Leu Ala Asn Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Gly Leu Ala Asn Ala Val Ala Glu Gly Ile Arg Ser Glu
225 230 235 240

Glu Asn Ile Tyr Thr Ile Glu Glu Asn Val Tyr Glu Val Glu Glu Pro
245 250 255

Asn Glu Tyr Tyr Cys Tyr Val Ser Ser Arg Gln Gln Pro Ser Gln Pro
260 265 270

Leu Gly Cys Arg Phe Ala Met Pro
275 280

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR3
	<400> 139
5	Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Trp Thr
	1 5
	<210> 140
	<211> 9
	<212> PRT
10	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR3
	<400> 140
	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Phe Thr
	1 5
	<210> 141
15	<211> 9
	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR3
20	<400> 141
	Leu Gln Phe Tyr Glu Phe Pro Leu Thr
	1 5
	<210> 142
	<211> 9
	<212> PRT
25	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR3
	<400> 142
	Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
	1 5
30	<210> 143
	<211> 8
	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
	<220>
35	<223> anticorp TIM-3 al LCDR3
	<400> 143
	Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
	1 5
	<210> 144
	<211> 8
40	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
	<220>
	<223> anticorp TIM-3 al LCDR3
	<400> 144
	Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
45	1 5
	<210> 145
	<211> 119
	<212> PRT
	<213> Secvență artificială
50	<220>
	<223> TM3H21
	<400> 145

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp His Trp Asp Pro Asn Phe Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

<211> 117

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H24

<400> 146

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147

<211> 116

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H30

<400> 147

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Thr Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 148

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10 <223> TM3H31

<400> 148

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asn Glu Glu Pro Asp Asp Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 149

<211> 117

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H65

5 <400> 149

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		

Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Ser	Val	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Gly	Ser	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	

Ala	Lys	Glu	Leu	Glu	Gly	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		

Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115		

<210> 150

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H141

<400> 150

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Leu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met Tyr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Asp Asp Tyr Asp Val Ala Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 151

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H96

<400> 151

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

10

Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ser Gly Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 152

<211> 117

<212> PRT

15

<213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H99

<400> 152

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe His Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 153

<211> 130

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10

<223> TM3H144

<400> 153

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Tyr Thr Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Glu Lys Ser Thr Thr Val Val Gln Arg Asn Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Cys Arg Arg Glu
115 120 125

Cys Thr
130

<210> 154

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3H102

<400> 154

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

10

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Val Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gln Ala Asn Tyr Arg Tyr Asp Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 155

<211> 108

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> PH9L1

5 <400> 155

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		

Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35						40					45			

Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
			85						90					95	

Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105			

<210> 156

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L33

<400> 156

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asn	Asp	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
	35					40						45			

Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65				70					75					80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gly	His	Ala	Pro	Ile
			85					90						95	

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105		

15 <210> 157

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

20 <223> PYYL6

<400> 157

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ala Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 158

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L12

10 <400> 158

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

Thr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 159

<211> 111

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L61

<400> 159

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Pro Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 160

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L62

<400> 160

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Thr Gln Asp Ile Val Lys Asn
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Ser Phe Leu Ile
35 40 45

His Tyr Val Thr Glu Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Phe Tyr Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

10 100 105

<210> 161

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15 <220>

<223> TM3L52

<400> 161

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 162

<211> 105

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L67

<400> 162

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

10

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met
100 105

<210> 163

<211> 111

<212> PRT

15

<213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L64

<400> 163

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 164

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> gena HCDR1 a TIM-3

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

10 <222> (1)..(1)

<223> Xaa este Asn, Ser, Gly sau Asp

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (3)..(3)

15 <223> Xaa este Trp sau Ala

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (5)..(5)

<223> Xaa este Ser sau His

20 <400> 164

Xaa Tyr Xaa Met Xaa

1 5

<210> 165

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secvență artificială

<220>

<223> gena HCDR2 a TIM-3

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

30 <222> (1)..(1)

<223> Xaa este Ala sau Val

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (3)..(3)

35 <223> Xaa este Ser sau Lys

<220>

<221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (4)..(4)

<223> Xaa este Gly sau Tyr

<220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa este Thr sau Lys
 5 <400> 165
 Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly
 <210> 166
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena HCDR3 a TIM-3
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa este Asp, Ser, Asn, Gly sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (2)..(2)
 20 <223> Xaa este His, Pro, Glu, Thr sau Leu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa isTrp, Glu, Asn sau șters
 25 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa este Asp, Pro, sau depeted
 <220>
 30 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa este Pro, Tyr, Asp sau șters
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 35 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa este Asn, Ala, Asp, Gly sau șters
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (7)..(7)
 40 <223> Xaa este Phe, Pro, Arg, Trp sau Val
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa este Leu sau Phe
 45 <400> 166
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 167
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena LCDR1 a TIM-3
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 55 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa este Arg sau Lys

<220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa este Ala sau Ser
 5 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa este Ser, Asn sau Leu
 <220>
 10 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa este Ser, Ala, Asn sau şters
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 15 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa este Ser sau şters
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (10)..(10)
 20 <223> Xaa este Ser sau şters
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa este Asn sau şters
 25 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa este Asn sau şters
 <220>
 30 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa este Lys sau şters
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 35 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa este Ser, Asn sau Asp
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (15)..(15)
 40 <223> Xaa este Tyr sau Thr
 <400> 167
 Xaa Xaa Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15

Ala
 <210> 168
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secvenţă artificială
 <220>
 <223> gena LCDR2 a TIM-3
 <220>
 50 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa este Gly, Asp, Trp sau Thr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 55 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa este Ser, Asn sau Thr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa este Ala sau Glu
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 5 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa este Thr sau Ser
 <400> 168
Xaa Ala Ser Xaa Arg Xaa Xaa
1 5
 <210> 169
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> gena LCDR3 a TIM-3
 15 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa este Tyr, Gly sau Ser
 <220>
 20 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa este Gly sau Tyr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 25 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa este Ser, His sau Thr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (6)..(6)
 30 <223> Xaa este Ser, Ala sau Thr
 <220>
 <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa este Leu, Ile sau Trp
 35 <400> 169
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5
 <210> 170
 <211> 98
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 170

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 171

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 171

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

10 <210> 172

<211> 124

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> TM3H162

<400> 172

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Tyr Thr Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Glu Lys Ser Thr Thr Val Val Gln Arg Asn Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 173

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> TM3L85

<400> 173

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 174

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 174

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 175

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 175

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ser Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 176

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

5

10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 177

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 177

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 178

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 178

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ala
20 25 30

5

10

15

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

180

Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Ser Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile
100

<210> 179

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 179

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 180

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 180

10

181

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 181

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 181

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 182

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

5

10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
 85 90 95

<210> 183

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 183

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
 85 90 95

<210> 184

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VH al mAb de legare la gp120

<400> 184

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 185

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VL al mAb de legare la gp120

<400> 185

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
20 25 30

Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
35 40 45

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys
100 105

10

<210> 186

<211> 449

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC1

<400> 186

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

```

Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
    195                                200                                205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
    210                                215                                220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser
    225                                230                                235                                240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                                250                                255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
                260                                265                                270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
    275                                280                                285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
    290                                295                                300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
    305                                310                                315                                320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
                325                                330                                335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                340                                345                                350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
    355                                360                                365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                                375                                380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
    385                                390                                395                                400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                                410                                415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                420                                425                                430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    435                                440                                445

```

Lys

<210> 187

<211> 443

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC1

<400> 187

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Arg	Tyr	20	25	30	
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Ser	Val	35	40	45	
Ala	Tyr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Ser	Pro	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	100	105	110	
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	115	120	125	
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	130	135	140	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	145	150	155	160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	165	170	175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	180	185	190	

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 188

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific LC1

<400> 188

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 189

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific LC1

<400> 189

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 190

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 190

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

190

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Ile	Arg	Tyr	Thr	Gln	Asn	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Trp	Glu	Lys	Ser	Thr	Thr	Val	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Phe	Asp	100	105	110	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	115	120	125	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	130	135	140	
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	145	150	155	160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	165	170	175	

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
 210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala
 225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 191
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> MAb bispecific HC2

<400> 191

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn
180 185 190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 192

<211> 450

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 192

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	20	25	30	
Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Ile	Arg	Tyr	Thr	Gln	Asn	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Trp	Glu	Lys	Ser	Thr	Thr	Val	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Phe	Asp	100	105	110	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	115	120	125	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	130	135	140	
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	145	150	155	160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	165	170	175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	180	185	190	

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

195

Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
		195					200					205			

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala
225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 193

<211> 213

<212> PRT

<213> Secvență artificială

 $\langle 220 \rangle$

<223> MAb bispecific LC2

<400> 193

Asp Val Gln Met Ile Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 194

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific LC2

<400> 194

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asp Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gly His Ala Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 195

<211> 213

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific LC2

<400> 195

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 196

<211> 369

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN al PD1H170

<400> 196

	caggtgcagc tgggtgcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg	60
	agctgcaaag cgagcggcgg cacccttagc agctatgcga ttagctgggt gcgccaggcg	120
	ccggggccagg gcctggaatg gatgggcggc attattccga tttttgacac cgcgaactat	180
	gcgcagaaat ttcagggccg cgtgaccatt accgcggatg aaagcaccag caccgcgtat	240
	atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgccctggt	300
	ctcgctgcgg cttatgatac tggttccttg gactattggg gccagggcac cctggtgacc	360
	gtgagcagc	369
	<210> 197	
	<211> 321	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al PD1L148	
	<400> 197	
	gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc	60
	ctgagctgcc gcgcgagcca gagcgttcgc tcctacctgg cgtggtatca gcagaaaccg	120
	ggccaggcgc cgcgcctgct gatctacgac gcgagcaatc gtgcgaccgg cattccggcg	180
	cgttttagcg gctccggtag cggcaccgat tttacctga ccattagcag cctggaaccg	240
	gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcaa cgtaattatt ggccgctgac ctttggccag	300
	ggcaccaaag tggaaattaa a	321
10	<210> 198	
	<211> 351	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
15	<223> ADN al PD1H129	
	<400> 198	
	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcgggcga ctggtgcagc ctggcggtac tctgagactg	60
	agctgtgccg ccagcggcct cgccttcagc agatacgaca tgagctgggt gcgccaggcc	120
	cctggcaaag gactggaaag cgtggcctac atctctggcg gaggcgcaa caccctactac	180
	ctggacaacg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
	ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgcggtgt actattgcgc ctccccctac	300
	ctgagctact tcgacgtgtg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcatc t	351
	<210> 199	
	<211> 321	
20	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al PD1L62	
	<400> 199	
	gagatcgtga tgaccagag ccctgccacc ctgtccgtgt ctccaggcga aagagccacc	60
	ctgagctgca gagccagcca gagcctgagc gactacctgc actggtatca gcagaagccc	120
	ggccaggccc ccagactgct gatcaagtct gccagccagt ccatcagcgg catccccgcc	180
	agattttctg gcagcggctc cggcaccgag ttcacctga caatcagcag cctgcagagc	240
	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagaac ggccacagct tcccttacac cttcggccag	300
25	ggcaccaagc tggaaatcaa g	321
	<210> 200	

	<211> 360	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
5	<223> ADN al PD1H163	
	<400> 200	
	caggtgcagc tgggtgcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg	60
	agctgcaaag cgagcggcgg caccctcaag tcctatgtga ttcattgggt gcgccaggcg	120
	ccgggccagg gcctggaatg gatgggcggt attatcccaa tttttggcac cgccaattat	180
	gcgcagaaat ttcagggccg cgtgaccatt accgctgatg aaagcaccag caccgcgtat	240
	atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgcggttat	300
	gtgcgggcta cgggcatgtt ggactatttg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	360
	<210> 201	
	<211> 321	
10	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al PD1L185	
	<400> 201	
	gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc	60
	ctgagctgcc gcgcgagcca gagcgtagc aattatctgg cgtggtatca gcagaaaccg	120
	ggccaggcgc cgcgcctgct gatctacgac gccagcaatc gcgcgaccgg cattccggcg	180
	cgcttttagcg gctccggtag cggcaccgat tttaccctga ccattagcag cctggaaccg	240
	gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcaa cgtgcatatt ggccgctgac ctttggccag	300
15	ggcaccaaaag tggaaattaa a	321
	<210> 202	
	<211> 360	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
20	<220>	
	<223> ADN al PD1H164	
	<400> 202	
	caggtgcagc tgggtgcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcagcag cgtgaaagtg	60
	agctgcaaag cgagcggcgg caccctcagc gattatgtga tttcctgggt gcgccaggcg	120
	ccgggccagg gcctggaatg gatgggcggt attatccga tttacgggac cgctaactat	180
	gcgcagaaat ttcagggccg cgtgaccatt accgctgatg aaagcaccag caccgcgtat	240
	atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgcggtacc	300
	ctcgaccgga cggggcattt ggactatttg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	360
	<210> 203	
25	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al PD1L86	
30	<400> 203	

	gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc	60
	ctgagctgcc ggcgagacca gagcgtctcc tctaccttg cgtggtatca gcagaaaccg	120
	ggccaggcgc cgcgcctgct gatccacgac gcctctacgc gtgcgaccgg cattccggcg	180
	cgcttttagcg gctccggtag cggcaccgat ttaccctga ccattagcag cctggaaccg	240
	gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcaa cgtaattatt ggccgctcac ctttggccag	300
	ggcaccaaag tggaaattaa a	321
	<210> 204	
	<211> 351	
5	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al TM3H24	
	<400> 204	
	gaagtgcagc tgctggaaag cggcgggcgc ctggtgcagc cggcgggcag cctgcgcctg	60
	agctgcgcgg caagcggtt taccttttagc agctatgcga tgagctgggt gcgcagggcg	120
	ccgggcaaag gcctggaatg ggtgagcgcg attagcggca gcggcggcag cacctattat	180
	gcggatagcg tgaaaggccg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat	240
	ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcgc gaaatccccg	300
10	tacgcgccct tggactattg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag c	351
	<210> 205	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<223> ADN al TM3L33	
	<400> 205	
	gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc	60
	cttagctgcc gtgcaagtca gagtgtgaac gactacctgg cgtggtatca gcagaaaccg	120
	ggccaggcgc cgcgcctgct gatttatgat gcgagcaacc gcgcgaccgg cattccggcg	180
	cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat ttaccctga ccattagcag cctggaaccg	240
	gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcag ggtggtcacg gcccgatcac ctttggccag	300
	ggcaccaaag tggaaattaa a	321
	<210> 206	
20	<211> 372	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al TM3H162	
25	<400> 206	
	gaagtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaagc ctggcgagag cctgaagatc	60
	agctgcaagg gcagcggtca cagcttcacc agctactgga tgagtggtt gcgcagatg	120
	cctggcaagg gcctggaatg gatggggcgc atctatcccg gcgacggcga catcagatac	180
	accagaaact tcaagggcc aagtaccatc agcgccgaca agagcatcag caccgcctac	240
	ctgcagtggt ccagcctgaa ggccagcgac accgccatgt actactgtgc cagatgggag	300
	aagtccacca ccgtggtgca gcggaactac ttcgactact ggggccaggg caccacagtg	360
	accgtgtcta gt	372
	<210> 207	
30	<211> 318	

	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al TM3L85	
5	<400> 207	
	gacatccaga tgacccagag ccccgagcagc ctgtctgccg gcgtgggcga cagagtgacc	60
	atcacatgca aggccagcga gaacgtgggc accttcgtgt cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacggc gccagcaaca gatacacccg cgtgccacgc	180
	agattcagcg gctctggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatctctag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgcggccag agctacagct accccacctt tggccagggc	300
	accaagctgg aaatcaag	318
	<210> 208	
	<211> 357	
	<212> ADN	
10	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al TM3H21	
	<400> 208	
	gaagtgcagc tgctggaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgcctg	60
	agctgcgcgg cgagcggcctt tacctttagc aactattgga tgagctgggt gcgccaggcg	120
	ccgggcaaag gcctggaatg ggtgagcgcg attagcggca gcggcggcag cacctattat	180
	gcggatagcg tgaaaggccg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat	240
	ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcgc gaaagatcat	300
	tgggatccca attttttgga ctattggggc cagggcaccc tgggtgaccgt gagcagc	357
15	<210> 209	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
20	<223> ADN al PH9L1	
	<400> 209	
	gaaattgtgc tgacccagag cccgggcacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc	60
	ctgagctgcc gcgcgagcca gagcgtgagc agcagctatc tggcgtggta tcagcagaaa	120
	ccgggccagg cgcgcgcctt gctgatttat ggcgcgagca gccgcgcgac cggcattccg	180
	gatcgcttta gcggcagcgg cagcggcacc gattttaccc tgaccattag ccgcctggaa	240
	ccggaagatt ttgcggtgta ttattgccag cagtatggca gcagcccgt gacctttggc	300
	cagggcacca aagtggaaat taaa	324
	<210> 210	
25	<211> 351	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al TM3H65	
30	<400> 210	

	gaagtgcagc tgctggaaag cggcggcggc ctggtgcagc cggcggcag cctgcgcctg	60
	agctgcgcgg cgagcggcctt taccttttagc gactattgga tgagctgggt gcgccaggcg	120
	ccgggcaaag gcctggaatg ggtgagcgtg atcaagtata gcggtggctc caaatattat	180
	gcggatagcg tgaaaggccg ctttaccatt agccgcgata acagcaaaaa caccctgtat	240
	ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcgc gaaagagctg	300
	gaggggggtgt tcgactattg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag c	351
	<210> 211	
	<211> 324	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN al TM3L12	
	<400> 211	
	gaaattgtgc tgaccacagag cccgggcacc ctgagcctga gcccgggcga acgcgcgacc	60
	ctgagctgcc gcgcgagcca gagcgtttagc aatagcactc tggcgtggta tcagcagaaa	120
	ccggggccagg cgccgcgcct gctgatttat actgcgagca gccgcgcgac cggcattccg	180
	gatcgcttta gcggcagcgg cagcggcacc gattttaccc tgaccattag ccgcctggaa	240
	ccggaagatt ttgcggtgta ttattgccag cagtcttaca catctccgtg gacttttggc	300
	cagggcacca aagtggaaat taaa	324
10	<210> 212	
	<211> 449	
	<212> PRT	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
15	<223> HC al PD1B114	
	<400> 212	

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

204

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1																																																			
																5																	10																	15																	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20																	25																	30																	
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35																	40																	45																	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50																	55																	60																	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65																	70																	75																	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85																	90																	95																	
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asn	Leu	Asp	Tyr	100																	105																	110																	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115																	120																	125																	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130																	135																	140																	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145																	150																	155																	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165																	170																	175																	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180																	185																	190																	
Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195																	200																	205																	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	210																	215																	220																	
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	225																	230																	235																	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser																																																				

205

245

250

255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 213

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B114

<400> 213

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 214

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B149

<400> 214

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asn	Leu	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	180	185	190	
Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	195	200	205	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	210	215	220	
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	225	230	235	240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 215

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B149

<400> 215

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 216

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B160

<400> 216

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

210

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Asn Leu Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
		195					200					205			

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
210 215 220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 217

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B160

<400> 217

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 218

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B162

<400> 218

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
	35						40					45					
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe		
	50					55					60						
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asn	Leu	Asp	Tyr		
			100					105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly		
		115					120					125					
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser		
	130					135					140						
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val		
145					150					155					160		
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe		
				165					170					175			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val		
			180					185					190				
Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val		
		195					200					205					

```

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
210                               215                               220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser
225                               230                               235                               240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                               245                               250                               255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
                               260                               265                               270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                               275                               280                               285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
290                               295                               300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                               310                               315                               320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
                               325                               330                               335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                               340                               345                               350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
                               355                               360                               365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370                               375                               380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385                               390                               395                               400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                               405                               410                               415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                               420                               425                               430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435                               440                               445

```

Lys

<210> 219

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B162

<400> 219

215

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Glu Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 220

<211> 449

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B164

<400> 220

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
	35						40					45					
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Asp	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe		
	50					55					60						
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Asn	Leu	Asp	Tyr		
			100					105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly		
		115					120					125					
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser		
	130					135					140						
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val		
145					150					155					160		
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe		
				165					170					175			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val		
			180					185					190				
Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val		

195																			
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys				
210						215					220								
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser				
225					230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				245						250				255					
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Asp				
			260					265					270						
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
	275						280					285							
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val				
	290					295					300								
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
305					310					315					320				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys				
				325					330					335					
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
		340						345					350						
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr				
	355						360					365							
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
	370					375				380									
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu				
385					390					395					400				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
				405					410					415					
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
			420					425					430						
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
	435						440					445							
Lys																			

<210> 221

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B164

<400> 221

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 222

<211> 449

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B183

<400> 222

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
	35						40					45					
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe		
	50					55					60						
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr		
			100					105					110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly		
	115						120					125					
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser		
	130					135					140						
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val		
145					150					155					160		
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe		
				165					170					175			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val		
			180					185					190				

220

Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val
	195						200						205		
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys
	210					215					220				
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245						250				255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Asp
			260						265					270	
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280						285		
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val
	290						295				300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305						310				315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345						350	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
		355					360					365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370					375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu
385					390					395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			420					425					430		
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
		435					440					445			

Lys

<210> 223

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B183

<400> 223

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 224

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B184

<400> 224

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	165	170	175	

```

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      180                      185                      190

Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
      195                      200                      205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
      210                      215                      220

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser
      225                      230                      235                      240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
      245                      250                      255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
      260                      265                      270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
      275                      280                      285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
      290                      295                      300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
      305                      310                      315                      320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
      325                      330                      335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      340                      345                      350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      355                      360                      365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      370                      375                      380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
      385                      390                      395                      400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
      405                      410                      415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      420                      425                      430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      435                      440                      445

```

Lys

<210> 225

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B184

<400> 225

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

His Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 226

<211> 449

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B185

<400> 226

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	145	150	155	160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 210 215 220
 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 227

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> LC al PD1B185

<400> 227

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Trp Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 228

<211> 449

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HC al PD1B192

<400> 228

5

10

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr	100	105	110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	115	120	125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	130	135	140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val				

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

229

145		150		155		160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe						
		165		170		175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val						
		180		185		190
Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val						
		195		200		205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys						
		210		215		220
Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser						
		225		230		235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser						
		245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp						
		260		265		270
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn						
		275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val						
		290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu						
		305		310		315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys						
		325		330		335
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr						
		340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr						
		355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu						
		370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu						
		385		390		395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys						
		405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu						
		420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly						
		435		440		445
Lys						

<210> 229

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

5

<220>

<223> LC sau PD1B192

<400> 229

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

His Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

10

<210> 230

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15

<223> VH Keitrida

<400> 230

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

231

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 231

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VL Keitruda

<400> 231

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 232

<211> 113

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> VH Nivolumab

<400> 232

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 233

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VL Nivolumab

<400> 233

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 234

<211> 121

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15 <220>

<223> VH Durvalumab

<400> 234

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 235

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VL Durvalumab

<400> 235

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 236

<211> 118

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15 <220>

<223> VH Atezolizumab

<400> 236

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 237

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VL Atezolizumab

<400> 237

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 238

<211> 120

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> VH Avelumab

<400> 238

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 239

<211> 110

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> VL Avelumab

<400> 239

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 240

<211> 443

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanțul greu al TM3B105

<400> 240

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn
 180 185 190
 Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 241

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC1

<400> 241

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Tyr	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
		115						120					125			
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	
		130				135					140					
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
145					150					155					160	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
				165					170					175		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
			180					185					190			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	
		195					200						205			
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	
	210					215					220					
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	
225					230					235					240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
				245					250					255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
			260					265					270			
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275					280					285				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	
	290					295					300					
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
305					310					315					320	

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 242

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC1

<400> 242

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 243

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC1

<400> 243

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 244

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 244

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Tyr Thr Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Glu Lys Ser Thr Thr Val Val Gln Arg Asn Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
 210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

245

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 245

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 245

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

10

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100                      105                      110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
      115                      120                      125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
      130                      135                      140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
      145                      150                      155                      160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
      165                      170                      175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
      180                      185                      190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
      195                      200                      205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
      210                      215                      220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
      225                      230                      235                      240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
      245                      250                      255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
      260                      265                      270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
      275                      280                      285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
      290                      295                      300

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
      305                      310                      315                      320

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
      325                      330                      335

```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 246

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 246

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```

Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    100                      105                      110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
    115                      120                      125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                      135                      140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
    145                      150                      155                      160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
    165                      170                      175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
    180                      185                      190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
    195                      200                      205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
    210                      215                      220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
    225                      230                      235                      240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    245                      250                      255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
    260                      265                      270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
    275                      280                      285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
    290                      295                      300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
    305                      310                      315                      320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    325                      330                      335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
    340                      345                      350

```

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 247

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 247

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Tyr Thr Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Glu Lys Ser Thr Thr Val Val Gln Arg Asn Tyr Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 210 215 220

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Gly Lys
450

<210> 248

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb bispecific HC2

<400> 248

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

252

Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
115						120						125			
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
130						135						140			
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145			150						155			160			
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
			165						170			175			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn
			180			185						190			
Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn
195						200						205			
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro
210			215						220						
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
225			230						235			240			
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			245						250			255			
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
			260			265						270			
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
275						280						285			
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
290						295			300						
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
305			310						315			320			
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys
			325						330			335			
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
			340			345						350			
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
355			360			365									

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 249

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb EM1 HC1

<400> 249

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Val Met Lys Asp Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 250

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb EM1 LC1

<400> 250

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

256

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 251

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb EM1 HC2

<400> 251

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Arg Gly Thr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

10

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

257

115								120							125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
130						135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145				150						155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185						190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225						230				235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	275						280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
		355					360					365			

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 252

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> MAb EM1 LC2

<400> 252

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 253

<211> 1807

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN HCl PTBB28

<400> 253

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgctg tgctgttaac	60
ggtggaggggc agtgtagtct gagcagtact cgttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa	120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg	180
acacgaagct tgccgccacc atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg	240
cccaaagtat acaggcccag gtgcagctgg tgcagagcgg cgcggaagtg aaaaaaccgg	300
gcagcagcgt gaaagtgagc tgcaaagcga gcggcgccac ctttagcagc tatgcgatta	360
gctgggtgcg ccaggcgccg ggccagggcc tggaatggat gggcggcatt attccgattt	420
ttgacaccgc gaactatgcg cagaaatttc agggccgcgt gaccattacc gcggatgaaa	480
gcaccagcac cgcgtatatg gaactgagca gcctgcgcag cgaagatacc gcggtgtatt	540
attgcgcgcg ccctggtctc gctgcggcct atgatactgg ttccttggac tattggggcc	600
agggcaccct ggtgaccgtg agcagcgccct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg	660
cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact	720
acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca	780
ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc	840

cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca	900
ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaatt gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac	960
cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga	1020
tctcccgga cccctgaggtc acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg	1080
tccagttcaa ctggtacgtg gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg	1140
aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact	1200
ggctgaacgg caaggagtac aagtgcgaag tctccaacaa aggcctccca gccccatcg	1260
agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc	1320
catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct	1380
accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga	1440
ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcctgct ctacagcaag ctcaccgtgg	1500
acaagagcag gtggcagcag gggaaagtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctctc	1560
acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgatag ttcgattca	1620
ttgatcataa tcagccatac cacatctgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca	1680
cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt	1740
gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt	1800
ttttcac	1807

<210> 254

<211> 1105

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN LC1 PTBB28

<400> 254

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgagg tgctgttaac	60
ggtggagggc agtgtagtct gagcagtagt cgttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa	120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg	180
acacgaagct tgccgccacc atggagacac attctcaggt ctttgtatac atgttgctgt	240
ggttgtcttg tgtcgaggga gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga	300
gccccggcga acgcgcgacc ctgagctgcc gcgcgagcca gagcgttcgc tectacctgg	360
cgtggtatca gcagaaaccg ggccaggcgc cgcgcctgct gatctacgac gcgagcaatc	420
gtgcgaccgg cattccggcg cgcttttagcg gctccgtag cggcaccgat tttaccctga	480
ccattagcag cctggaaccg gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcaa cgtaattatt	540

ggcgcgtgac ctttggccag ggcaccaaag tggaaattaa acgtacgggtg gctgcaccat 600
ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt 660
gcctgctgaa taacttctat ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc 720
tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca 780
gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct 840
gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt 900
gttagtgatt cgaatgatca taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt 960
aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt 1020
taacttgctt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 1080
aaataaagca tttttttcac tgcac 1105

<210> 255

<211> 1789

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN HC2 PTBB28

<400> 255

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgctg tgctgttaac 60
ggtggagggc agtgtagtct gagcagtagt cgttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa 120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg 180
acacgaagct tgccgccacc atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg 240
cccaaagtat acaggccgaa gtgcagctgc tggaaagcgg cggcggcctg gtgcagccgg 300
gcggcagcct gcgcctgagc tgcgcggcaa gcggctttac ctttagcagc tatgcgatga 360
gctgggtgctg ccaggcgccg ggcaaaggcc tggaaatgggt gagcgcgatt agcggcagcg 420
gcggcagcac ctattatgct gatagcgtga aaggccgctt taccattagc cgcgataaca 480
gcaaaaacac cctgtatctg cagatgaaca gcctgcgcgc ggaagatacc gcggtgtatt 540
attgcgcgaa atccccgtac gcgcccttgg actattgggg ccagggcacc ctggtgaccg 600
tgagcagcgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggccgacctg tccaggagca 660
cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaaggga ctacttcccc gaaccgggtga 720
cgggtgtcgtg gaactcaggg gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac 780
agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc aacttcggca 840
cccagacctc cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag 900
ttgagcgcaa atgttgtgtc gagtgccac cgtgccagc accacctgtg gcaggaccgt 960
cagtccttct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg 1020

	tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccccgga ggtccagttc aactggtacg	1080
	tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca	1140
	cgttccgtgt ggtcagcgtc ctacccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt	1200
	acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa	1260
	ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga	1320
	ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccaccagc gacatcgccg	1380
	tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg	1440
	actccgacgg ctcccttcttc ctctacagcc ggctcacctg ggacaagagc aggtggcagc	1500
	aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga	1560
	agagcctctc cctgtctccg ggtaaatgat agttcgaatt cattgatcat aatcagccat	1620
	accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg	1680
	aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgctta ttgcagctta taatggttac	1740
	aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcac	1789
	<210> 256	
	<211> 1105	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<223> ADN LC2 PTBB28	
	<400> 256	
	cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgccg tgctgttaac	60
	ggtggagggc agtgtagtct gagcagtagt cgttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa	120
	tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg	180
	acacgaagct tgccgccacc atggagacac attctcaggt ctttgtatac atgttgctgt	240
	ggttgtcttg tgtcgaggga gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga	300
	gccccggcga acgcgcgacc cttagctgcc gtgcaagtca gagtgtgaac gactacctgg	360
	cgtggtatca gcagaaaccg ggccaggcgc cgcgcctgct gatttatgat gcgagcaacc	420
	gcgcgaccgg cattccggcg cgcttttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga	480
	ccattagcag cctggaaccg gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcag ggtggtcacg	540
	cgccgatcac ctttggccag ggcaccaaag tggaaattaa acgtacggtg gctgcaccat	600
	ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt	660
	gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc	720
	tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca	780
10	gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct	840
	gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt	900
	gttagtgatt cgaatgatca taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt	960
	aaaaaacctc ccacacctcc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt	1020
	taacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac	1080
	aaataaagca tttttttcac tgcac	1105
	<210> 257	
	<211> 1807	

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN HC1 PTBB30

5

<400> 257

```

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgctg tgctgttaac      60
ggtggagggc agtgtagtct gagcagtagt cgttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa      120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg      180
acacgaagct tgccgccacc atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg      240
cccaaagtat acaggcccag gtgcagctgg tgcagagcgg cgcggaagtg aaaaaaccgg      300
gcagcagcgt gaaagtgagc tgcaaagcga gcggcggcac ctttagcagc tatgcgatta      360
gctgggtgct ccaggcgccg gcccagggcc tggaatggat gggcggcatt attccgattt      420
ttgacaccgc gaactatgct cagaaatttc agggccgcgt gaccattacc gcggatgaaa      480
gcaccagcac cgcgtatatg gaactgagca gcctgcgcag cgaagatacc gcggtgtatt      540
attgcgcgct ccctggtctc gctgaggctt atgatactgg ttccttggac tattggggcc      600
agggcacctt ggtgaccgtg agcagcgctt ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg      660
cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact      720
acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca      780
ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc      840
cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca      900
ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac      960
cacctgccgc agccagctca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga     1020
tctcccgac ccctgaggct acgtgcgtgg tgggtggact gagcgccgaa gaccccgagg     1080
tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg     1140
aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttctg caccaggact     1200
ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca tcctccatcg     1260
agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc     1320
catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggct aaaggcttct     1380
accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga     1440
ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttctctgt ctacagcaag ctcaccgtgg     1500
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc     1560
acaaccacta cagcgagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgatag ttogaattca     1620
ttgatcataa tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca     1680
cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttggtta cttgtttatt     1740
gcagcttata atggttataa ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt     1800
ttttcac                                           1807

```

<210> 258

10

<211> 1105

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN LC1 PTBB30

<400> 258

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgcgg tgctgttaac	60
ggtggagggc agtgtagtct gaggcagtact cggttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa	120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg	180
acacgaagct tgccgccacc atggagacac attctcaggt ctttgatatac atgttgctgt	240
ggttgtcttg tgcgagggga gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga	300
gcccgggcca acgcgcgacc ctgagctgcc gcgcgagcca gagcggtcgc tectacctgg	360
cgtggtatca gcagaaaccg ggccaggcgc cgccgctgct gatctacgac gcgagcaatc	420
gtgcgaccgg cattccggcg cgcttttagcg gctccggtag cggcaccgat tttaccctga	480
ccattagcag cctggaaccg gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcaa cgtaattatt	540
ggcgcgtgac ctttgccagc ggcaacaaag tggaaattaa acgtacgggtg gctgcaccat	600
ctgtcttcat cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt	660
gcctgctgaa taacttttat ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc	720
tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca	780
gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct	840
gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt	900
gtagtgatt cgaatgatca taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt	960
aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt	1020
taacttgctt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac	1080
aaataaagca tttttttcac tgcac	1105

<210> 259

<211> 1789

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN HC2 PTBB30

<400> 259

5

10

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgagg tgctgttaac	60
ggtggaggggc agtgtagtct gagcagtagt cgttgctgcc ggcgcgcgca ccagacataa	120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg	180
acacgaagct tgccgccacc atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg	240
cccaaagtat acaggccgaa gtgcagctgc tggaaagcgg cggcggcctg gtgcagccgg	300
gcggcagcct gcgcctgagc tgccgggcaa gcggctttac ctttagcagc tatgcgatga	360
gctgggtgag ccaggcgccg ggcaaaggcc tggaaagggt gagcgcgatt agcggcagcg	420
gcggcagcac ctattatgag gatagcgtga aaggccgctt taccattagc cgcgataaca	480
gcaaaaacac cctgtatctg cagatgaaca gcctgcgcgc ggaagatacc gcggtgtatt	540
attgcgcgaa atccccgtac gcgcccttgg actattgggg ccagggcacc ctggtgaccg	600
tgagcagcgc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggccgcctgc tccaggagca	660
cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga	720
cgggtgtcgtg gaactcaggc gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac	780
agtcctcagg actctaactc ctccagcagc tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca	840
cccagacctc cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag	900
ttgagcgcaa atgttgtgtc gagtgcaccac cgtgccagc accacctgcc gcagccagct	960
cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg	1020
tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagcgccg aagacccga ggtccagttc aactggtacg	1080
tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccagc ggaggagcag ttcaacagca	1140
cgttccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtt tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt	1200
acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc catcctccat cgagaaaacc atctccaaaa	1260
ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga	1320
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg	1380
tggagtgagg gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg	1440
actccgacgg ctcttcttc ctctacagcc ggctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc	1500
aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga	1560
agagcctctc cctgtctccg ggtaaatgat agttcgaatt cattgatcat aatcagccat	1620
accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg	1680
aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac	1740
aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcac	1789

<210> 260

5 <211> 1105

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> ADN LC2 PTBB30

10 <400> 260

```

cagctgagtt gttgtgttct gataagagtc agaggtaact cccgttgagg tgctgttaac      60
ggtggagggc agttagtctt gagcagtagt cgttgctgcc gcgcgcgcca ccagacataa      120
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg      180
acacgaagct tgccgccacc atggagacac attctcaggt ctttgatatac atgttgctgt      240
ggttgctctg tgctcagggg gaaattgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctga      300
gcccgggcga acgcgcgacc cttagctgcc gtgcaagtca gagtgtgaac gactacctgg      360
cgtggtatca gcagaaaccg ggccaggcgc cgcgcctgct gatttatgat gcgagcaacc      420
gcgcgaccgg cattccggcg cgctttagcg gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga      480
ccattagcag cctggaaccg gaagattttg cgggtgtatta ttgccagcag ggtggtcacg      540
cgccgatcac ctttggccag ggacacaaag tggaaattaa acgtacgggtg gctgcacat      600
ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt      660
gcctgctgaa taactttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc      720
tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca      780
gcctcagcag caccctgacg ctgagcgaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct      840
gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt      900
gttagtgatt cgaatgatca taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt      960
aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttggtgt      1020
taacttggtt attgcagctt ataatgggtt caaataaagc aatagcatca caaatttcac      1080
aaataaagca tttttttcac tgcac                                     1105

```

<210> 261

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 261

```

Trp Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu
1           5           10           15

```

<210> 262

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 262

```

Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr
1           5

```

<210> 263

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 263

```

Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe
1           5           10

```

20 <210> 264

<211> 306

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 264

Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu Pro
1 5 10 15

Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val Val
20 25 30

Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu Gly
35 40 45

Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr Ser
50 55 60

Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr Gly
85 90 95
Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala Asn
100 105 110

Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn Val
115 120 125

Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro Lys
130 135 140

Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr Asp
145 150 155 160

Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp Val
165 170 175

Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met Thr
180 185 190

Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile Pro
210 215 220

Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val Ile Ile Cys Val Met Val Phe
225 230 235 240

Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn Ser
245 250 255

Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln Thr
260 265 270

Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala Gln
275 280 285

Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp Thr
290 295 300

Cys Phe
305

268

5

10

<210> 266
<211> 202
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 266

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn
1 5 10 15

Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
20 25 30

Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys
35 40 45

Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
50 55 60

Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
85 90 95

Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
100 105 110

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
115 120 125

Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val
130 135 140

Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
145 150 155 160

Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
165 170 175

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
180 185 190

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
195 200

<210> 267

<211> 179

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 267

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

270

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly
1 5 10 15

Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys
20 25 30

Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr
35 40 45

Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His
50 55 60

Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp
65 70 75 80

His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro
85 90 95

Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu
100 105 110

Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala
115 120 125

Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu
130 135 140

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
145 150 155 160

Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
165 170 175

Val Thr Leu

<210> 268

<211> 284

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 268

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

```

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
  20                               25                      30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
  35                               40                      45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
  50                               55                      60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
  65                               70                      75                      80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
  85                               90                      95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
 100                               105                      110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
 115                               120                      125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
 130                               135                      140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
 145                               150                      155                      160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
 165                               170                      175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
 180                               185                      190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
 195                               200                      205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
 210                               215                      220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr Trp Ser
 225                               230                      235                      240

Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala Ile Gly
 245                               250                      255

Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly Ala Trp
 260                               265                      270

Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val
 275                               280

```

<210> 269

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 269

Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu Gln Val Arg Gln Gly Ser
1 5 10 15

Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln Ala Thr Ala Trp Glu Arg
20 25 30

Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala Ile Leu Cys Gln Pro Tyr
35 40 45

Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val Cys Gly Pro Gln Gly Arg
50 55 60

Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr Leu Gln Leu Asp Pro Val
65 70 75 80

Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys Trp Ala Ala Val Glu Ile
85 90 95

Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile Thr Arg Leu Phe Val Asp
100 105 110

Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg Ile Ala Ser Phe Pro Gly
115 120 125

Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser Met Gly Val Ala Ala Ile
130 135 140

Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg Ser Cys Gln Gln Arg Asp
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Pro Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Asn Val Leu Tyr Arg
165 170 175

Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu Gly Lys
180 185 190

Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Phe Pro Gln Pro Ala
195 200 205
Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro
210 215 220

Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg Val Ser
225 230 235 240

Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe Pro Lys
245 250 255

Val Gly Glu Glu
260

<210> 270

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 270

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln
 1 5 10 15
 Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr
 20 25 30
 Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
 35 40 45
 Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
 50 55 60
 Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
 65 70 75 80
 Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
 85 90 95
 Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
 100 105 110
 Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val
 115 120 125
 Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp
 130 135 140
 Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn
 145 150 155 160
 Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg Ala Leu Val
 165 170 175
 Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile Leu Leu Val Leu
 180 185 190
 Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro His
 195 200 205
 Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly
 210 215 220
 Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro
 225 230 235 240
 Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg
 245 250 255

Gln
 <210> 271
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 271

Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys
20 25 30

Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met
35 40 45

Cys Val Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys
50 55 60

Arg His His Pro Cys Pro Pro Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys
65 70 75 80

Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser
85 90 95

Gly Gly His Glu Gly His Cys Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe
100 105 110

Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys
115 120 125

Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val
130 135 140

Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu
145 150 155 160

Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu
165 170 175

Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser
180 185 190

Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys
195 200 205

Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val
210 215

<210> 272

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 272

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 273

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 273

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

276

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 274

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 274

5

Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro Gln Gln Asp
 20 25 30

Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu
 35 40 45

His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly
 50 55 60

Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr
 65 70 75 80

Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser
 85 90 95

Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly
 100 105 110

Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr
 115 120 125

Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp
 130 135 140

Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
 145 150 155

<210> 275

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 275

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser
115 120 125

Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg
130 135 140

Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg
145 150 155 160

Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser
165 170 175

Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser
180 185 190

Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe
195 200 205

Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser
210 215 220

Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
225 230 235 240

<210> 276

<211> 393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 276

Gln	Gly	Gly	Thr	Arg	Ser	Pro	Arg	Cys	Asp	Cys	Ala	Gly	Asp	Phe	His	1	5	10	15
Lys	Lys	Ile	Gly	Leu	Phe	Cys	Cys	Arg	Gly	Cys	Pro	Ala	Gly	His	Tyr	20	25	30	
Leu	Lys	Ala	Pro	Cys	Thr	Glu	Pro	Cys	Gly	Asn	Ser	Thr	Cys	Leu	Val	35	40	45	
Cys	Pro	Gln	Asp	Thr	Phe	Leu	Ala	Trp	Glu	Asn	His	His	Asn	Ser	Glu	50	55	60	
Cys	Ala	Arg	Cys	Gln	Ala	Cys	Asp	Glu	Gln	Ala	Ser	Gln	Val	Ala	Leu	65	70	75	80
Glu	Asn	Cys	Ser	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Arg	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Gly	85	90	95	
Trp	Phe	Val	Glu	Cys	Gln	Val	Ser	Gln	Cys	Val	Ser	Ser	Ser	Pro	Phe	100	105	110	
Tyr	Cys	Gln	Pro	Cys	Leu	Asp	Cys	Gly	Ala	Leu	His	Arg	His	Thr	Arg	115	120	125	
Leu	Leu	Cys	Ser	Arg	Arg	Asp	Thr	Asp	Cys	Gly	Thr	Cys	Leu	Pro	Gly	130	135	140	
Phe	Tyr	Glu	His	Gly	Asp	Gly	Cys	Val	Ser	Cys	Pro	Thr	Ser	Thr	Leu	145	150	155	160

280

Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met
165 170 175

Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu
180 185 190

Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro
195 200 205

Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro
210 215 220

Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro
225 230 235 240

Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser
245 250 255

Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val
260 265 270

Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala
275 280 285

Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met
290 295 300

Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala
305 310 315 320

Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu
325 330 335

Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr
340 345 350

Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala
355 360 365

Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp
370 375 380

Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro
385 390

<210> 277

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 277

281

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln
1 5 10 15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser
20 25 30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Met Gly
35 40 45

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
50 55 60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
85 90 95

His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
100 105 110

Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
115 120 125

His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
130 135 140

Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
145 150 155 160

Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
165 170 175

Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser
180 185 190

Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
195 200 205

Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
210 215 220

Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
225 230 235 240

<210> 278

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 278

Met Thr Leu His Pro Ser Pro Ile Thr Cys Glu Phe Leu Phe Ser Thr
1 5 10 15

Ala Leu Ile Ser Pro Lys Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro
20 25 30

Leu Ser His Ser Arg Thr Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu
35 40 45

Trp Leu Phe Cys Ser Ile Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser
50 55 60

Trp Leu Ile Phe Ile Phe Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys
65 70 75 80

Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser
85 90 95

Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn
115 120 125

Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp
130 135 140

Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly
145 150 155 160

Thr Tyr Glu Leu His Val Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser
165 170 175

Glu His Gln Val Leu Lys Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu
180 185 190

Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser
195

<210> 279

<211> 277

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 279

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 280

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 280

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met
145 150 155 160

Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr
165 170 175

His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile
180 185 190

Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala
195 200 205

Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser
210 215 220

Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys His Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu
225 230 235 240

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
245 250 255

Ala Cys Ser Pro
260

5

<210> 281

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 281

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

285

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 282

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 282

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
1 5 10 15

Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
20 25 30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
35 40 45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
50 55 60

Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Ala Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
65 70 75 80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
85 90 95

Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
100 105 110

Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
115 120 125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
130 135 140

Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
145 150 155 160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
165 170 175

Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr
180 185 190

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
210 215

<210> 283

<211> 194

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 283

Gln Gly His Leu Val His Met Thr Val Val Ser Gly Ser Asn Val Thr
1 5 10 15

Leu Asn Ile Ser Glu Ser Leu Pro Glu Asn Tyr Lys Gln Leu Thr Trp
20 25 30

Phe Tyr Thr Phe Asp Gln Lys Ile Val Glu Trp Asp Ser Arg Lys Ser
35 40 45

Lys Tyr Phe Glu Ser Lys Phe Lys Gly Arg Val Arg Leu Asp Pro Gln
50 55 60

Ser Gly Ala Leu Tyr Ile Ser Lys Val Gln Lys Glu Asp Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Met Arg Val Leu Lys Lys Thr Gly Asn Glu Gln Glu Trp Lys
85 90 95

Ile Lys Leu Gln Val Leu Asp Pro Val Pro Lys Pro Val Ile Lys Ile
100 105 110

Glu Lys Ile Glu Asp Met Asp Asp Asn Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Cys
115 120 125

Val Ile Pro Gly Glu Ser Val Asn Tyr Thr Trp Tyr Gly Asp Lys Arg
130 135 140

Pro Phe Pro Lys Glu Leu Gln Asn Ser Val Leu Glu Thr Thr Leu Met
145 150 155 160

Pro His Asn Tyr Ser Arg Cys Tyr Thr Cys Gln Val Ser Asn Ser Val
165 170 175

Ser Ser Lys Asn Gly Thr Val Cys Leu Ser Pro Pro Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Ser

<210> 284

<211> 318

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 284

Glu Glu Val Leu Trp His Thr Ser Val Pro Phe Ala Glu Asn Met Ser
1 5 10 15

Leu Glu Cys Val Tyr Pro Ser Met Gly Ile Leu Thr Gln Val Glu Trp
20 25 30

Phe Lys Ile Gly Thr Gln Gln Asp Ser Ile Ala Ile Phe Ser Pro Thr
35 40 45

His Gly Met Val Ile Arg Lys Pro Tyr Ala Glu Arg Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Asn Ser Thr Met Ala Ser Asn Asn Met Thr Leu Phe Phe Arg Asn Ala
65 70 75 80

Ser Glu Asp Asp Val Gly Tyr Tyr Ser Cys Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro
85 90 95

Gln Gly Thr Trp Gln Lys Val Ile Gln Val Val Gln Ser Asp Ser Phe
100 105 110
Glu Ala Ala Val Pro Ser Asn Ser His Ile Val Ser Glu Pro Gly Lys
115 120 125

Asn Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Met Thr Trp Pro Val Gln Ala
130 135 140

Val Arg Trp Glu Lys Ile Gln Pro Arg Gln Ile Asp Leu Leu Thr Tyr
145 150 155 160

Cys Asn Leu Val His Gly Arg Asn Phe Thr Ser Lys Phe Pro Arg Gln
165 170 175

Ile Val Ser Asn Cys Ser His Gly Arg Trp Ser Val Ile Val Ile Pro
180 185 190

Asp Val Thr Val Ser Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Tyr Leu Gln Ala
195 200 205

Ser Ala Gly Glu Asn Glu Thr Phe Val Met Arg Leu Thr Val Ala Glu
210 215 220

Gly Lys Thr Asp Asn Gln Tyr Thr Leu Phe Val Ala Gly Gly Thr Val
225 230 235 240

Leu Leu Leu Leu Phe Val Ile Ser Ile Thr Thr Ile Ile Val Ile Phe
245 250 255

Leu Asn Arg Arg Arg Arg Arg Glu Arg Arg Asp Leu Phe Thr Glu Ser
260 265 270

Trp Asp Thr Gln Lys Ala Pro Asn Asn Tyr Arg Ser Pro Ile Ser Thr
275 280 285

Ser Gln Pro Thr Asn Gln Ser Met Asp Asp Thr Arg Glu Asp Ile Tyr
290 295 300

Val Asn Tyr Pro Thr Phe Ser Arg Arg Pro Lys Thr Arg Val
305 310 315

<210> 285

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 285

Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly
1 5 10 15

Ser Val Gln Ser Gly Phe Leu Thr Glu Val His Leu Asp Gly Gln Pro
20 25 30

Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gln Lys Cys Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln
35 40 45

Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg
50 55 60

Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu Arg Met Thr Leu Ala His Ile
65 70 75 80

Lys Asp Gln Lys Glu Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys
85 90 95

Glu Ile His Glu Asp Asn Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr
100 105 110

Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr
115 120 125

Met Pro Gln Ser Ser Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn
130 135 140

Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met
145 150 155 160

His Ala Asp Cys Leu Gln Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val
165 170 175

Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu
180 185 190

Ala Ser Glu Gly Asn Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr
195 200 205

Pro Trp Asn Ile Thr Leu Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser
210 215 220

His Asp Thr Gln Gln Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Thr Trp Val Ala Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255

Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val

260

265

270

Pro Ser Gly Lys Val Leu Val Leu Gln Ser His Trp Gln Thr Phe His
 275 280 285

Val Ser Ala Val Ala Ala Ala Ala Ile Phe Val Ile Ile Ile Phe Tyr
 290 295 300

Val Arg Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly Pro Glu Leu
 305 310 315 320

Val Ser Leu Gln Val Leu Asp Gln His Pro Val Gly Thr Ser Asp His
 325 330 335

Arg Asp Ala Thr Gln Leu Gly Phe Gln Pro Leu Met Ser Asp Leu Gly
 340 345 350

Ser Thr Gly Ser Thr Glu Gly Ala
 355 360

<210> 286

<211> 279

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 286

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
 1 5 10 15

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His
 20 25 30

Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
 35 40 45

Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp
 50 55 60

Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Asn Thr Ser His Asp
 65 70 75 80

Leu Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly Asn
 85 90 95

Phe Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu Tyr
 100 105 110

Cys Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His His His Ser Glu His Arg Val

115

120

125

His Gly Ala Met Glu Leu Gln Val Gln Thr Gly Lys Asp Ala Pro Ser
130 135 140

Asn Cys Val Val Tyr Pro Ser Ser Ser Gln Asp Ser Glu Asn Ile Thr
145 150 155 160

Ala Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu
165 170 175

Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Ala Ser Asn
180 185 190

Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Asn Ile Gln Gly Ile
195 200 205

Glu Asn Pro Gly Phe Glu Ala Ser Pro Pro Ala Gln Gly Ile Pro Glu
210 215 220

Ala Lys Val Arg His Pro Leu Ser Tyr Val Ala Gln Arg Gln Pro Ser
225 230 235 240

Glu Ser Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro
245 250 255

Pro Gly Pro Gly Asp Val Phe Phe Pro Ser Leu Asp Pro Val Pro Asp
260 265 270

Ser Pro Asn Phe Glu Val Ile
275

<210> 287

<211> 432

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 287

Lys Gln Ser Glu Asp Phe Arg Val Ile Gly Pro Ala His Pro Ile Leu
1 5 10 15

Ala Gly Val Gly Glu Asp Ala Leu Leu Thr Cys Gln Leu Leu Pro Lys
20 25 30

Arg Thr Thr Met His Val Glu Val Arg Trp Tyr Arg Ser Glu Pro Ser
35 40 45

Thr Pro Val Phe Val His Arg Asp Gly Val Glu Val Thr Glu Met Gln

50					55					60					
Met	Glu	Glu	Tyr	Arg	Gly	Trp	Val	Glu	Trp	Ile	Glu	Asn	Gly	Ile	Ala
65					70					75					80
Lys	Gly	Asn	Val	Ala	Leu	Lys	Ile	His	Asn	Ile	Gln	Pro	Ser	Asp	Asn
				85					90					95	
Gly	Gln	Tyr	Trp	Cys	His	Phe	Gln	Asp	Gly	Asn	Tyr	Cys	Gly	Glu	Thr
			100					105					110		
Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Leu	Gly	Ser	Ala	Pro	Ser	Ile	His
	115						120					125			
Met	Glu	Gly	Pro	Gly	Glu	Ser	Gly	Val	Gln	Leu	Val	Cys	Thr	Ala	Arg
	130						135				140				
Gly	Trp	Phe	Pro	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Trp	Glu	Asp	Ile	Arg	Gly	Glu
145					150					155					160
Lys	Leu	Leu	Ala	Val	Ser	Glu	His	Arg	Ile	Gln	Asp	Lys	Asp	Gly	Leu
				165					170					175	
Phe	Tyr	Ala	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Val	Arg	Asn	Ala	Ser	Ala	Glu	Ser
			180					185					190		
Val	Ser	Cys	Leu	Val	His	Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser
		195					200					205			
Val	Ile	Ser	Leu	Pro	Glu	Lys	Leu	Gln	Thr	Glu	Leu	Ala	Ser	Leu	Lys
	210					215					220				
Val	Asn	Gly	Pro	Ser	Gln	Pro	Ile	Leu	Val	Arg	Val	Gly	Glu	Asp	Ile
225					230					235					240
Gln	Leu	Thr	Cys	Tyr	Leu	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Ala	Gln	Ser	Met	Glu
				245					250					255	
Val	Arg	Trp	Asp	Arg	Ser	His	Arg	Tyr	Pro	Ala	Val	His	Val	Tyr	Met
			260					265					270		
Asp	Gly	Asp	His	Val	Ala	Gly	Glu	Gln	Met	Ala	Glu	Tyr	Arg	Gly	Arg
		275					280					285			
Thr	Val	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ile	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Gln
	290					295					300				

Ile Leu Ser Ala Arg Pro Ser Asp Asp Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Phe
305 310 315 320

Glu Lys Asp Asp Val Tyr Gln Glu Ala Ser Leu Asp Leu Lys Val Val
325 330 335

Ser Leu Gly Ser Ser Pro Leu Ile Thr Val Glu Gly Gln Glu Asp Gly
340 345 350

Glu Met Gln Pro Met Cys Ser Ser Asp Gly Trp Phe Pro Gln Pro His
355 360 365

Val Pro Trp Arg Asp Met Glu Gly Lys Thr Ile Pro Ser Ser Ser Gln
370 375 380

Ala Leu Thr Gln Gly Ser His Gly Leu Phe His Val Gln Thr Leu Leu
385 390 395 400

Arg Val Thr Asn Ile Ser Ala Val Asp Val Thr Cys Ser Ile Ser Ile
405 410 415

Pro Phe Leu Gly Glu Glu Lys Ile Ala Thr Phe Ser Leu Ser Gly Trp
420 425 430

<210> 288

<211> 506

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 288

Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1 5 10 15

Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
35 40 45

His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
50 55 60

Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val
85 90 95

```

Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
    100                      105                      110

Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
    115                      120                      125

Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
    130                      135                      140

Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
    145                      150                      155                      160

Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val
    165                      170                      175

His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
    180                      185                      190

Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr
    195                      200                      205

Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro
    210                      215                      220

Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys
    225                      230                      235                      240

Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile
    245                      250                      255

Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly
    260                      265                      270

Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp
    275                      280                      285

Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val
    290                      295                      300

Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly
    305                      310                      315                      320

Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser
    325                      330                      335

Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr
    340                      345                      350

```

Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp
355 360 365

Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln
370 375 380

Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val
385 390 395 400

Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val
405 410 415

Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met
420 425 430

Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys
435 440 445

Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile
450 455 460

Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly
465 470 475 480

Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp
485 490 495

Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
500 505

<210> 289

<211> 258

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 289

Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr
1 5 10 15

Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys
20 25 30

Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu
35 40 45

Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp
50 55 60

Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe
65 70 75 80

Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val
85 90 95

Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys
100 105 110

Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met
115 120 125

Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys
130 135 140

Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln
145 150 155 160

Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu
165 170 175

Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn
180 185 190

Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala
195 200 205

Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg
210 215 220

Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser
225 230 235 240

Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met
245 250 255

Leu Lys

<210> 290

<211> 245

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 290

Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys
1 5 10 15

Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu
20 25 30

Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His
35 40 45

Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Asp Pro Ala
50 55 60

Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val
65 70 75 80

Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile Val Gln Asp Gly Asp His
85 90 95

Cys Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Ala Thr Ser Ser Pro Gly Gln Arg Val
100 105 110

Gln Lys Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Thr Leu Cys Gln Asn Cys Pro
115 120 125

Pro Gly Thr Phe Ser Pro Asn Gly Thr Leu Glu Glu Cys Gln His Gln
130 135 140

Thr Lys Cys Ser Trp Leu Val Thr Lys Ala Gly Ala Gly Thr Ser Ser
145 150 155 160

Ser His Trp Val Trp Trp Phe Leu Ser Gly Ser Leu Val Ile Val Ile
165 170 175

Val Cys Ser Thr Val Gly Leu Ile Ile Cys Val Lys Arg Arg Lys Pro
180 185 190

Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln
195 200 205

Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile Glu Ala Leu Gln Ala Pro Pro
210 215 220

Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly
225 230 235 240

Arg Ser Pro Asn His
245

<210> 291

<211> 392

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 291

```

Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val Pro Met Asn Glu Gln Ile
1          5          10          15

Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile Leu Pro Ser Ser Phe Glu
          20          25          30

Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys
          35          40          45

Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His Leu Glu Ser Gln Asp Pro
          50          55          60

Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr Asn Glu Ile Gln Asn Gly
65          70          75          80

Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser Leu Leu Asp Glu Gly Ile
          85          90          95

Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln Val Ile Thr Asn Lys Val
          100          105          110

Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro Val Met Lys Tyr Glu Lys
          115          120          125

Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser Val Leu Ser Val Tyr Pro
          130          135          140

Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn Thr Pro Ile Ser Glu Asn
145          150          155          160

Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser Phe Ser Ile Asn Ser Pro
          165          170          175

Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr Glu Cys Thr Ile Glu Asn
          180          185          190

Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg Trp Thr Met Lys Asp Gly
          195          200          205

Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser Leu Ser Cys Gln Pro Val
          210          215          220

Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe Lys Val Thr Trp Ser Arg
225          230          235          240

```

Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser
245 250 255

Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe Ser Trp Asn Lys Glu Leu
260 265 270

Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu Met Asp Leu Asn Leu Ser
275 280 285

Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser Ser Asp Glu Tyr Thr Leu
290 295 300

Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro Ser Gln Glu Thr Ala Ser
305 310 315 320

His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ala Ile Leu Ala Ala
325 330 335

Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys Arg Ala Gln Leu Glu Ala
340 345 350

Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala Gln Gln Glu Arg Cys Cys
355 360 365

Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala Pro Asp Asn Gly Glu Glu
370 375 380

Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
385 390

<210> 292

<211> 188

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 292

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
50 55 60

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

300

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu
115 120 125

Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe
130 135 140

Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro
145 150 155 160

Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys
165 170 175

Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
180 185

<210> 293

<211> 497

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 293

Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
1 5 10 15

Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
20 25 30

Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
35 40 45

Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
50 55 60

Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
65 70 75 80

Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
85 90 95

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

301

Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
115 120 125

Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
130 135 140

Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
145 150 155 160

Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
165 170 175

Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
180 185 190

Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
195 200 205

Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
210 215 220

Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
225 230 235 240

Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
245 250 255

Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
260 265 270

Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe
275 280 285

Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
290 295 300

Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu
305 310 315 320

Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
325 330 335

Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe

340

345

350

Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
355 360 365

Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys
370 375 380

Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
385 390 395 400

Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
405 410 415

Leu Pro Ala Gly His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser
420 425 430

Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg
435 440 445

Gln Trp Arg Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro
450 455 460

Pro Gln Ala Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro
465 470 475 480

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln
485 490 495

Leu

<210> 294

<211> 259

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 294

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His
1 5 10 15

Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr
20 25 30

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr
35 40 45

Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn

50

55

60

Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn
65 70 75 80

Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser
85 90 95

His Ser Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg
100 105 110

Pro Ser Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu
115 120 125

Leu Pro Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu
130 135 140

Phe Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp
145 150 155 160

Thr Ala Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu
165 170 175

Gln Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu
180 185 190

Thr Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu
195 200 205

Gly Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly
210 215 220

Ile Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg
225 230 235 240

Leu Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys
245 250 255

Val Arg Ser

<210> 295

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 295

Ile Asn Ile Thr Ser Ser Ala Ser Gln Glu Gly Thr Arg Leu Asn Leu

1

5

10

15

Ile Cys Thr Val Trp His Lys Lys Glu Glu Ala Glu Gly Phe Val Val
20 25 30

Phe Leu Cys Lys Asp Arg Ser Gly Asp Cys Ser Pro Glu Thr Ser Leu
35 40 45

Lys Gln Leu Arg Leu Lys Arg Asp Pro Gly Ile Asp Gly Val Gly Glu
50 55 60

Ile Ser Ser Gln Leu Met Phe Thr Ile Ser Gln Val Thr Pro Leu His
65 70 75 80

Ser Gly Thr Tyr Gln Cys Cys Ala Arg Ser Gln Lys Ser Gly Ile Arg
85 90 95

Leu Gln Gly His Phe Phe Ser Ile Leu Phe Thr Glu Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Val Thr Gly Leu Lys Gln Arg Gln His Leu Glu Phe Ser His Asn
115 120 125

Glu Gly Thr Leu Ser
130

<210> 296

<211> 492

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 296

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

305

85

90

95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
 180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
 195 200 205

Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn
 225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255

Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser Val Thr
 260 265 270

Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu Leu Ser
 275 280 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
 290 295 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
 305 310 315 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
 325 330 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
340 345 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
355 360 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
370 375 380

Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly Ile Val
385 390 395 400

Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu Ala Cys
405 410 415

Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg Asp Leu
420 425 430

Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His Ser Asn
435 440 445

Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu Asn Phe
450 455 460

Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser Leu Thr
465 470 475 480

Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
485 490

<210> 297

<211> 266

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 297

Gln Glu Glu Asp Leu Pro Arg Pro Ser Ile Ser Ala Glu Pro Gly Thr
1 5 10 15

Val Ile Pro Leu Gly Ser His Val Thr Phe Val Cys Arg Gly Pro Val
20 25 30

Gly Val Gln Thr Phe Arg Leu Glu Arg Glu Ser Arg Ser Thr Tyr Asn
35 40 45

Asp Thr Glu Asp Val Ser Gln Ala Ser Pro Ser Glu Ser Glu Ala Arg
50 55 60

Phe Arg Ile Asp Ser Val Ser Glu Gly Asn Ala Gly Pro Tyr Arg Cys
65 70 75 80

Ile Tyr Tyr Lys Pro Pro Lys Trp Ser Glu Gln Ser Asp Tyr Leu Glu
85 90 95

Leu Leu Val Lys Glu Thr Ser Gly Gly Pro Asp Ser Pro Asp Thr Glu
100 105 110

Pro Gly Ser Ser Ala Gly Pro Thr Gln Arg Pro Ser Asp Asn Ser His
115 120 125

Asn Glu His Ala Pro Ala Ser Gln Gly Leu Lys Ala Glu His Leu Tyr
130 135 140

Ile Leu Ile Gly Val Ser Val Val Phe Leu Phe Cys Leu Leu Leu Leu
145 150 155 160

Val Leu Phe Cys Leu His Arg Gln Asn Gln Ile Lys Gln Gly Pro Pro
165 170 175

Arg Ser Lys Asp Glu Glu Gln Lys Pro Gln Gln Arg Pro Asp Leu Ala
180 185 190

Val Asp Val Leu Glu Arg Thr Ala Asp Lys Ala Thr Val Asn Gly Leu
195 200 205

Pro Glu Lys Asp Arg Glu Thr Asp Thr Ser Ala Leu Ala Ala Gly Ser
210 215 220

Ser Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu Asp His Trp Ala Leu Thr Gln
225 230 235 240

Arg Thr Ala Arg Ala Val Ser Pro Gln Ser Thr Lys Pro Met Ala Glu
245 250 255

Ser Ile Thr Tyr Ala Ala Val Ala Arg His
260 265

<210> 298

<211> 390

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 298

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
 20 25 30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
 35 40 45

Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
 50 55 60

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
 85 90 95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
 100 105 110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
 115 120 125

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
 145 150 155 160

Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn
 165 170 175

Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
 180 185 190

Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
 195 200 205

Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
 210 215 220

Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
 225 230 235 240

Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro
 245 250 255

Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln
 260 265 270

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
275 280 285

Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
290 295 300

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
305 310 315 320

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
325 330 335

Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
340 345 350

Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
355 360 365

Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
370 375 380

Arg Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 299

<211> 160

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 299

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
20 25 30

Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
35 40 45

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 100 105 110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 115 120 125

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
 130 135 140

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 145 150 155 160

<210> 300

<211> 564

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 300

Val Trp Glu Lys Thr Val Asn Thr Glu Glu Asn Val Tyr Ala Thr Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Asp Val Asn Leu Thr Cys Gln Thr Gln Thr Val Gly Phe Phe
 20 25 30

Val Gln Met Gln Trp Ser Lys Val Thr Asn Lys Ile Asp Leu Ile Ala
 35 40 45

Val Tyr His Pro Gln Tyr Gly Phe Tyr Cys Ala Tyr Gly Arg Pro Cys
 50 55 60

Glu Ser Leu Val Thr Phe Thr Glu Thr Pro Glu Asn Gly Ser Lys Trp
 65 70 75 80

Thr Leu His Leu Arg Asn Met Ser Cys Ser Val Ser Gly Arg Tyr Glu
 85 90 95

Cys Met Leu Val Leu Tyr Pro Glu Gly Ile Gln Thr Lys Ile Tyr Asn
 100 105 110

Leu Leu Ile Gln Thr His Val Thr Ala Asp Glu Trp Asn Ser Asn His
 115 120 125

Thr Ile Glu Ile Glu Ile Asn Gln Thr Leu Glu Ile Pro Cys Phe Gln
 130 135 140

Asn Ser Ser Ser Lys Ile Ser Ser Glu Phe Thr Tyr Ala Trp Ser Val
 145 150 155 160

Glu Asn Ser Ser Thr Asp Ser Trp Val Leu Leu Ser Lys Gly Ile Lys
 165 170 175

Glu Asp Asn Gly Thr Gln Glu Thr Leu Ile Ser Gln Asn His Leu Ile
 180 185 190

Ser Asn Ser Thr Leu Leu Lys Asp Arg Val Lys Leu Gly Thr Asp Tyr
 195 200 205

Arg Leu His Leu Ser Pro Val Gln Ile Phe Asp Asp Gly Arg Lys Phe
 210 215 220

Ser Cys His Ile Arg Val Gly Pro Asn Lys Ile Leu Arg Ser Ser Thr
 225 230 235 240

Thr Val Lys Val Phe Ala Lys Pro Glu Ile Pro Val Ile Val Glu Asn
 245 250 255

Asn Ser Thr Asp Val Leu Val Glu Arg Arg Phe Thr Cys Leu Leu Lys
 260 265 270

Asn Val Phe Pro Lys Ala Asn Ile Thr Trp Phe Ile Asp Gly Ser Phe
 275 280 285

Leu His Asp Glu Lys Glu Gly Ile Tyr Ile Thr Asn Glu Glu Arg Lys
 290 295 300

Gly Lys Asp Gly Phe Leu Glu Leu Lys Ser Val Leu Thr Arg Val His
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Pro Ala Gln Ser Asp Asn Leu Thr Ile Trp Cys Met Ala
 325 330 335

Leu Ser Pro Val Pro Gly Asn Lys Val Trp Asn Ile Ser Ser Glu Lys
 340 345 350

Ile Thr Phe Leu Leu Gly Ser Glu Ile Ser Ser Thr Asp Pro Pro Leu
 355 360 365

Ser Val Thr Glu Ser Thr Leu Asp Thr Gln Pro Ser Pro Ala Ser Ser
 370 375 380

Val Ser Pro Ala Arg Tyr Pro Ala Thr Ser Ser Val Thr Leu Val Asp
 385 390 395 400

Val Ser Ala Leu Arg Pro Asn Thr Thr Pro Gln Pro Ser Asn Ser Ser
 405 410 415

Met Thr Thr Arg Gly Phe Asn Tyr Pro Trp Thr Ser Ser Gly Thr Asp
420 425 430

Thr Lys Lys Ser Val Ser Arg Ile Pro Ser Glu Thr Tyr Ser Ser Ser
435 440 445

Pro Ser Gly Ala Gly Ser Thr Leu His Asp Asn Val Phe Thr Ser Thr
450 455 460

Ala Arg Ala Phe Ser Glu Val Pro Thr Thr Ala Asn Gly Ser Thr Lys
465 470 475 480

Thr Asn His Val His Ile Thr Gly Ile Val Val Asn Lys Pro Lys Asp
485 490 495

Gly Met Ser Trp Pro Val Ile Val Ala Ala Leu Leu Phe Cys Cys Met
500 505 510

Ile Leu Phe Gly Leu Gly Val Arg Lys Trp Cys Gln Tyr Gln Lys Glu
515 520 525

Ile Met Glu Arg Pro Pro Pro Phe Lys Pro Pro Pro Pro Pro Ile Lys
530 535 540

Tyr Thr Cys Ile Gln Glu Pro Asn Glu Ser Asp Leu Pro Tyr His Glu
545 550 555 560

Met Glu Thr Leu

<210> 301

<211> 223

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 301

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr
115 120 125

Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg
130 135 140

Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg
145 150 155 160

Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu
180 185 190

Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu
195 200 205

Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly
210 215 220

<210> 302

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 302

Met Asp Asn Gln Gly Val Ile Tyr Ser Asp Leu Asn Leu Pro Pro Asn
1 5 10 15

Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Asn Ser Ile Leu
20 25 30

Ala Thr Glu Gln Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Leu Gln Lys Ala
35 40 45

Ser Gln Asp Phe Gln Gly Asn Asp Lys Thr Tyr His Cys Lys Asp Leu
50 55 60

Pro Ser Ala Pro Glu Lys Leu Ile Val Gly Ile Leu Gly Ile Ile Cys
65 70 75 80

Leu Ile Leu Met Ala Ser Val Val Thr Ile Val Val Ile Pro Ser Thr
85 90 95

Leu Ile Gln Arg His Asn Asn Ser Ser Leu Asn Thr Arg Thr Gln Lys
100 105 110

Ala Arg His Cys Gly His Cys Pro Glu Glu Trp Ile Thr Tyr Ser Asn
115 120 125

Ser Cys Tyr Tyr Ile Gly Lys Glu Arg Arg Thr Trp Glu Glu Ser Leu
130 135 140

Leu Ala Cys Thr Ser Lys Asn Ser Ser Leu Leu Ser Ile Asp Asn Glu
145 150 155 160

Glu Glu Met Lys Phe Leu Ser Ile Ile Ser Pro Ser Ser Trp Ile Gly
165 170 175

Val Phe Arg Asn Ser Ser His His Pro Trp Val Thr Met Asn Gly Leu
180 185 190

Ala Phe Lys His Glu Ile Lys Asp Ser Asp Asn Ala Glu Leu Asn Cys
195 200 205

Ala Val Leu Gln Val Asn Arg Leu Lys Ser Ala Gln Cys Gly Ser Ser
210 215 220

Ile Ile Tyr His Cys Lys His Lys Leu
225 230

<210> 303

<211> 507

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 303

Gln Asp Val Arg Val Gln Val Leu Pro Glu Val Arg Gly Gln Leu Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Glu Leu Pro Cys His Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Leu
20 25 30

Tyr Ile Ser Leu Val Thr Trp Gln Arg Pro Asp Ala Pro Ala Asn His
35 40 45

Gln Asn Val Ala Ala Phe His Pro Lys Met Gly Pro Ser Phe Pro Ser
 50 55 60

Pro Lys Pro Gly Ser Glu Arg Leu Ser Phe Val Ser Ala Lys Gln Ser
 65 70 75 80

Thr Gly Gln Asp Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ala Thr Leu Ala Leu
 85 90 95

His Gly Leu Thr Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Phe Ala
 100 105 110

Thr Phe Pro Lys Gly Ser Val Arg Gly Met Thr Trp Leu Arg Val Ile
 115 120 125

Ala Lys Pro Lys Asn Gln Ala Glu Ala Gln Lys Val Thr Phe Ser Gln
 130 135 140

Asp Pro Thr Thr Val Ala Leu Cys Ile Ser Lys Glu Gly Arg Pro Pro
 145 150 155 160

Ala Arg Ile Ser Trp Leu Ser Ser Leu Asp Trp Glu Ala Lys Glu Thr
 165 170 175

Gln Val Ser Gly Thr Leu Ala Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Arg Phe
 180 185 190

Thr Leu Val Pro Ser Gly Arg Ala Asp Gly Val Thr Val Thr Cys Lys
 195 200 205

Val Glu His Glu Ser Phe Glu Glu Pro Ala Leu Ile Pro Val Thr Leu
 210 215 220

Ser Val Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asp Asn
 225 230 235 240

Trp Tyr Leu Gly Arg Thr Asp Ala Thr Leu Ser Cys Asp Val Arg Ser
 245 250 255

Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Thr Ser Gly Thr Phe
 260 265 270

Pro Thr Ser Ala Val Ala Gln Gly Ser Gln Leu Val Ile His Ala Val
 275 280 285

Asp Ser Leu Phe Asn Thr Thr Phe Val Cys Thr Val Thr Asn Ala Val

290

295

300

Gly Met Gly Arg Ala Glu Gln Val Ile Phe Val Arg Glu Thr Pro Asn
 305 310 315 320

Thr Ala Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Ile Ile Gly Gly Ile Ile Ala
 325 330 335

Ala Ile Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ile Cys Arg
 340 345 350

Gln Gln Arg Lys Glu Gln Thr Leu Gln Gly Ala Glu Glu Asp Glu Asp
 355 360 365

Leu Glu Gly Pro Pro Ser Tyr Lys Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Leu
 370 375 380

Glu Ala Gln Glu Met Pro Ser Gln Leu Phe Thr Leu Gly Ala Ser Glu
 385 390 395 400

His Ser Pro Leu Lys Thr Pro Tyr Phe Asp Ala Gly Ala Ser Cys Thr
 405 410 415

Glu Gln Glu Met Pro Arg Tyr His Glu Leu Pro Thr Leu Glu Glu Arg
 420 425 430

Ser Gly Pro Leu His Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Ser Pro Ile Pro
 435 440 445

Val Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Glu Asp Val Ser Leu Asp Leu Glu
 450 455 460

Asp Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Tyr Leu Asp Lys Ile Asn Pro
 465 470 475 480

Ile Tyr Asp Ala Leu Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Asp Ser Tyr Gln Gly
 485 490 495

Lys Gly Phe Val Met Ser Arg Ala Met Tyr Val
 500 505

<210> 304

<211> 305

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 304

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

317

1	5	10	15
Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn	20	25	30
Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr	35	40	45
Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser	50	55	60
Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu	65	70	75
Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys	85	90	95
Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys	100	105	110
Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val	115	120	125
Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile	130	135	140
Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr Ile Ala	145	150	155
Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val Gly Ala	165	170	175
Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr Gly Leu	180	185	190
Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His Tyr Tyr	195	200	205
Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala Ile Leu	210	215	220
Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu Ser Leu	225	230	235
Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly	245	250	255

Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys
 260 265 270

Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val
 275 280 285

Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp
 290 295 300

Glu

305

<210> 305

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 305

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro
 20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60

Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
 65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
 85 90 95

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
 115 120 125

Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly
 130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu
 145 150 155 160

```

Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser
      165                      170                      175

Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val
      180                      185                      190

His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp
      195                      200                      205

Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro
      210                      215                      220

Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn
      225                      230                      235                      240

Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr
      245                      250                      255

Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val
      260                      265                      270

Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val
      275                      280                      285

Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu
      290                      295                      300

His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser
      305                      310                      315                      320

Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly
      325                      330                      335

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu
      340                      345                      350

Leu Val Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln
      355                      360                      365

Lys Lys Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu
      370                      375                      380

Lys Asn Ala Arg Glu Ile Thr Gln Asp Thr Asn Asp Ile Thr Tyr Ala
      385                      390                      395                      400

Asp Leu Asn Leu Pro Lys Gly Lys Lys Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu
      405                      410                      415

```

Pro Asn Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Gln Thr Ser Pro Gln Pro
 420 425 430

Ala Ser Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu
 435 440 445

Asn Arg Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser
 450 455 460

Glu Tyr Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys
 465 470

<210> 306

<211> 349

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 306

Cys Gln Gly Ser Ala Asp His Val Val Ser Ile Ser Gly Val Pro Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Gln Pro Asn Ser Ile Gln Thr Lys Val Asp Ser Ile Ala Trp
 20 25 30

Lys Lys Leu Leu Pro Ser Gln Asn Gly Phe His His Ile Leu Lys Trp
 35 40 45

Glu Asn Gly Ser Leu Pro Ser Asn Thr Ser Asn Asp Arg Phe Ser Phe
 50 55 60

Ile Val Lys Asn Leu Ser Leu Leu Ile Lys Ala Ala Gln Gln Gln Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Tyr Cys Leu Glu Val Thr Ser Ile Ser Gly Lys Val Gln
 85 90 95

Thr Ala Thr Phe Gln Val Phe Val Phe Glu Ser Leu Leu Pro Asp Lys
 100 105 110

Val Glu Lys Pro Arg Leu Gln Gly Gln Gly Lys Ile Leu Asp Arg Gly
 115 120 125

Arg Cys Gln Val Ala Leu Ser Cys Leu Val Ser Arg Asp Gly Asn Val
 130 135 140

Ser Tyr Ala Trp Tyr Arg Gly Ser Lys Leu Ile Gln Thr Ala Gly Asn
 145 150 155 160

Leu Thr Tyr Leu Asp Glu Glu Val Asp Ile Asn Gly Thr His Thr Tyr
165 170 175

Thr Cys Asn Val Ser Asn Pro Val Ser Trp Glu Ser His Thr Leu Asn
180 185 190

Leu Thr Gln Asp Cys Gln Asn Ala His Gln Glu Phe Arg Phe Trp Pro
195 200 205

Phe Leu Val Ile Ile Val Ile Leu Ser Ala Leu Phe Leu Gly Thr Leu
210 215 220

Ala Cys Phe Cys Val Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser Glu
225 230 235 240

Thr Ser Pro Lys Glu Phe Leu Thr Ile Tyr Glu Asp Val Lys Asp Leu
245 250 255

Lys Thr Arg Arg Asn His Glu Gln Glu Gln Thr Phe Pro Gly Gly Gly
260 265 270

Ser Thr Ile Tyr Ser Met Ile Gln Ser Gln Ser Ser Ala Pro Thr Ser
275 280 285

Gln Glu Pro Ala Tyr Thr Leu Tyr Ser Leu Ile Gln Pro Ser Arg Lys
290 295 300

Ser Gly Ser Arg Lys Arg Asn His Ser Pro Ser Phe Asn Ser Thr Ile
305 310 315 320

Tyr Glu Val Ile Gly Lys Ser Gln Pro Lys Ala Gln Asn Pro Ala Arg
325 330 335

Leu Ser Arg Lys Glu Leu Glu Asn Phe Asp Val Tyr Ser
340 345

<210> 307

<211> 651

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 307

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
 35 40 45
 Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
 50 55 60
 Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
 65 70 75 80
 Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110
 Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125
 Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140
 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175
 Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
 180 185 190
 Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
 195 200 205
 Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
 210 215 220
 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255
 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
 260 265 270
 Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
 275 280 285

```

Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu
290                               295                               300

Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr
305                               310                               315                               320

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
                               325                               330                               335

Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
                               340                               345                               350

Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser Val Asp
                               355                               360                               365

His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
370                               375                               380

Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
385                               390                               395                               400

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
                               405                               410                               415

Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn
                               420                               425                               430

Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser
435                               440                               445

Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala
450                               455                               460

Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
465                               470                               475                               480

Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
                               485                               490                               495

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
                               500                               505                               510

Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
515                               520                               525

Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser

```

530

535

540

Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
545 550 555 560

Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
565 570 575

Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
580 585 590

Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595 600 605

Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610 615 620

Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
625 630 635 640

Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala
645 650

<210> 308

<211> 355

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 308

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
50 55 60

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
85 90 95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val

MD/EP 3370768 T2 2022.07.31

325

100

105

110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
115 120 125

His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr
130 135 140

Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser
145 150 155 160

Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly
165 170 175

Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile
180 185 190

Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe
195 200 205

Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro
210 215 220

Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser
225 230 235 240

Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile
245 250 255

Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe
260 265 270

Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly
275 280 285

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln
290 295 300

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala
305 310 315 320

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu
325 330 335

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His
340 345 350

Val Gln Thr
355

<210> 309

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Anticorp OX40 al VH

<400> 309

5

10

326

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 310

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Anticorp OX40 al VL

<400> 310

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

10

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 311

<211> 121

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Anticorp OX40 al VH

<400> 311

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 312

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Anticorp OX40 al VL

<400> 312

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- BORCH TROELS H ET AL: "Reorienting the immune system in the treatment of cancer by using anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies", DRUG DISCOVERY TODAY, vol. 20, no. 9, September 2015 (2015-09), pages 1127-1134, XP002791774,
- WO-A1-2012/061448
- WO-A1-2015/112800
- SWAIKA ABHISEK ET AL: "Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 67, no. 2, 5 March 2015 (2015-03-05), pages 4-17, XP029246897, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2015.02.009
- LOTE HAZEL ET AL: "PD-1 and PD-L1 blockade in gastrointestinal malignancies", CANCER TREATMENT REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 10, 21 September 2015 (2015-09-21), pages 893-903, XP029315368, ISSN: 0305-7372, DOI: 10.1016/J.CTRV.2015.09.004
- WO-A1-2015/112900
- FAGHFURI ELNAZ ET AL: "Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma", EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY, FUTURE DRUGS LTD, UK, vol. 15, no. 9, 1 January 2015 (2015-01-01), pages 981-993, XP009194371, ISSN: 1744-8328, DOI: 10.1586/14737140.2015.1074862
- WO-A1-2016/210223
- J. MCDERMOTT ET AL: "Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer", DRUGS OF TODAY, vol. 51, no. 1, 1 January 2015 (2015-01-01), page 7, XP55316850, ES ISSN: 1699-3993, DOI: 10.1358/dot.2015.51.1.2250387
- WO-A2-2014/179664
- R. MOREIRA DA SILVA: "Nivolumab: Anti-PD-1 monoclonal antibody cancer immunotherapy", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 39, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 15-24, XP55199597, ES ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2014.039.01.2103754
- WO-A2-2014/194302
- PANKA D J ET AL: "Defining the structural correlates responsible for loss of arsonate affinity in an Id<CR> antibody isolated from an autoimmune mouse", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 30, no. 11, 1 August 1993 (1993-08-01), pages 1013-1020, XP023969623, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/0161-5890(93)90126-V [retrieved on 1993-08-01]
- US-A1- 2003 040 044
- US-A1- 2003 096 977
- Bj Kobrin ET AL: "A V region mutation in a phosphocholine-binding monoclonal antibody results in loss of antigen binding", The Journal of Immunology, 15 March 1991 (1991-03-15), page 2017, XP055277424, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL:<http://www.jimmunol.org/content/146/6/2017.full.pdf>
- CHIEN N C ET AL: "Significant structural and functional change of an antigen-binding site by a distant amino acid substitution: Proposal of a structural mechanism", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 86, no. 14, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 5532-5536, XP009187738, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.86.14.5532
- US-A1- 2003 226 155
- US-A1- 2004 133 357
- RUDIKOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979
- US-A1- 2005 009 136
- WINKLER K ET AL: "Changing the antigen binding specificity by single point mutations of an anti-p24 (HIV-1) antibody", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 165, no. 8, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 4505-4514, XP002579393, ISSN: 0022-1767

- US-A1- 2005 215 770
- C. Wang ET AL: "In Vitro Characterization of the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab, BMS-936558, and In Vivo Toxicology in Non-Human Primates", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 2, no. 9, 28 May 2014 (2014-05-28), pages 846-856, XP055563054, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0040
- US-A1- 2006 222 645
- US-A1- 2007 048 315
- US-A1- 2009 220 485
- US-A1- 2010 260 754
- US-A1- 2012 017 292
- US-A1- 2012 108 795
- US-A1- 2012 114 652
- US-A1- 2014 112 915
- US-A1- 2014 322 218
- US-A1- 2015 165 025
- US-A1- 2015 183 874

(57) Revendicări:

1. Un anticorp antagonistic izolat care se leagă specific la PD-1 sau o porțiune care se leagă la antigen a acestuia, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu (VH) din SEQ ID NO: 48 și o regiune variabilă a lanțului ușor (VL) din SEQ ID NO: 56.

2. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform revendicării 1, care cuprinde un lanț greu (HC) din SEQ ID NO: 72 și un lanț ușor (LC) din SEQ ID NO: 73.

3. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform revendicării 1, în care anticorpul are una, două, sau trei din următoarele proprietăți:

a) ameliorează o activare a celulelor T CD4+ sau CD8+ specifice antigenului într-o manieră dependentă de doză, în care activarea este măsurată utilizând un test de rechemare al antigenului citomegalovirus (test CMV) cum s-a descris în Exemplul 1;

b) leagă PD-1 uman cu K_D de mai puțin de 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C;

c) leagă PD-1 de cynomolgus din SEQ ID NO: 3 cu K_D de mai puțin de 1 nM, în care K_D este măsurată utilizând sistemul ProteOn XPR36 la +25°C.

4. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care anticorpul este uman.

5. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care anticorpul este:

a) un izotip IgG4;

b) un izotip IgG1;

c) un izotip IgG2;

d) un izotip IgG3;

e) un izotip IgG4 cuprinzând o substituție S228P;

f) un izotip IgG1 cuprinzând substituțiile L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S și P331S;

g) un izotip IgG2 cuprinzând substituțiile V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S și P331S;

h) un izotip IgG4 cuprinzând substituțiile F234A, L235A, G237A, P238S și Q268A;

i) un izotip IgG1 cuprinzând substituțiile L234A, L235A sau L234A și L235A;

j) un izotip IgG4 cuprinzând substituțiile F234A, L235A sau F234A și L235A;

k) un izotip IgG2 cuprinzând o substituție V234A; sau

l) un izotip IgG4 cuprinzând substituțiile S228P, F234A și L235A, în care numerotarea reziduurilor este în conformitate cu indicele EU.

6. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care anticorpul este un anticorp bispecific, care opțional se leagă la PD-L1 (SEQ

ID NO: 5), PD-L2 (SEQ ID NO: 8), LAG-3 (SEQ ID NO: 293), TIM-3 (SEQ ID NO: 138), CEACAM-1 (SEQ ID NO: 296), CEACAM-5 (SEQ ID NO: 307), OX-40 (SEQ ID NO: 279), GITR (SEQ ID NO: 271), CD27 (SEQ ID NO: 280), VISTA (SEQ ID NO: 286), CD137 (SEQ ID NO: 281), TIGIT (SEQ ID NO: 301) sau CTLA-4 (SEQ ID NO: 292).

7. O compoziție farmaceutică cuprinzând anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-6 și un purtător acceptabil farmaceutic.

8. O polinucleotidă:

- a) care codifică VH din SEQ ID NO: 48 și VL din SEQ ID NO: 56;
- b) care codifică HC din SEQ ID NO: 72 și LC din SEQ ID NO: 73; sau
- c) cuprinzând secvențele de polinucleotide din SEQ ID NO: 196 și 197.

9. Un vector cuprinzând polinucleotida conform revendicării 8.

10. O celulă gazdă cuprinzând:

- a) vectorul conform revendicării 9; sau
- b) o polinucleotidă care codifică VH din SEQ ID NO: 48 sau HC din SEQ ID NO: 72, sau cuprinzând secvența de polinucleotidă din SEQ ID NO: 196; și
- c) o polinucleotidă care codifică VL din SEQ ID NO: 56 sau LC din SEQ ID NO: 73, sau cuprinzând secvența de polinucleotidă din SEQ ID NO: 197.

11. O metodă pentru producerea unui anticorp antagonistic care se leagă specific la PD-1 sau o porțiune care se leagă la antigen a acestuia, cuprinzând cultivarea celulei gazdă conform revendicării 10 în condițiile în care anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia sunt exprimate, și recuperarea anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen a acestuia produse de celula gazdă.

12. Anticorpul izolat sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-6 sau compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 7 pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui cancer la un subiect.

13. Anticorpul izolat sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-6 sau compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 7 pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 12, în care cancerul este

- (a) o tumoră solidă, de exemplu un melanom, un cancer pulmonar, un cancer pulmonar nonmicrocelular scuamos (NSCLC), un NSCLC non-scuamos, un cancer colorectal, un cancer la prostată, un cancer la prostată rezistent la castrare, un cancer la stomac, un cancer ovarian, un cancer gastric, un cancer hepatic, un cancer pancreatic, un cancer la tiroidă, un carcinom cu celule scuamoase de cap și gât, carcinoame ale esofagului sau tractului gastrointestinal, un cancer la sân, un cancer al trompelor uterine, un cancer la creier, un cancer uretral, un cancer genitourinar, o endometrioză, un cancer de col uterin sau o leziune metastatică a cancerului; sau
- (b) a malignitate hematologică, de exemplu un limfom, un mielom sau o leucemie.

14. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-6 sau o compoziție farmaceutică în conformitate cu revendicarea 7 pentru utilizare într-o metodă de amplificare a unui răspuns imun la un subiect care are nevoie de aceasta pentru un timp suficient pentru a ameliora răspunsul imun, în care opțional subiectul are un cancer sau o infecție virală.

15. Anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-6, sau o compoziție farmaceutică în conformitate cu revendicarea 7, pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 12-14, în care anticorpul, porțiunea de legare la antigen a acestuia, sau compoziția farmaceutică este administrată în combinație cu un al doilea agent terapeutic, în care opțional:

(A) anticorpul sau porțiunea de legare la antigen a acestuia și al doilea agent terapeutic sunt administrate simultan, secvențial sau separat, și/sau

(B) al doilea agent terapeutic este:

a) un medicament standard de îngrijire pentru tratamentul tumorii solide sau malignității hematologice, în care medicamentul standard de îngrijire este anastrozol, bicalutamidă, sulfat de

bleomicină, busulfan, injecție cu busulfan, capecitabină, N4-pentoxycarbonil-5-deoxi-5-fluorocitidină, carboplatin, carmustină, clorambucil, cisplatin, cladribină, ciclofosfamidă, citarabină, citozină arabinozidă, injecție cu lipozom de citarabină, dacarbazină, dactinomycină, clorhidrat de daunorubicină, injecție cu lipozom de citrat de daunorubicină, dexametazonă, docetaxel, clorhidrat de doxorubicină, etoposidă, fosfat de fludarabină, 5-fluorouracil, flutamidă, tezacitabină, Gemcitabină (difluorodeoxicitidină), hidroxiuree, Idarubicină, ifosfamidă, irinotecan, L-asparaginază, leucovorin de calciu, melfalan, 6-mercaptopurină, metotrexat, mitoxantronă, paclitaxel, foenix, pentostatina, polifeprosan 20 cu implant de carmustină, citrat de tamoxifen, teniposidă, 6-tioguanină, tiotepa, tirapazamină, clorhidrat de topotecan pentru injecție, vinblastină, vincristină, vinorelbina, Ibrutinib, idelalisib, sau brentuximab vedotin;

b) un agonist al CD86 (SEQ ID NO: 264), CD80 (SEQ ID NO: 265), CD28 (SEQ ID NO: 266), ICOS (SEQ ID NO: 267), ligandului ICOS (SEQ ID NO: 268), TMIGD2 (SEQ ID NO: 269), CD40 (SEQ ID NO: 270), GITR (SEQ ID NO: 271), ligandului 4-1BB (SEQ ID NO: 271), ligandului OX40 (SEQ ID NO: 272), CD70 (SEQ ID NO: 274), CD40L (SEQ ID NO: 275), TNFRSF25 (SEQ ID NO: 264), LIGHT (SEQ ID NO: 277), ligandului GITR (SEQ ID NO: 278), OX-40 (SEQ ID NO: 279), CD27 (SEQ ID NO: 280), CD137 (SEQ ID NO: 281), NKG2D (SEQ ID NO: 282), CD48 (SEQ ID NO: 283), CD226 (SEQ ID NO: 284), sau MICA (SEQ ID NO: 285);

c) un inhibitor al PD-1 (SEQ ID NO: 1), PD-L1 (SEQ ID NO: 5), PD-L2 (SEQ ID NO: 8), VISTA (SEQ ID NO: 286), BTNL2 (SEQ ID NO: 287), B7-H3 (SEQ ID NO: 288), B7-H4 (SEQ ID NO: 289), HVEM (SEQ ID NO: 290), HHLA2 (SEQ ID NO: 291), CTLA-4 (SEQ ID NO: 292), LAG-3 (SEQ ID NO: 293), TIM-3 (SEQ ID NO: 138), BTLA (SEQ ID NO: 294), CD160 (SEQ ID NO: 295), CEACAM-1 (SEQ ID NO: 296), LAIR1 (SEQ ID NO: 297), TGFβ (SEQ ID NO: 298), IL-10 (SEQ ID NO: 299), CD96 (SEQ ID NO: 300), TIGIT (SEQ ID NO: 301), NKG2A (SEQ ID NO: 302), CD112 (SEQ ID NO: 303), CD47 (SEQ ID NO: 304), SIRPA (SEQ ID NO: 305) sau CD244 (SEQ ID NO: 306);

d) un anticorp antagonistic care se leagă specific la TIM-3;

e) un anticorp antagonistic care se leagă specifică la TIM-3 cuprinzând VH și VL ale

- i) SEQ ID NO: 145 și 155, respectiv;
- ii) SEQ ID NO: 146 și 156, respectiv;
- iii) SEQ ID NO: 148 și 157, respectiv;
- iv) SEQ ID NO: 147 și 155, respectiv;
- v) SEQ ID NO: 149 și 158, respectiv;
- vi) SEQ ID NO: 150 și 159, respectiv;
- vii) SEQ ID NO: 151 și 160, respectiv;
- viii) SEQ ID NO: 152 și 161, respectiv;
- ix) SEQ ID NO: 153 și 162, respectiv;
- x) SEQ ID NO: 154 și 163, respectiv; sau
- xi) SEQ ID NO: 172 și 173, respectiv;

f) un receptor fibroblast al inhibitorului factorului de creștere (FGFR);

g) un vaccin;

h) un anticorp agonistic care se leagă specific la GITR;

i) un anticorp agonistic care se leagă specific la OX40;

j) un anticorp agonistic care se leagă specific la OX40, cuprinzând VH și VL din SEQ ID NO: 309 și 310, respectiv;

k) un anticorp agonistic care se leagă specific la OX40, cuprinzând VH și VL din SEQ ID NO: 311 și 312, respectiv;

l) un anticorp agonistic care se leagă specific la CD137;

m) terapie cu radiație; sau

n) chirurgie.

Figura 1A.

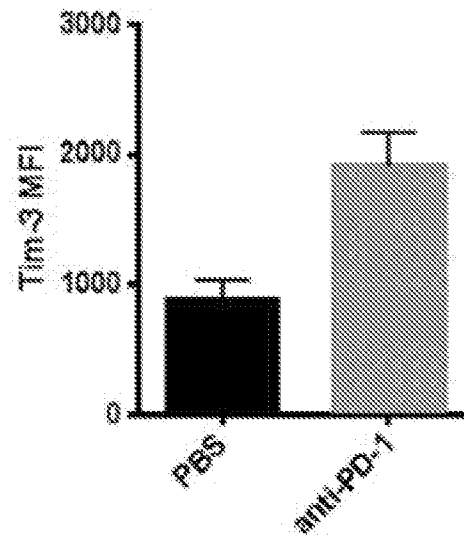


Figura 1B.

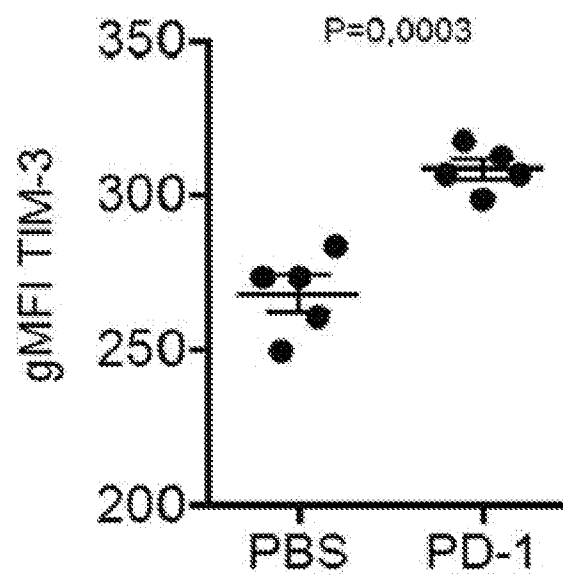


Figura 1C.

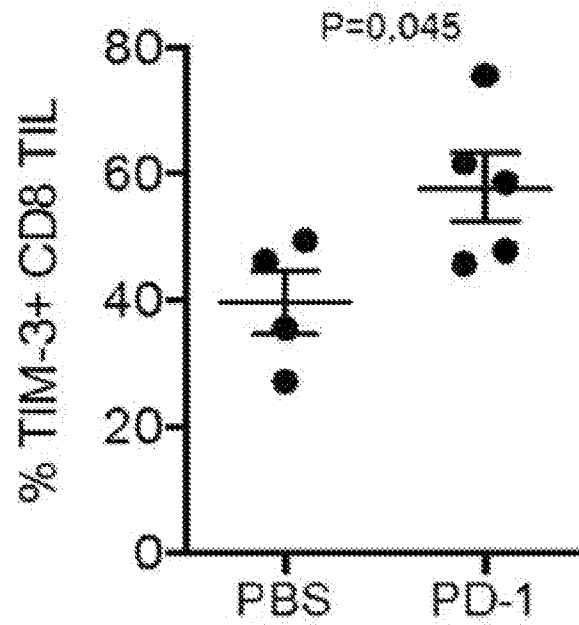


Figura 2A.

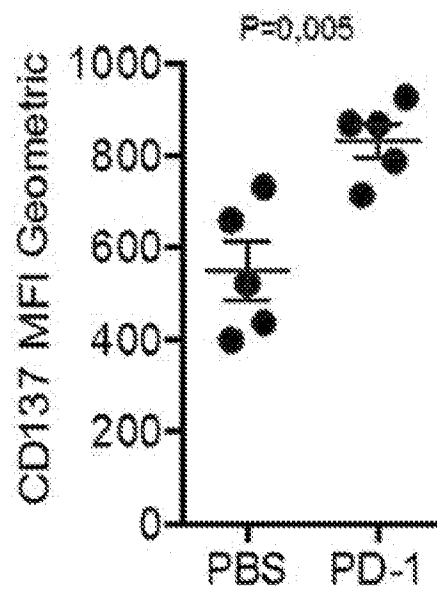


Figura 2B.

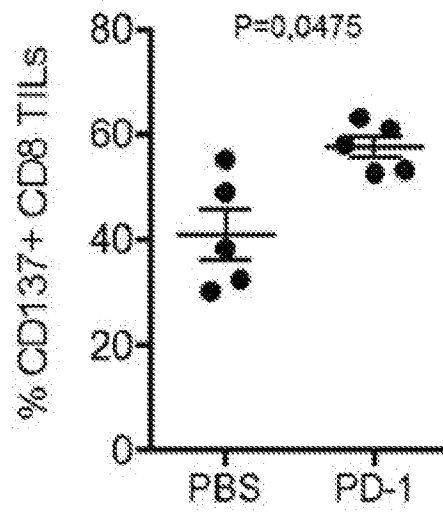


Figura 3A.

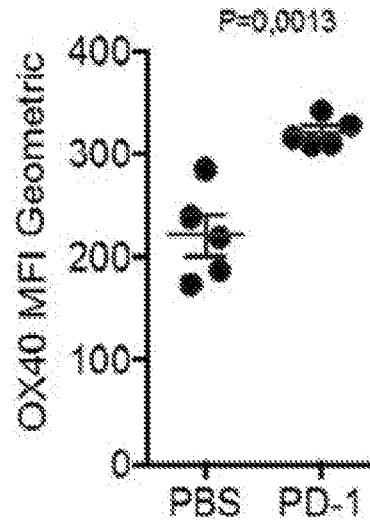


Figura 3B.

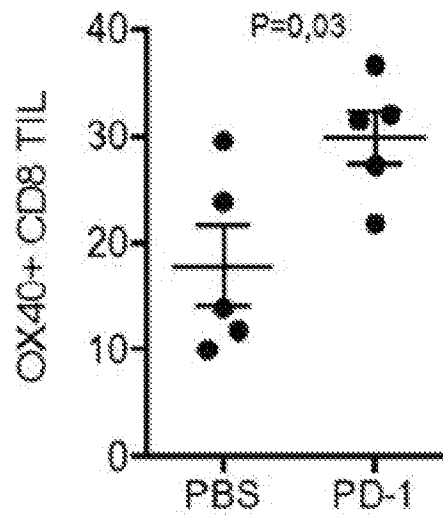


Figura 4A.

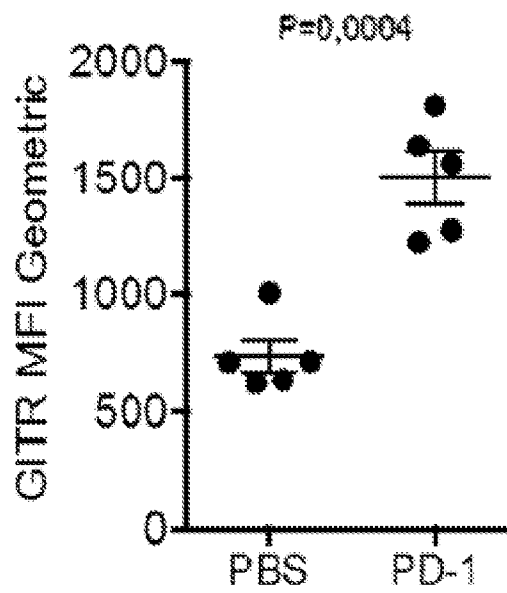


Figura 4B.

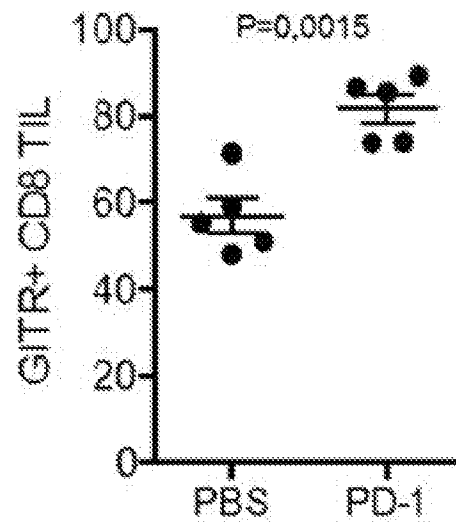


Figura 5.

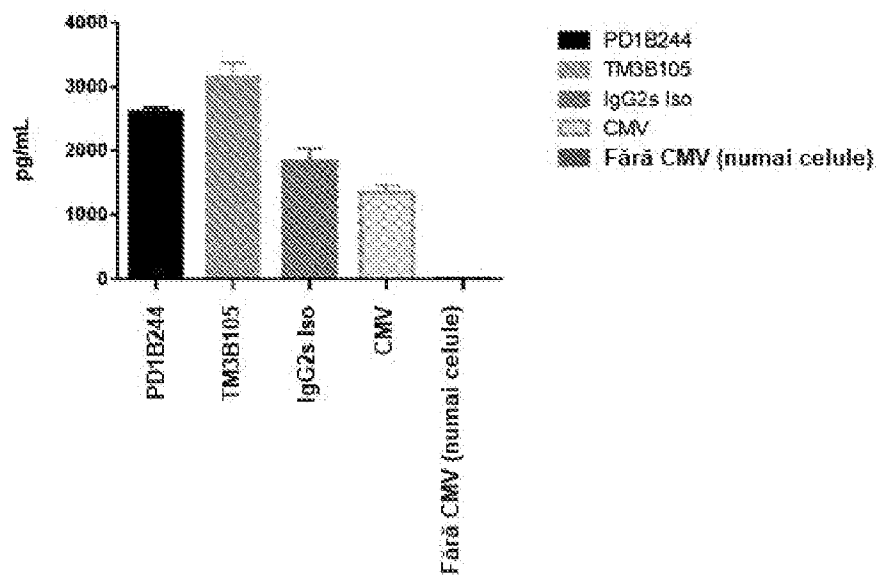


Figura 6

Anticorp	HCDR1					SEQ ID NO.
	Secvență					
PD1B114	S	Y	A	I	S	10
PD1B149	S	Y	A	I	S	10
PD1B160	S	Y	A	I	S	10
PD1B162	S	Y	A	I	S	10
PD1B164	S	Y	A	I	S	10
PD1B11	S	Y	A	I	S	10
PD1B183	S	Y	A	I	S	10
PD1B184	S	Y	A	I	S	10
PD1B185	S	Y	A	I	S	10
PD1B187	S	Y	A	I	S	10
PD1B71	S	Y	A	I	S	10
PD1B177	D	Y	V	I	S	11
PD1B79	S	Y	A	I	S	10
PD1B175	S	Y	V	I	H	12
PD1B194	S	Y	A	I	S	10
PD1B195	S	Y	A	I	S	10
PD1B196	S	Y	A	I	S	10
PD1B197	S	Y	V	I	H	12
PD1B198	S	Y	V	I	H	12
PD1B199	D	Y	V	I	S	11
PD1B200	D	Y	V	I	S	11
PD1B201	D	Y	V	I	S	11
HCDR1 genus	X ₁	Y	X ₂	I	X ₃	82

Secvența genei HCDR1 a mAb PD-1:

X₁YX₂IX₃ (SEQ ID NO: 82).

În care

X₁ este S sau D;

X₂ este V sau A; și

X₃ este H sau S.

Figura 7.

Anticorp	HCDR2																	SEQ ID NO
	Secvență																	
PD1B114	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B149	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B160	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B162	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B164	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B11	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B183	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B184	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B185	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B187	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B71	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B177	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
PD1B70	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B175	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B194	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B195	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B196	G	I	I	P	I	F	D	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	14
PD1B197	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B198	G	I	I	P	I	F	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	13
PD1B199	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
PD1B200	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
PD1B201	G	I	I	P	I	Y	G	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	15
gena HCDR2	G	I	I	P	I	X ₁	X ₂	T	A	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	83

Secvența genei HCDR2 a mAb PD-1

GIPIIX₁X₂TANYAQKFOG (SEQ ID NO: 83),

în care

X₁ este Y sau F, și

X₂ este G sau D.

Figura 8.

Anticorp	HCDR3															SEQ ID NO:
	Secvență															
PD1B114	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16	
PD1B149	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16	
PD1B160	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16	
PD1B162	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16	
PD1B164	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	N	L	D	Y	16	
PD1B11	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B183	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B184	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B185	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B187	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B194	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B195	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
PD1B196	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	S	L	D	Y	17	
gena 1 HCDR3	P	G	L	A	A	A	Y	D	T	G	X ₁	L	D	Y	84	

Gena 1 HCDR3 a mAb PD-1

PGLAAAYDTGX₁LDY (SEQ ID NO: 84),

în care

X₁ este N sau S.

Figura 9.

Anticorp	HCDR3											SEQ ID NO.
	Secvența											
PD1B71	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y	18
PD1B177	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y	18
PD1B70	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y	19
PD1B175	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y	19
PD1B197	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y	19
PD1B198	G	Y	V	R	A	T	G	M	L	D	Y	19
PD1B199	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y	18
PD1B200	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y	18
PD1B201	G	T	L	D	R	T	G	H	L	D	Y	18
gena 2 HCDR3	G	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	T	G	X ₁₁	L	D	Y	85

Gena 2 HCDR3 a mAb PD-1

GX₇X₈X₉X₁₀TGX₁₁LDY (SEQ ID NO. 85).

În care

X₇ este T sau Y;

X₈ este L sau V;

X₉ este D sau R;

X₁₀ este R sau A; și

X₁₁ este H sau M.

Figura 10.

Anticorp	LCDR1											SEQ ID NO.
	Secvență											
PD1B114	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B149	R	A	S	Q	S	V	R	N	Y	L	A	21
PD1B160	R	A	S	Q	S	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B162	R	A	S	Q	S	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B164	R	A	S	Q	S	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B11	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B183	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B184	R	A	S	Q	S	V	R	N	Y	L	A	21
PD1B185	R	A	S	Q	S	V	R	N	Y	L	A	21
PD1B187	R	A	S	Q	S	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B71	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B177	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B70	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B175	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B194	R	A	S	Q	S	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B195	R	A	S	Q	S	V	D	S	Y	L	A	22
PD1B196	R	A	S	Q	S	V	R	S	Y	L	A	23
PD1B197	R	A	S	Q	S	V	S	N	Y	L	A	24
PD1B198	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B199	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A	20
PD1B200	R	A	S	Q	S	V	D	N	Y	L	A	25
PD1B201	R	A	S	Q	S	V	S	N	Y	L	A	24
gene LCDR1	R	A	S	Q	S	V	X ₁₇	X ₁₈	Y	L	A	86

Gena LCDR1 a mAb PD-1

RASQSVX₁₇X₁₈YLA (SEQ ID NO. 86).

În care

X₁₇ este S, R sau D; și

X₁₈ este S sau N.

Figura 11.

Anticorp	LCDR2							SEQ ID NO.
	Secvență							
PD1B114	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B149	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B160	D	A	S	D	R	A	T	27
PD1B162	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B164	D	A	S	Y	R	A	T	28
PD1B11	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B183	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B184	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B185	D	A	S	D	R	A	T	27
PD1B187	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B71	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B177	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B70	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B175	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B194	D	A	S	Y	R	A	T	28
PD1B193	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B196	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B197	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B198	D	A	S	S	R	A	T	29
PD1B199	D	A	S	T	R	A	T	30
PD1B200	D	A	S	N	R	A	T	26
PD1B201	D	A	S	N	R	A	T	26
gena LCDR2	D	A	S	X ₁₁	R	A	T	87

Gena LCCR2 a mAb PD-1

DASX₁₁RAT (SEQ ID NO: 87).

în care

X₁₁ este N, D, Y, S sau T.

Figura 12.

Anticorp	LCDR3										SEQ ID NO.
	Secvență										
PD1B114	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31	
PD1B149	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32	
PD1B160	Q	Q	R	G	N	W	P	L	T	33	
PD1B162	Q	Q	R	E	Y	W	P	L	T	34	
PD1B164	Q	Q	R	D	Y	W	P	L	T	35	
PD1B171	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31	
PD1B183	Q	Q	R	G	Y	W	P	L	T	36	
PD1B184	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32	
PD1B185	Q	Q	R	W	N	W	P	L	T	37	
PD1B187	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32	
PD1B177	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31	
PD1B177	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31	
PD1B170	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31	
PD1B173	Q	Q	R	S	N	W	P	L	T	31	
PD1B194	Q	Q	R	D	Y	W	P	L	T	35	
PD1B195	Q	Q	R	E	Y	W	P	L	T	34	
PD1B196	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32	
PD1B197	Q	Q	R	A	Y	W	P	L	T	38	
PD1B198	Q	Q	R	A	E	W	P	L	T	39	
PD1B199	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32	
PD1B200	Q	Q	R	S	A	W	P	L	T	40	
PD1B201	Q	Q	R	N	Y	W	P	L	T	32	
gsna LCDR3	Q	Q	R	X ₁₅	X ₁₆	W	P	L	T	88	

Gena LCDR3 a mAb PD-1:

QQRX₁₅X₁₆WPLT (SEQ ID NO: 88).

în care

X₁₅ este S, N, G, E, D, W, E sau A; și

X₁₆ este N, Y, E sau A.

Figura 13.

Nume mAb	HCDR1						SEQ ID NO.
	Secvență						
TM3B103	N	Y	W	M	S		90
TM3B105	S	Y	A	M	S		91
TM3B109	S	Y	A	M	S		91
TM3B108	G	Y	W	M	H		92
TM3B113	D	Y	W	M	S		93
gena HCDR1	X ₁₇	Y	X ₁₈	M	X ₁₉		164

Gena HCDR1 a mAb TIM3:

X₁₇YX₁₈MX₁₉ (SEQ ID NO: 164).

în care

X₁₇ este N, S, G sau D;

X₁₈ este W sau A; și

X₁₉ este S sau H.

Figura 14.

mAb	HCDR2																	SEQ ID NO.
	Secvență																	
TM3B103	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	99
TM3B105	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	99
TM3B109	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	99
TM3B108	A	I	S	Y	S	G	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	100
TM3B113	V	I	K	Y	S	G	G	S	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	101
gena HCDR2	X ₂₀	I	X ₂₁	X ₂₂	S	G	G	S	X ₂₃	Y	Y	A	D	S	V	K	G	163

Gena HCDR2 a mAb TIM-3

X₂₀IX₂₁X₂₂SGGSX₂₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 163).

În care

X₂₀ este A sau V;

X₂₁ este S sau K;

X₂₂ este G sau Y; și

X₂₃ este T sau K.

Figura 15.

mAb	HCDR3										
	Secvență										SEQ ID NO:
TM3B103	D	H	W	D	P	N	F	L	D	Y	107
TM3B105	S	P	-	-	Y	A	P	L	D	Y	108
TM3B109	N	E	E	P	D	D	R	L	D	Y	109
TM3B108	G	T	N				W	L	D	Y	110
TM3B113	E	L	E			G	V	F	D	Y	111
gena HCDR3	X ₂₄	X ₂₅	X ₂₆	X ₂₇	X ₂₈	X ₂₉	X ₃₀	X ₃₁	D	Y	166

X₂₄X₂₅X₂₆X₂₇X₂₈X₂₉X₃₀X₃₁DY (SEQ ID NO: 166),

în care

X₂₄ este D, S, N, G sau E;

X₂₅ este H, P, E, T sau L;

X₂₆ este W, E, N sau șters;

X₂₇ este D, P sau șters;

X₂₈ este P, Y, D sau șters;

X₂₉ este N, A, D, G sau șters;

X₃₀ este F, P, R, W sau V; și

X₃₁ este L sau F.

Figura 16.

mAb	LCDR1																	
	Secvență																SEQ ID NO.	
TM3B103	R	A	S	Q	S	V	S	S	-					S	Y	L	A	117
TM3B105	R	A	S	Q	S	V	N	-						D	Y	L	A	118
TM3B109	K	S	S	Q	S	V	L	A	S	S	N	N	K	N	Y	L	A	119
TM3B108	R	A	S	Q	S	V	S	S						S	Y	L	A	117
TM3B113	R	A	S	Q	S	V	S	N						S	T	L	A	120
gena LCDR1	X ₃₂	X ₃₃	S	Q	S	V	X ₃₄	X ₃₅	X ₃₆	X ₃₇	X ₃₈	X ₃₉	X ₄₀	X ₄₁	X ₄₂	L	A	167

X₃₂X₃₃SQSVX₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁X₄₂LA (SEQ ID NO: 167),

în care

X₃₂ este R sau K;

X₃₃ este A sau S;

X₃₄ este S, N sau L;

X₃₅ este S, A, N sau șters;

X₃₆ este S sau șters;

X₃₇ este S sau șters;

X₃₈ este N sau șters;

X₃₉ este N sau șters;

X₄₀ este K sau șters;

X₄₁ este S, D sau N; și

X₄₂ este Y sau T.

Figura 17.

mAb	LCDR2							SEQ ID NO.
	Secvență							
TM3B103	G	A	S	S	R	A	T	126
TM3B105	D	A	S	N	R	A	T	127
TM3B109	W	A	S	T	R	E	S	128
TM3B108	G	A	S	S	R	A	T	126
TM3B113	T	A	S	S	R	A	T	129
gena LCDR2	X ₄₃	A	S	X ₄₄	R	X ₄₅	X ₄₆	168

Gena LCDR2 a mAb TIM-3

X₄₃ASX₄₄RX₄₅X₄₆ (SEQ ID NO: 168),

în care

X₄₃ este G, D, W sau T;

X₄₄ este S, N sau T;

X₄₅ este A sau E; și

X₄₆ este T sau S.

Figura 18.

mAb	LCDR3									
	Secvență									SEQ ID NO:
TM3B103	Q	Q	Y	G	S	S	P	L	F	135
TM3B105	Q	Q	G	G	H	A	P	I	F	136
TM3B109	Q	Q	Y	Y	S	T	P	L	F	137
TM3B108	Q	Q	Y	G	S	S	P	L	F	138
TM3B113	Q	Q	S	Y	T	S	P	W	F	139
gena LCDR3	Q	Q	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀	P	X ₃₁	F	169

QQX₁₇X₁₈X₁₉X₂₀PX₃₁F (SEQ ID NO: 169).

în care

X₁₇ este Y, G sau S;

X₁₈ este G sau Y;

X₁₉ este S, H sau T;

X₂₀ este S, A sau T; și

X₃₁ este L, I sau W.

Figura 19A.

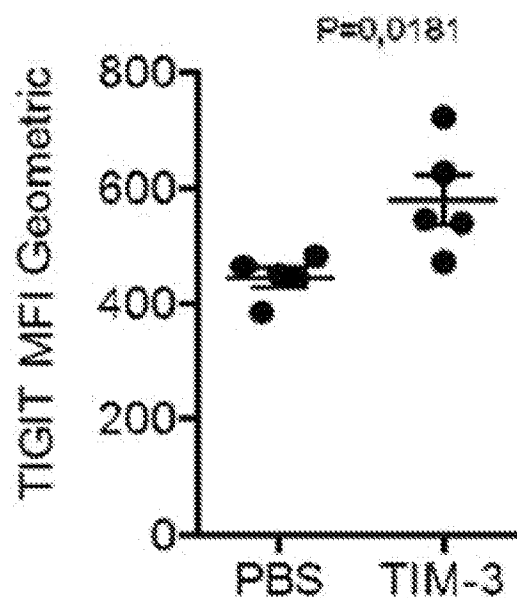


Figura 19B.

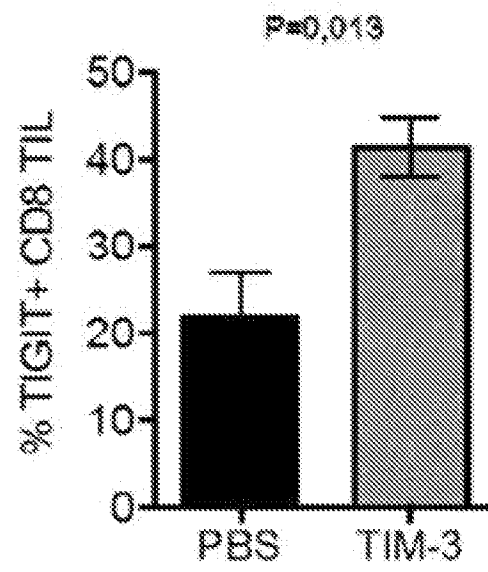


Figura 20A.

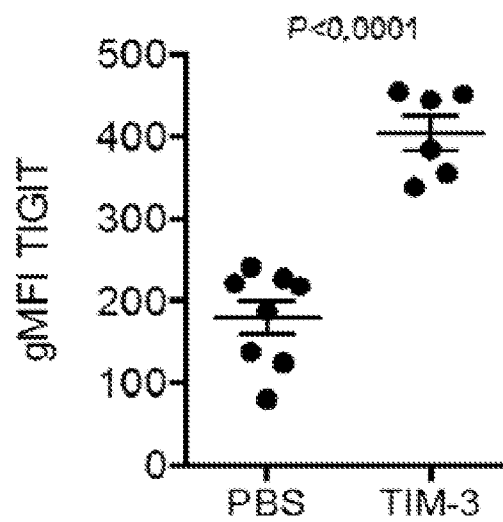


Figura 20B.

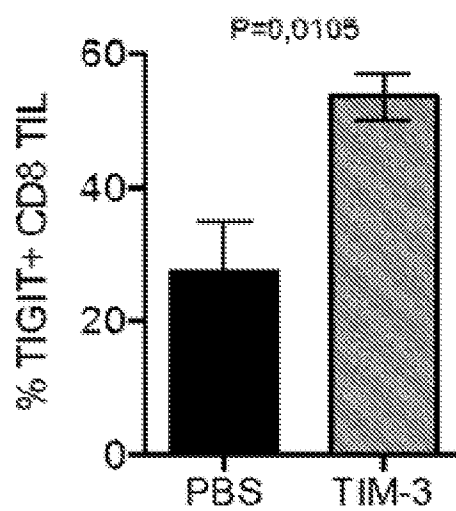


Figura 21.

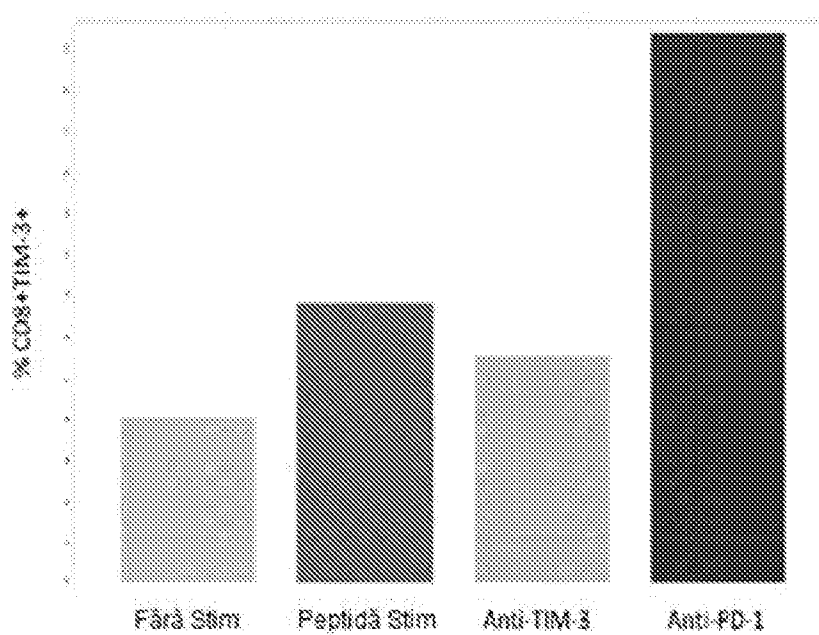


Figura 22A.

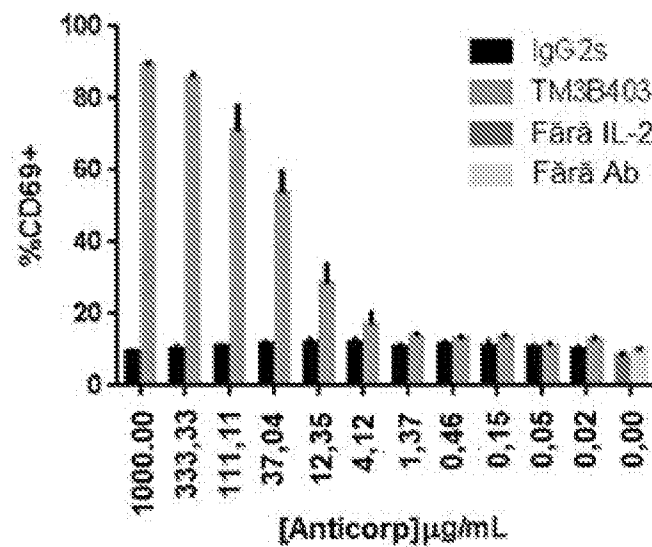


Figura 22B.

