



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

(21) BR 112019025574-5 A2



(22) Data do Depósito: 04/06/2018

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

(54) Título: ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE AO PD-1 E MÉTODOS DE USO

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

(30) Prioridade Unionista: 05/06/2017 US 62/515,188; 18/05/2018 US 62/673,185; 26/03/2018 US 62/648,114.

(71) Depositante(es): JANSSEN BIOTECH, INC..

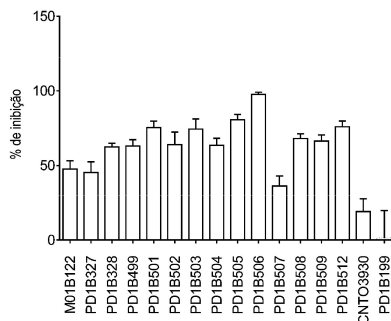
(72) Inventor(es): QIANG CHEN; SUZANNE COLE; KAREN DUFFY; DEBRA GARDNER; YANXIA GUO; DAMON HAMEL; SHANNON HITCHCOCK; ANN LACOMBE; JINQUAN LUO; RAVI MALAVIYA; YEVGENIYA ORLOVSKY; PEJMAN SOROOSH; MELISSA SWIECKI; DEEPTI WILKINSON.

(86) Pedido PCT: PCT US2018035843 de 04/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/226580 de 13/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 03/12/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, polinucleotídeos que codificam os anticorpos ou os fragmentos, e métodos de produção e uso dos mesmos são úteis no tratamento de distúrbios inflamatórios ou imunes.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A PD-1 E
MÉTODOS DE USO".**

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0001] O presente pedido contém uma listagem de sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e está aqui incorporada a título de referência, em sua totalidade. A dita cópia em formato ASCII, criada em 30 de maio de 2018, foi nomeada como JBI5131WOPCT_ST25.txt e tem tamanho de 220 kB.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] A presente invenção se refere a anticorpos que se ligam especificamente a PD-1, a polinucleotídeos que codificam os anticorpos ou os fragmentos de ligação ao antígeno, e a métodos para produzir e usar os mesmos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] PD-1 (Morte programada-1; *PDCD1*) é um receptor inibitório que pertence à família CD28/CTLA-4. PD-1 é uma glicoproteína transmembranar tipo I que contém um único domínio extracelular, e um domínio citoplasmático contendo tanto um motivo inibidor do imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) quanto um motivo de troca do imunorreceptor baseado em tirosina (ITSM). A proteína PD-1 é expressa em células T, células B, células NK ativadas, e timócitos, e em células T de memória de repouso incluindo células T auxiliares foliculares (T_{FH}) e células T auxiliares periféricas (T_{PH}). A PD-1, mediante o engate por seus ligantes PD-L1 ou PD-L2, suprime as funções da célula T através de múltiplos mecanismos (Pauken e Wherry (2015) *Trends in Immunology* 36(4): 265-276). O engate de PD-1 inibe diretamente a sinalização do receptor de células T (TCR) através da colocalização com o TCR e a subsequente indução da desfosforilação das

moléculas de sinalização proximal de TCR, inibição da via Ras/MEK/ERK que leva à inibição da progressão do ciclo celular e à proliferação de células T, inibição do crescimento e sobrevivência celular e reprogramação do metabolismo das células T através da supressão da via PI3K/AKT, levando à regulação positiva do fator de transcrição BATF e modulação do desenvolvimento, manutenção e função das células T reguladoras. Também foi proposto que PD-1 aumenta a motilidade das células T e limita a duração da interação entre as células T e as células-alvo, reduzindo assim a extensão da ativação das células T (Honda *et al.*, (2014) *Immunity* 40(2):235-47).

[0004] Estudos em camundongos deficientes em PD-1 indicaram que esta via é importante tanto para a tolerância central quanto periférica. Camundongos deficientes em PD-1 em um fundo de C57Bl/6 podem desenvolver sintomas espontâneos de doença autoimune incluindo produção de autoanticorpos, glomerulonefrite e artrite (Nishimura *et al.*, *Immunity* 1999). Esses dados indicam que PD-1 está regulando negativamente as respostas imunológicas.

[0005] Os anticorpos monoclonais contra PD-1 e PD-L1 são terapias aprovadas para o tratamento de cânceres como melanoma avançado, câncer de pulmão de células não pequenas avançado e linfoma de Hodgkin clássico. Foi verificado que PD-L1 é regulado positivamente em muitos diferentes tipos de tumores, e é capaz de inibir as células PD-1⁺ T infiltradoras de tumores. Os anticorpos monoclonais PD-1 ou PD-L1 antagonistas reverterem essa supressão, permitindo que as células de T se tornem ativadas e ataquem o tumor. Dessa forma, o bloqueio de pontos de verificação imunes fornece uma maneira de melhorar as respostas imune antitumorais.

[0006] Embora agentes terapêuticos anti-inflamatórios biológicos estejam disponíveis, existe uma necessidade por medicamentos anti-inflamatórios aprimorados que possam suprimir eficazmente a inflama-

ção para o tratamento de vários distúrbios imunológicos, por exemplo, artrite reumatoide, na qual uma porção significativa dos pacientes ainda não responde adequadamente à terapia.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] A invenção fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e uma LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 165, 4, 166, 6 e 7, respectivamente.

[0008] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente; a VH das SEQ ID N^{os}: 8, 9 ou 10 e a VL das SEQ ID N^{os}: 14, 15 ou 16; e/ou uma cadeia pesada (HC) da SEQ ID N^o: 20, 21 ou 22 e uma cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 26, 27 ou 28.

[0009] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 5, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 16; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 28.

[0010] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 5, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 16; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 28.

[0011] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 5, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 16; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 28.

[0012] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 148, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 10 e a VL da SEQ ID N^o: 143; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

[0013] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 149, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 10 e a VL da SEQ ID N^o: 144; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 154.

[0014] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 148, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 143; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

[0015] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 148, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 143; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

[0016] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 148, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 143; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

[0017] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 149, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 144; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 154.

[0018] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 149, 6 e 7, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 144; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 154.

[0019] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 149, 6 e 7, respectivamente, a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 144; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 154.

[0020] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e uma LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 124, 40, 41,

42 e 43, respectivamente.

[0021] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das: SEQ ID N^{os}: 32, 33, 40, 41, 42 e 43, respectivamente; a VH das SEQ ID N^{os}: 44 ou 45 e a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62; e/ou a HC das SEQ ID N^{os}: 66 ou 67 e a LC das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84.

[0022] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 34, 40, 41, 42 e 43, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 46 e a VL da SEQ ID N^o: 61; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 68 e a LC da SEQ ID N^o: 83.

[0023] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 35, 40, 41, 42 e 43, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 47 e a VL da SEQ ID N^o: 61; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 69 e a LC da SEQ ID N^o: 83.

[0024] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 36, 40, 41, 42 e 43, respectivamente; a VH da SEQ ID N^o: 48 e a VL da SEQ ID N^o: 61; e/ou a HC da SEQ ID N^o: 70 e a LC da SEQ ID N^o: 83.

[0025] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 37, 40, 41, 42 e 43,

respectivamente; a VH da SEQ ID Nº: 49 e a VL da SEQ ID Nº: 61; e/ou a HC da SEQ ID Nº: 71 e a LC da SEQ ID Nº: 83.

[0026] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID Nºs: 32, 38, 40, 41, 42 e 43, respectivamente; a VH da SEQ ID Nº: 50 e a VL da SEQ ID Nº: 61; e/ou a HC da SEQ ID Nº: 72 e a LC da SEQ ID Nº: 83.

[0027] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID Nºs: 32, 39, 40, 41, 42 e 43, respectivamente; a VH da SEQ ID Nº: 51 e a VL da SEQ ID Nº: 61; e/ou a HC da SEQ ID Nº: 73 e a LC da SEQ ID Nº: 83.

[0028] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento ligação ao antígeno do mesmo, que compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e uma LCDR3 das SEQ ID Nºs: 88, 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente.

[0029] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compete pela ligação a PD-1 com o anticorpo da invenção.

[0030] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se liga ao mesmo epítipo de PD-1 como o anticorpo

da invenção.

[0031] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, sendo que a VH do anticorpo e a VL do anticorpo ou a HC do anticorpo e a LC do anticorpo são codificadas por determinados polinucleotídeos aqui mencionados.

[0032] A invenção também fornece um polinucleotídeo que codifica o anticorpo da invenção.

[0033] A invenção também fornece um vetor que compreende ao menos um polinucleotídeo da invenção.

[0034] A invenção também fornece uma célula hospedeira que compreende o vetor da invenção.

[0035] A invenção também fornece um método de produção de um anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende cultivar a célula hospedeira em condições nas quais o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é expresso, e isolar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0036] A invenção também fornece uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno da invenção.

[0037] A invenção também fornece um kit que compreende o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção.

[0038] A invenção também fornece um método de supressão da ativação de uma célula T que expressa PD-1 em um indivíduo, que compreende administrar a um indivíduo o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção por um tempo suficiente para suprimir a ativação da célula T que expressa PD-1.

[0039] A invenção também fornece um método de modulação negativa de uma resposta imunológica, que compreende administrar a

um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção por um tempo suficiente para modular negativamente a resposta imunológica.

[0040] A invenção também fornece um método de tratamento de um distúrbio imunológico, que compreende administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção por um tempo suficiente para tratar o distúrbio imunológico.

[0041] A invenção também fornece um anticorpo anti-idiotípico que se liga especificamente ao anticorpo ou ao fragmento de ligação a antígeno do mesmo da invenção.

[0042] A invenção também fornece um imunoconjugado que compreende o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno da invenção conjugado a uma molécula heteróloga.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0043] A Figura **1A** mostra que os anticorpos gerados selecionados inibiram a ativação de células T em ensaio de recuperação de CMV em um teor de acima de 50% ou mais. CNTO3930: controle de isótipo. PD1B199: um mAb de PD-1 antagonista.

[0044] A Figura **1B** mostra que os anticorpos gerados selecionados inibiram a ativação de células T em ensaio de recuperação de CMV em um teor de acima de 50% ou mais. CNTO3930: controle de isótipo. PD1B199: um mAb de PD-1 antagonista.

[0045] A Figura **2A** mostra o alinhamento das regiões VH da linhagem de mAb PD1B505 PD1H93 (SEQ ID N°: 8), PD1H384 (SEQ ID N°: 9), PD1H405 (SEQ ID N°: 10), PD1H585 (SEQ ID N°: 140), PD1H586 (SEQ ID N°: 141) e PD1H587 (SEQ ID N°: 142). As regiões CDR estão sublinhadas. As SEQ ID N°s: das cadeias VH são mostra-

das após o nome de cadeia na Figura (por exemplo, PD1H93_8; _8 indica a SEQ ID N°: 8)

[0046] A Figura **2A** mostra o alinhamento das regiões VL da linhagem de mAb PD1B505 PD1L30 (SEQ ID N°: 14), PD1L468 (SEQ ID N°: 15), PD1L469 (SEQ ID N°: 16), PD1L651 (SEQ ID N°: 143) e PD1L652 (SEQ ID N°: 144). As regiões CDR estão sublinhadas. As SEQ ID N°s: das cadeias VL são mostradas após o nome de cadeia na Figura (por exemplo, PD1L30_14; _14 indica a SEQ ID N°: 14)

[0047] A Figura **3A** mostra o alinhamento das regiões VH da linhagem de mAb PD1B506 PD1H90 (SEQ ID N°: 44) PD1H388 (SEQ ID N°: 45), PD1H399 (SEQ ID N°: 46), PD1H400 (SEQ ID N°: 47), PD1H401 (SEQ ID N°: 48), PD1H402 (SEQ ID N°: 49), PD1H403 (SEQ ID N°: 50) e PD1H404 (SEQ ID N°: 51). As regiões CDR estão sublinhadas.

[0048] A Figura **2A** mostra o alinhamento das regiões VL da linhagem de mAb PD1B506 PD1L28 (SEQ ID N°: 60), PD1L470 (SEQ ID N°: 61) e PD1L471 (SEQ ID N°: 62). As regiões CDR estão sublinhadas.

[0049] A Figura **4A** mostra o alinhamento das regiões VH da linhagem de mAb PD1B512 PD1H81 (SEQ ID N°: 94) e PD1H389 (SEQ ID N°: 95). As regiões CDR estão sublinhadas.

[0050] A Figura **2A** mostra o alinhamento das regiões VL da linhagem de mAb PD1B512 PD1L43 (SEQ ID N°: 98), PD1L472 (SEQ ID N°: 99) e PD1L473 (SEQ ID N°: 100). As regiões CDR estão sublinhadas.

[0051] A Figura **5A** mostra que PD1B505 e PD1B506 inibiram a ativação de células T específicas para o antígeno. A Figura mostra a porcentagem de inibição média e o desvio padrão (STDEV) de proliferação de células T no ensaio de recuperação de CMV. IgG1: controle de isótipo.

[0052] A Figura **5B** mostra que PD1B743, PD1B750 e PD1B756 inibiram a ativação de células T específicas para o antígeno. A Figura mostra a porcentagem de inibição média e o desvio padrão (STDEV) de proliferação de células T no ensaio de recuperação de CMV. IgG1: controle de isótipo.

[0053] A Figura **5C** mostra que PD1B878 e PD1B849 inibiram a ativação de células T específicas para o antígeno em um ensaio de recuperação de CMV. A Figura mostra a porcentagem de inibição média e o desvio padrão (STDEV) de proliferação de células T no ensaio de recuperação de CMV. IgG1: controle de isótipo.

[0054] A Figura **6A** mostra que PD1B743 e PD1B756 não bloquearam a ligação de PD-L1 a PD-1, enquanto que PD1B750 bloqueou a interação em um ensaio de avaliação do grau de agrupamento de células que expressam PD-1 e PD-L1 na presença ou ausência dos anticorpos indicados com o uso de eventos duplo positivos expressos em porcentagem (%) como leitura do agrupamento. Os mAb de controle positivo bloquearam a interação com PD-L1/PD-1.

[0055] A Figura **6B** mostra que PD1B743 e PD1B756 não bloquearam a ligação de PD-L2 a PD-1, enquanto que PD1B750 bloqueou a interação em um ensaio de avaliação do grau de agrupamento de células que expressam PD-1 e PD-L2 na presença ou ausência dos anticorpos indicados com o uso de eventos duplo positivos expressos em porcentagem (%) como leitura do agrupamento. Os mAb de controle positivo bloquearam a interação com PD-L2/PD-1.

[0056] A Figura **7** mostra um desenho esquemático de cinco famílias ou "grupos" de epítomos distintos dos anticorpos de PD-1 gerados. Os mAbs do Bin5 bloquearam a interação PD-L1/PD-1, enquanto os mAbs nos grupos 1 a 4 não bloquearam.

[0057] A Figura **8A** mostra que a expressão de PD-1 foi mais alta nas células T de memória CD4⁺ CD45RO⁺ ou CD8⁺ CD45RO⁺ estimu-

ladas com CMV em comparação com as células T estimuladas com TT (inserção, intensidade de fluorescência média geométrica). Anticorpo de PD-1: linhagens sólidas; controle de isótipo: linhas tracejadas.

[0058] A Figura **8B** mostra que PD1B878 e PD1B849 inibiram a ativação de células T específicas para CMV em um ensaio de recuperação específico de CMV. A Figura mostra a porcentagem (%) de inibição média e o desvio padrão de proliferação de células T no ensaio de recuperação de CMV.

[0059] A Figura **9A** mostra que PD1B849 e PD1B878 provocaram ADCC de células T de memória ativada na presença de células NK como células efetoras. As versões de fucose baixa (LF) dos anticorpos (PD1B849-LF e PD1B878-LF) demonstraram atividade intensificada de ADCC.

[0060] A Figura **9B** mostra que PD1B849 e PD1B878 provocaram ADCC de células T de memória ativada na presença de células PBMCs como células efetoras. As versões de fucose baixa (LF) dos anticorpos (PD1B849-LF e PD1B878-LF) demonstraram atividade intensificada de ADCC.

[0061] A Figura **10A** mostra ausência de ADCC mediada por PD1B849 e PD1B878 em células T de memória em repouso que expressam níveis baixos de PD1 na presença de células NK como células efetoras. As versões de fucose baixa (LF) dos anticorpos (PD1B849-LF e PD1B878-LF) mediaram alguma ADCC.

[0062] A Figura **10B** mostra ausência de ADCC mediada por PD1B849 e PD1B878 em células T de memória em repouso que expressam níveis baixos de PD1 na presença de células PBMCs como células efetoras. As versões de fucose baixa (LF) dos anticorpos (PD1B849-LF e PD1B878-LF) mediaram alguma ADCC.

[0063] A Figura **11** mostra que PD1B849 e PD1B878 não mediaram CDC mensurável de células T ativadas com o uso de complemen-

to de coelho. OKT3: um anticorpo CD3 anti-humano de camundongo (made in) (controle positivo); hulG1: controle de isótipo, mulgG2a: controle de isótipo.

[0064] A Figura **12** mostra que PD1B878, PD1B1090 e PD1B1094 não bloquearam a ligação de PD-L1 a PD1 nas células.

[0065] A Figura **13A** mostra que PD1B505-mIgG2a e PD1B506-mIgG2a impediram o desenvolvimento de doença no modelo de camundongo de doença de enxerto contra hospedeiro (DECH ou GVHD, "graft-versus-host disease"). Os anticorpos foram dosados a 10 mg/kg i.p. nos dias 0, 4, 7, 11, 14 e 18 e o escore clínico foi registrada no decorrer do tempo.

[0066] A Figura **13B** mostra que os anticorpos PD1B505-mIgG2a e PD1B506-mIgG2a mAbs (mIgG2a) impediram a perda de peso no modelo de camundongo de GvHD. Os anticorpos foram dosados a 10 mg/kg i.p. nos dias 0, 4, 7, 11, 14 e 18.

[0067] A Figura **14A** mostra que PD1B849-mIgG2a e PD1B878-mIgG2a impediram o desenvolvimento de doença no modelo de camundongo de doença de enxerto contra hospedeiro (GVHD). Os anticorpos foram dosados a 10 mg/kg i.p. nos dias 0, 4, 7, 11, 14 e 18 e o escore clínico foi registrada no decorrer do tempo.

[0068] A Figura **14B** mostra que PD1B849-mIgG2a e PD1B878-mIgG2a impediram a perda de peso no modelo de camundongo de GvHD. Os anticorpos foram dosados a 10 mg/kg i.p. nos dias 0, 4, 7, 11, 14 e 18.

[0069] A Figura **15** mostra que PD1B849-mIgG2a e PD1B878-mIgG2a aumentaram a frequência de células T regulatórias (Tregs) em baços no modelo de camundongo de GvHD.

[0070] A Figura **16** mostra que anticorpos anti-PD1 selecionados esgotam as populações de T_{FH}/T_{PH} . BF: Fucose baixa.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0071] Todas as publicações, incluindo, mas não se limitando a, patentes e pedidos de patente, citadas neste relatório descritivo estão aqui incorporadas a título de referência como se fossem descritas na íntegra.

[0072] Deve-se entender que a terminologia usada na presente invenção tem o propósito de descrever modalidades apenas e não pretende ser limitadora. Exceto onde definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado, conforme comumente compreendido pelo versado na técnica à qual a invenção pertence.

[0073] Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática dos testes da presente invenção, são descritos aqui materiais e métodos exemplificadores. Na descrição e na reivindicação da presente invenção, a terminologia a seguir será usada.

[0074] Para uso na presente invenção e nas reivindicações, as formas singulares "um", "e", e "o" incluem referências no plural, a menos que o contexto claramente determine o contrário.

[0075] A menos que o contexto exija claramente de outro modo, ao longo da descrição e das reivindicações, as palavras "compreende(m)", "que compreende(m)", e similares devem ser interpretadas em um sentido inclusivo em oposição a um sentido exclusivo ou exaustivo; ou seja, no sentido de "incluindo, mas não se limitando a".

[0076] O termo "se liga especificamente", "ligação específica" ou "se liga", se refere a um anticorpo que se liga a um antígeno ou a um epítopo dentro do antígeno com maior afinidade para outros antígenos ou epítopos. Tipicamente, o anticorpo se liga ao antígeno ou ao epítopo dentro do antígeno com uma constante de dissociação em equilíbrio (K_D) de cerca de 1×10^{-7} M ou menos, por exemplo cerca de 1×10^{-8}

M ou menos, cerca de 1×10^{-9} M ou menos, cerca de 1×10^{-10} M ou menos, ou cerca de 1×10^{-11} M ou menos, ou cerca de 1×10^{-12} M ou menos, tipicamente com a K_D que é ao menos dez vezes menor que sua K_D para ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína). A K_D pode ser medida com o uso de procedimentos-padrão. Os anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno ou ao epítopo dentro do antígeno podem, no entanto, apresentar reatividade cruzada com outros antígenos relacionados, por exemplo, com o mesmo antígeno de outras espécies (homólogas), como humanos ou macacos, por exemplo *Macaca fascicularis* (cinomolgo) ou *Pan troglodytes* (chimpanzé) ou *Callithrix jacchus* (sagui comum ou sagui-de-tufos-brancos). Enquanto um anticorpo monoespecífico se liga especificamente a um antígeno ou a um epítopo, um anticorpo biespecífico se liga especificamente a dois antígenos diferentes ou dois epítopos distintos.

[0077] "Agonista" ou "agonístico" se refere a um anticorpo que, mediante a ligação a PD-1, induz pelo menos uma atividade biológica que é induzida pelo ligante PD-L1 de PD-1. O anticorpo é um agonista quando a ao menos uma atividade biológica é induzida em ao menos cerca de 20%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% mais que na ausência do agonista (por exemplo, controle negativo), ou quando a indução é estatisticamente significativa quando comparada com a indução na ausência do agonista. Uma atividade biológica típica que é induzida pela ligação de PD-L1 a PD-1 é a inibição de células $CD4^+$ e/ou $CD8^+$ específicas para o antígeno, resultando em supressão das respostas imunológicas.

[0078] PD-1 se refere à proteína de morte celular programada 1 humana, PD-1. A PD-1 é também conhecida como CD279 ou PDCD1. A sequência de aminoácidos da PD-1 humana madura (sem a sequência de sinal) é mostrada na **SEQ ID Nº: 131**. O domínio extracelu-

lar abrange os resíduos 1 a 150, o domínio transmembranar abrange os resíduos 151 a 171, e o domínio citoplasmático abrange os resíduos 172 a 268 da SEQ ID Nº: 1. Ao longo do relatório descritivo, "o domínio extracelular de PD-1 humana" ou "huPD1-ECD", se refere à proteína que tem a sequência de aminoácidos dos resíduos 1 a 150 da **SEQ ID Nº: 1**.

[0079] "Anticorpos" significa em um sentido amplo e inclui moléculas de imunoglobulina pertencentes a qualquer classe, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, ou sub-classe IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ e incluindo qualquer dentre a cadeia leve kappa (κ) e lambda (λ). Os anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos de comprimento completo, fragmentos de ligação ao antígeno, anticorpos biespecíficos ou multi-específicos, anticorpos diméricos, tetraméricos ou multiméricos, anticorpos de cadeia única, anticorpos de domínio e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreende um fragmento de ligação ao antígeno da especificidade necessária. Os "anticorpos de comprimento completo" são compreendidos de duas cadeias pesadas (HC) e duas cadeias leves (LC) interconectadas por ligações de dissulfeto, bem como por multímeros das mesmas (por exemplo, IgM). Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região constante da cadeia pesada (compreendida dos domínios CH1, dobradiça CH2 e CH3). Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável da cadeia leve (VL) e uma região constante da cadeia leve (CL). A VH e a VL podem, ainda, ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões de estrutura principal (FR). Cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro segmentos FR, dispostos do amino-terminal para o carboxi-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

[0080] As "regiões determinantes de complementaridade (CDR)"

são as regiões do anticorpo que se ligam a um antígeno. Existem três CDRs na VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) e três CDRs na VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3). As CDRs podem ser definidas com o uso de várias delineações como Kabat (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211-50) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edição Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., EUA, 1991), Chothia (Chothia et al. (1987), J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77) e AbM (Martin e Thornton J Bmol Biol 263: 800-15, 1996). A correspondência entre as várias delineações e a numeração de região variável são descritas (consulte, por exemplo, Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77; Honegger e Pluckthun, J Mol Biol (2001) 309:657-70; base de dados do International ImMunoGeneTics (IMGT); recursos da Web, http://www_imgt_org). Programas disponíveis como abYsis junto à UCL Business PLC podem ser utilizados para delinear as CDRs. Os termos "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" e "LCDR3", conforme utilizados aqui, incluem as CDRs definidas por qualquer um dentre os métodos descritos acima, Kabat, Chothia, IMGT ou IMGT, a menos que explicitamente indicado de outro modo no relatório descritivo.

[0081] "Fragmento de ligação ao antígeno" se refere a uma porção de uma molécula de imunoglobulina que se liga a um antígeno. Os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser polipeptídeos sintéticos obteníveis enzimaticamente ou manipulados geneticamente e incluem a VH, a VL, a VH e a VL, Fab, F(ab')₂, e fragmentos de Fd e Fv, anticorpos de domínio (dAb) consistindo em um domínio VH ou um domínio VL, domínios variáveis de IgNAR de tubarão, domínios VH camelinizados, unidades mínimas de reconhecimento consistindo nos resíduos de aminoácido que mimetizam as CDRs de um anticorpo, como as porções de FR3-CDR3-FR4, a HCDR1, a HCDR2 e/ou the HCDR3 e a

LCDR1, a LCDR2 e/ou a LCDR3. Os domínios VH e VL podem ser unidos por um conector sintético para formar diversos tipos de designs de anticorpo de cadeia única onde os domínios VH/VL podem emparelhar de forma intramolecular ou intermolecular, nos casos em que os domínios VH e VL são expressos por construtos separados de anticorpo de cadeia única, para formar um sítio de ligação de antígeno monovalente, como a cadeia única Fv (scFv) ou diacorpo; descrito, por exemplo, nas publicações de patente internacionais n.ºs WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 e WO1992/01047.

[0082] "Anticorpo monoclonal" se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de moléculas de anticorpo, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos exceto quanto a possíveis alterações bem conhecidas, como remoção de lisina da terminação C da cadeia pesada do anticorpo ou modificações pós-traducionais como isomerização ou desamidação de aminoácidos, oxidação de metionina, ou dsamidação de asparagina ou glutamina. Os anticorpos monoclonais tipicamente se ligam a um epítopo antigênico. Os anticorpos monoclonais biespecíficos se ligam a dois epítopos antigênicos diferentes. Os anticorpos monoclonais podem ter glicosilação heterogênea dentro da população de anticorpo. O anticorpo monoclonal pode ser monoespecífico ou multiespecífico, como biespecífico, monovalente, bivalente ou multivalente.

[0083] "Isolado" se refere a uma população homogênea de moléculas (como polinucleotídeos sintéticos ou uma proteína como um anticorpo) que foram substancialmente separadas e/ou purificadas na direção contrária a outros componentes do sistema que as moléculas são produzidas, como uma célula recombinante, bem como uma proteína que foi submetida a ao menos uma etapa de purificação ou isolamento. "Anticorpo isolado" se refere a um anticorpo que é substanci-

almente isento de outro material celular e/ou produtos químicos e abrange anticorpos que são isolados a uma pureza mais alta, como 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de pureza.

[0084] Os "anticorpos" incluem anticorpos gerados com o uso de várias tecnologias, incluindo anticorpos gerados a partir de animais imunizados como camundongos, ratos, coelhos ou galinhas, ou identificados a partir de bibliotecas de exibição de fago ou mamíferos conforme descrito na presente invenção.

[0085] "Anticorpo humanizado" se refere a um anticorpo no qual ao menos uma CDR é derivada de espécies não humanas, e ao menos um estrutura principal ("estrutura") é derivado das sequências de imunoglobulinas humanas. O anticorpo humanizado pode incluir substituições nas estruturas principais de modo que as estruturas principais podem não ser cópias exatas da imunoglobulina humana expressa ou das sequências gênicas da linhagem germinativa da imunoglobulina humana.

[0086] "Anticorpo humano" se refere a um anticorpo que é otimizado para ter o mínimo de resposta imunológica quando administrado a um indivíduo humano. Regiões variáveis de anticorpo humano são derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Se o anticorpo tiver uma região constante ou uma porção da região constante, a região constante também é derivada das sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana.

[0087] O anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que são "derivadas de" sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana se as regiões variáveis do anticorpo são obtidas de um sistema que usa genes de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Esses sistemas exemplificadores são bibliotecas de genes de imunoglobulina humana, exibidas em fago

ou células de mamíferos, e animais transgênicos não humanos, como camundongos ou ratos, galinhas carregando loci de imunoglobulina humana. "Anticorpo humano" tipicamente contém diferenças de aminoácidos em comparação com as imunoglobulinas expressas em seres humanos devido às diferenças entre os sistemas usados para obter o anticorpo e loci de imunoglobulina humana, introdução de mutações somáticas de ocorrência natural, introdução intencional de substituições na estrutura principal ou CDRs. A sequência de aminoácidos do "anticorpo humano" é tipicamente cerca de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos codificada por sequências da imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Em alguns casos, o "anticorpo humano" pode conter sequências de estrutura principal de consenso derivadas de análises de sequências de estrutura principal humano, por exemplo, conforme descrito em (Knappik et al. (2000) J Mol Biol 296: 57-86), ou HCDR3 sintética incorporada em bibliotecas de genes de imunoglobulina humana expostas em fago, por exemplo, conforme descrito em (Shi et al. (2010) J Mol Biol 397: 385-96), e na publicação de patente internacional nº WO2009/085462. Anticorpos nos quais as CDRs são derivadas de uma espécie não humana não são incluídos na definição de "anticorpo humano".

[0088] "Recombinante" se refere a anticorpos e outras proteínas que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes.

[0089] "Epítopo" se refere a uma porção de um antígeno a qual um anticorpo se liga especificamente. Os epítopos normalmente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativa (como polar, não polar ou hidrofóbica) de porções como aminoácidos ou cadeias laterais de polissacarídeos e podem ter características estruturais tri-

dimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Um epítopo pode ser composto por aminoácidos contíguos ou descontíguos que formam uma unidade espacial conformacional. Para um epítopo não contíguo, aminoácidos de porções diferentes da sequência linear do antígeno ficam em estreita proximidade no espaço tridimensional por meio do enovelamento da molécula de proteína.

[0090] "Multiespecífico(a)" se refere a uma proteína, como um anticorpo que se liga especificamente a dois ou mais antígenos distintos ou a dois ou mais epítopos distintos no mesmo antígeno. A proteína multiespecífica pode ter reatividade cruzada com outros antígenos relacionados, por exemplo, com o mesmo antígeno de outras espécies (homólogos), como humanos ou macacos, por exemplo, *Macaca fascicularis* (cinomolgo, cino), *Pan troglodytes* (chimpanzé, chimp) ou *Callithrix jacchus* (sagui comum, sagui) ou pode ser ligar a um epítopo que é compartilhado entre dois ou mais antígenos distintos.

[0091] "Biespecífico(a)" se refere a uma proteína, como um anticorpo, que se liga especificamente a dois antígenos distintos ou a dois epítopos distintos no mesmo antígeno. A proteína biespecífica pode ter reatividade cruzada com outros antígenos relacionados, por exemplo, com o mesmo antígeno de outras espécies (homólogos), como humanos ou macacos, por exemplo, *Macaca fascicularis* (cinomolgo, cino), *Pan troglodytes* (chimpanzé, chimp) ou *Callithrix jacchus* (sagui comum, sagui) ou pode ser ligar a um epítopo que é compartilhado entre dois ou mais antígenos distintos.

[0092] "Em combinação com" significa que os fármacos ou agentes terapêuticos são administrados a um indivíduo, como um ser humano, juntos em uma mistura, simultaneamente como agentes únicos ou sequencialmente como agentes únicos em qualquer ordem.

[0093] Os termos "tratar" ou "tratamento" referem-se tanto ao tratamento terapêutico como ao profilático ou a medidas preventivas em

que o objetivo é prevenir ou reduzir (diminuir) uma alteração ou distúrbio fisiológico indesejado. Resultados clínicos benéficos ou desejados incluem o alívio dos sintomas, diminuição da extensão da doença, estado de doença estabilizada (ou seja, não piora), atraso ou abrandamento da progressão da doença, melhora ou paliativo do estado de doença, e remissão (seja parcial ou total), detectável ou indetectável. "Tratamento" pode também significar prolongar a sobrevida em comparação com a sobrevida esperada se um indivíduo não estava recebendo tratamento. Indivíduos que necessitam de tratamento incluem os que já apresentam a doença ou distúrbio, bem como aqueles propensos a apresentar a condição ou distúrbio ou os indivíduos cuja condição ou distúrbio precisa ser prevenido.

[0094] "Quantidade terapeuticamente eficaz" se refere uma quantidade eficaz, em doses e durante os intervalos de tempo necessários, para obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo de fatores, como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo e da habilidade da terapia ou uma combinação de terapias, para induzir uma resposta desejada no indivíduo. Indicadores exemplificadores de uma terapêutica eficaz ou combinação de agentes terapêuticos que incluem, por exemplo, bem-estar aprimorado do paciente.

[0095] "Resposta imunológica" inclui respostas imunológicas mediadas por células T e/ou mediadas por células B. As respostas imunológicas exemplificadoras incluem respostas de célula T, por exemplo, produção de citocinas e citotoxicidade celular. Além disso, o termo resposta imunológica inclui respostas imunológicas que são indiretamente afetadas pela ativação de células, por exemplo, a produção de anticorpos (respostas humorais) e pela ativação de células que respondem a citocinas, por exemplo, macrófagos.

[0096] "Modular negativamente" ou "modulação negativa" se refe-

re a uma redução detectável no nível de uma resposta imunológica em um indivíduo quando comparado com o nível de uma resposta no indivíduo na ausência de um tratamento ou composto, e/ou em comparação com o nível de uma resposta em um indivíduo de outro modo idêntico, mas não tratado.

[0097] "Distúrbio imunológico" se refere a qualquer doença, distúrbio ou sintoma da doença causada por uma atividade do sistema imune, incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias e alergias.

[0098] "Indivíduo" inclui qualquer ser humano ou animal não-humano. "Animais não humanos" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis. Os termos "indivíduo" e "paciente" podem ser usados de maneira intercambiável na presente invenção.

[0099] O termo "vetor" significa um polinucleotídeo capaz de ser duplicado dentro de um sistema biológico ou que pode ser movido entre tais sistemas. Polinucleotídeos vetores contêm tipicamente elementos, como as origens de replicação, sinais de poliadenilação ou marcadores de seleção, que funcionam para facilitar a duplicação ou manutenção desses polinucleotídeos em um sistema biológico. Exemplos desses sistemas biológicos podem incluir uma célula, vírus, animal, planta, e sistemas biológicos reconstituídos que utilizam componentes biológicos capazes de duplicar um vetor. O polinucleotídeo que compreende um vetor pode ser moléculas de DNA ou RNA ou um híbrido das mesmas.

[0100] O termo "vetor de expressão" significa um vetor que pode ser utilizado em um sistema biológico ou em um sistema biológico reconstituído para direcionar a tradução de um polipeptídeo codificado por uma sequência de polinucleotídeo presente no vetor de expressão.

[0101] "Polinucleotídeo" se refere a uma molécula sintética que

compreende uma cadeia de nucleotídeos ligada covalentemente por uma cadeia principal de açúcar-fosfato ou outra ligação química covalente equivalente. O cDNA é um polinucleotídeo sintético exemplificador.

[0102] O termo "polipeptídeo" ou "proteína" significa uma molécula que compreende ao menos dois resíduos de aminoácidos ligados por uma ligação peptídica para formar um polipeptídeo. Pequenos polipeptídeos com menos de 50 aminoácidos podem ser chamados de "peptídeos".

[0103] "Cerca de" significa dentro de uma faixa de erro aceitável para o valor específico conforme determinado pelo versado na técnica, que dependerá em parte de como o valor é medido ou determinado, isto é, as limitações do sistema de medição. Exceto onde explicitamente indicado em contrário dentro dos Exemplos ou em outro local do Relatório Descritivo no contexto de um ensaio específico, resultado específico ou modalidade específica, "cerca de" significa dentro de um desvio padrão por prática na técnica, ou uma faixa de até 5%, qualquer que for maior.

[0104] "Amostra" se refere a uma coleção de fluidos, células ou tecidos similares isolados de um indivíduo, bem como fluidos, células ou tecidos presentes em um indivíduo. Amostras exemplificadoras são fluidos biológicos como sangue, soro e fluidos serosos, plasma, linfa, urina, saliva, fluido cístico, gotas de lágrima, fezes, escarro, secreções mucosais dos tecidos e órgãos secretores, secreções vaginais, fluidos de ascite, fluidos das cavidades pleurais, pericardiais, peritoneais, abdominais e outras cavidades corporais, fluidos coletados por lavagem brônquica, fluido sinovial, soluções líquidas em contato com um indivíduo ou fonte biológica, por exemplo, meio de cultura de célula ou de órgão incluindo meio condicionado de célula ou de órgão, fluidos de lavagem e similares, biópsias de tecido, aspirações de agulha fina, te-

cido ressecado cirurgicamente, culturas de órgãos ou culturas celulares.

[0105] Códigos de aminoácidos de uma letra e de três letras convencionais são usados na presente invenção conforme mostrado na

Tabela 1.

Tabela 1.

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra		Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Alanina	Ala	A		Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R		Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N		Metionina	Met	M
Aspartato	Asp	D		Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C		Prolina	Pro	P
Glutamato	Gln	E		Serina	Ser	S
Glutamina	Glu	Q		Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G		Triptofano	Trp	W
Histidina	His	H		Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I		Valina	Val	V

Composições de Matéria

[0106] São aqui fornecidos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou a fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, polinucleotídeos que codificam os anticorpos aqui fornecidos, vetores, células hospedeiras e métodos de preparo e uso dos anticorpos. Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos podem ser anticorpos agonísticos.

[0107] Alguns pacientes com câncer tratados com inibidores do ponto de checagem imune, incluindo antagonistas de PD-1, desenvolvem eventos adversos relacionados a autoimunes, como sintomas de artrite, colite ou psoríase. Uma hipótese para explicar essa observação é que as células T autorreativas nestes pacientes estavam sendo ativamente suprimidas através de PD-1, e foram "liberadas" na presença

de um antagonista de PD-1. Então é razoável inverter esta hipótese e acreditar que é provável que as células T "já liberadas" nos pacientes que tenham uma doença autoimune poderia ser suprimida através de ligação/agonismo de PD-1/.

[0108] Verificou-se que os SNPs no gene PD-1 de PDCD1 estão associados a uma variedade de doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide, lúpus e espondilite anquilosante (resumidas por Zamani *et al.*, Cell Immunol 2016 310: 27-41). Embora ainda não foram elucidadas funções para o SNPs de PD-1, essas associações podem indicar que uma redução na atividade de PD-1 pode levar a uma redução na supressão de células T, o que pode aumentar a suscetibilidade à doença autoimune.

[0109] Existe uma necessidade de agentes terapêuticos para suprimir células T autorreativas nas doenças autoimunes. Células T de PD-1⁺ foram encontradas em tecidos de pacientes com doenças autoimunes, incluindo artrite reumatoide e síndrome de Sjogren (Wan *et al.*, Immunol 2006 177(12):8844-50.; Kobayashi *et al.*, J Rheumatol 2005 32(11):2156-63). Um anticorpo capaz de agonizar PD-1 poderia ser usado para suprimir a proliferação de células T e a liberação de citocinas, para limitar os danos nos tecidos e restaurar a homeostase imune. Um anticorpo agonista de PD-1 seria direcionado a células ativadas em vez de células T puras (sem tratamento prévio) e de memória em repouso e células B. Desta forma o agente terapêutico iria suprimir respostas imunológicas em relação a autoantígenos em pacientes com doenças autoimunes sem comprometer as respostas imunes de memória a patógenos. Dois tipos de célula T que expressam altos níveis de PD-1, T_{FH} e T_{PH}, promovem respostas de células B e produção de anticorpo (Rao *et al.*, Nature 2017; 542: 110-114). A frequência dessas células é aumentada em doenças autoimunes induzidas pela produção de autoanticorpos, incluindo artrite reumatoide, lúpus erite-

matoso sistêmico e síndrome de Sjogren (Rao *et al.*, *Nature* 2017; 542: 110-114; He *et al.*, *Immunity* 2013; 39: 770-781; Verstappen *et al.*, *Arthr e Rheum* 2017; 69(9): 1850-1861). Os anticorpos da invenção, além de fornecerem supressão de células T ativadas podem esgotar seletivamente células que exibem alta expressão de PD-1, como células T_{FH} e T_{PH}.

[0110] A invenção fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou a um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0111] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e/ou uma LCDR3 de qualquer um dos anticorpos PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850, PD1B512, PD1B756, PD1B757, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 ou PD1B1095.

[0112] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que compreende uma estrutura principal de região variável de cadeia pesada (VH) e/ou uma estrutura principal de região variável de cadeia leve (VL) de qualquer um dos anticorpos PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850, PD1B512, PD1B756, PD1B757, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 ou PD1B1095.

[0113] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que compreende a VH e/ou a VL de qualquer um dos anticorpos PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, PD1B850, PD1B512, PD1B756, PD1B757, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 ou PD1B1095.

[0114] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo é um anticorpo agonístico.

[0115] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo medeia ADCC de células que expressam PD-1.

[0116] Em algumas modalidades, as células que expressam PD-1 são células T de memória ativadas, células T helper foliculares (T_{FH}) ou células T helper periféricas (T_{PH}), ou qualquer combinação das mesmas. As células T_{FH} podem ser identificadas como: vivas, CD19-CD56-/CD4+CD45RO+/HLADR+/CXCR5+/ICOS+PD1+; As células T_{PH} podem ser identificadas como: vivas, CD19-CD56-/CD4+CD45RO+/HLADR+/CXCR5-/ICOS+PD1+; A combinação de células T_{FH}/T_{PH} podem ser identificados como: vivas, CD19-CD56-/CD4+CD45RO+/HLADR+/ICOS+PD1. As células T de memória podem ser identificadas como $CD4^+ CD45RO^+$ ou $CD8^+ CD45RO^+$.

Anticorpos da linhagem de PD1B505

[0117] Os mAbs PD1B505, PD1B742, PD1B743, PD1B878, PD1B1085, PD1B1086, PD1B1087, PD1B1088, PD1B1089, PD1B1090, PD1B1091, PD1B1092, PD1B1093, PD1B1094 ou PD1B1095 são anticorpos exemplificadores da linhagem de mAb PD1B505. Estes mAbs têm regiões CDR regiões idênticas, exceto que

alguns anticorpos têm uma diferença de aminoácidos na HCDR2 e uma ou duas diferenças de aminoácidos na LCDR1. A identidade da região VH é de entre 82 a 100% e a identidade da região VL entre 78 a 100%. Os mAbs da linhagem PD1B505 são ligantes de não bloqueio.

[0118] A linhagem é caracterizada pela HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 165, 4, 166, 6 e 7, respectivamente, e pela sequência gênica de VH da SEQ ID N^o: 118 e a sequência gênica de VL da SEQ ID N^o: 119.

SEQ ID N^o: 165 (HCDR2 genus)

WINIETGXPT;

sendo que a X é E, Y, H ou W.

SEQ ID N^o: 166 (LCDR1 genus)

TASSSX₁X₂SSYLH;

em que:

X₁ é V ou F; e

X₂ é S ou P.

[0119] A invenção também fornece um anticorpo antagonista que se liga especificamente a PD-1, ou uma sua porção de ligação ao antígeno, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 165, 4, 166, 6 e 7, respectivamente.

[0120] Em algumas modalidades, o anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende a HCDR2 das SEQ ID N^{os}: 3, 145, 146 ou 147 e/ou a LCDR1 das SEQ ID N^{os}: 5, 148 ou 149.

[0121] Em algumas modalidades, o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo tem uma, duas, três, quatro ou cinco das seguintes propriedades:

não bloqueia a ligação de PD-L1 a PD-1, sendo que a falta de bloqueio é medida pela incapacidade do anticorpo de inibir o agru-

pamento de células que expressam PD-L1 e que expressam PD-1 conforme descrito no Exemplo 1;

se liga a PD-1 com uma constante de dissociação em equilíbrio (K_D) de cerca de 5×10^{-8} M ou menos, sendo que a K_D é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a $+25^\circ\text{C}$;

se liga a PD-1 com uma constante de associação (k_a) de cerca de 3×10^4 1/Ms ou mais, sendo que a k_a é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 C a $+25^\circ\text{C}$;

se liga a PD-1 com uma constante de dissociação (k_d) de cerca de 3×10^{-3} 1/s ou menos, sendo que a k_d é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a $+25^\circ\text{C}$; ou

inibe a proliferação de células T específicas de antígeno; sendo que a proliferação é avaliada em um ensaio de CMV-PBMC.

[0122] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, compreende a estrutura principal de VH derivado de IGHV7-4-1*1 (SEQ ID N°: 125).

[0123] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, compreende a estrutura principal de VL derivado de IGKV3D-20*1 (SEQ ID N°: 126).

[0124] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, compreende a estrutura principal de VH derivado de IGHV7-4-1*1 (SEQ ID N°: 125) e a estrutura principal da VL derivado de IGKV3D-20*1 (SEQ ID N°: 126).

SEQ ID N°: 125 IGHV7-4-1*1

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGL
EWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTA
VYYCAR

SEQ ID N°: 126 IGKV3D-20*1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPG LAPRL
LIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS
P

[0125] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a região variável da cadeia pesada (VH) da SEQ ID N°: 118. SEQ ID N°: 118 é uma sequência do gênero VH de mABs da linhagem PD1B505.

[0126] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID N°: 119. SEQ ID N°: 118 é uma sequência do gênero VL de mABs da linhagem PD1B505.

[0127] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a VH da SEQ ID N°: 118 e a VL da SEQ ID N°: 119. As CDRs são mostradas em negrito na SEQ ID N°: 118 e SEQ ID N°: 119.

SEQ ID N°: 118 (PD1B505 Linhagem VH gênero)

X₁VQLX₂X₃SGX₄ELKKPGX₅X₆VKX₇SCKAS**GYTFTDYS**MHWVX₈QAP
GX₉GLX₁₀WMG**WINIETGX**₁₁**PTY**AX₁₂X₁₃FX₁₄GRFX₁₅FSLX₁₆TSX₁₇STA
YLQIX₁₈X₁₉LKX₂₀EDTAX₂₁YFCARD**YYGTYFYAMDY**WGQGTGX₂₂X₂₃TV
SS; em que:

X₁ é D ou Q;

X₂ é Q ou V;

X₃ é E ou Q;

X₄ é P ou S;

X₅ é E ou A;

X₆ é T ou S;

X_7 é I ou V;
 X_8 é K ou R;
 X_9 é K ou Q;
 X_{10} é K ou E;
 X_{11} é E, Y, H ou W;
 X_{12} é D ou Q;
 X_{13} é D ou G;
 X_{14} é K ou T;
 X_{15} é A ou V;
 X_{16} é E ou D;
 X_{17} é A ou V;
 X_{18} é F, N ou S;
 X_{19} é F, N ou S;
 X_{20} é N ou S;
 X_{21} é T ou V;
 X_{22} é T ou L; ou
 X_{23} é L ou V.

SEQ ID Nº: 119 (gênero VL da linhagem PD1B505)

X_1 IVLTQSPAX X_2 X X_3 SX X_4 SX X_5 GERX X_6 TX X_7 X X_8 CTASSSX X_9 X X_{10} SSYLHWYQQKP
 GX X_{11} X X_{12} PX X_{13} LX X_{14} IY**STSNLAS**GX X_{15} PX X_{16} RFSGSGSGTX X_{17} X X_{18} X X_{19} LTISX X_{20}
 X_{21} EX X_{22} EDX X_{23} AX X_{24} YYCH_QYHRSPLTFGX X_{25} GTKLEX X_{26} K; em que:

X_1 é Q ou E;
 X_2 é I ou T;
 X_3 é M ou L;
 X_4 é A ou L;
 X_5 é L ou P;
 X_6 é V ou A;
 X_7 é M ou L;
 X_8 é T ou S;
 X_9 é V ou F;

X₁₀ é S ou P;
X₁₁ é S ou L;
X₁₂ é S ou A;
X₁₃ é K ou R;
X₁₄ é W ou L;
X₁₅ é V ou I;
X₁₆ é A ou D;
X₁₇ é S ou D;
X₁₈ é Y ou F;
X₁₉ é S ou T;
X₂₀ é S ou R;
X₂₁ é M ou L;
X₂₂ é A ou P;
X₂₃ é A ou F;
X₂₄ é T ou V;
X₂₅ é A ou Q; e
X₂₆ é L ou I.

[0128] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a VH das SEQ ID N^{os}: 8, 9, 10, 140, 141 ou 142.

[0129] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende a VL das SEQ ID N^{os}: 14, 15, 16, 143 ou 144.

[0130] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a VH das SEQ ID N^{os}: 8, 9, 10, 140, 141 ou 142 e a VL das SEQ ID N^{os}: 14, 15, 16, 143 ou 144.

[0131] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a

LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente.

[0132] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 8, 9 ou 10 e a VL das SEQ ID N^{os}: 14, 15 ou 16.

[0133] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada (HC) da SEQ ID N^o: 20, 21 ou 22 e uma cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 26, 27 ou 28.

[0134] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 16. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 28. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0135] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 16. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 28. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0136] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se

liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 16. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 28. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0137] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 148, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 10 e a VL da SEQ ID N^o: 143. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 153. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0138] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 149, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 10 e a VL da SEQ ID N^o: 144. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 154. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso

sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0139] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 148, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 143. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 153. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0140] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 148, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 143. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 153. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0141] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 148, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 143. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da

SEQ ID N°: 153. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0142] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 2, 145, 4, 149, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 144. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N°: 150 e a LC da SEQ ID N°: 154. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0143] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 2, 146, 4, 149, 6 e 7, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 144. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N°: 151 e a LC da SEQ ID N°: 154. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0144] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 2, 147, 4, 149, 6 e 7,

respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 144. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N°: 152 e a LC da SEQ ID N°: 154. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0145] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo é um anticorpo agonístico.

[0146] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, sendo o anticorpo compete pela ligação a PD-1 com o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende

- a VH da SEQ ID N°: 8 e a VL da SEQ ID N°: 14;
- a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 15;
- a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 144;
- a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 144;
- a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 144; ou
- a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 144.

[0147] A invenção também fornece na presente invenção um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo se liga ao mesmo epítipo que é ligado pelo anticorpo que compreende

a VH da SEQ ID N°: 8 e a VL da SEQ ID N°: 14;
a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 15;
a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 144;
a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 144;
a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 144; ou
a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 144.

[0148] Em algumas modalidades, a VH e a VL ou a HC e a LC do anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno dos mesmos são aqui fornecidos codificado por um polinucleotídeo compreendendo a sequência de polinucleotídeo das

SEQ ID N°s: 11 e 17, respectivamente;
SEQ ID N°s: 12 e 18, respectivamente;
SEQ ID N°s: 12 e 19, respectivamente;
SEQ ID N°s: 13 e 19, respectivamente;
SEQ ID N°s: 23 e 29, respectivamente;
SEQ ID N°s: 24 e 30, respectivamente;
SEQ ID N°s: 24 e 31, respectivamente;

SEQ ID N^{os}: 25 e 31, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 132 e 133, respectivamente; ou
SEQ ID N^{os}: 134 e 135, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 155 e 19, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 156 e 19, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 157 e 19, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 13 e 158, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 13 e 159, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 155 e 158, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 156 e 158, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 157 e 158, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 155 e 159, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 156 e 159, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 157 e 159, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 160 e 31, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 161 e 31, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 162 e 31, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 25 e 163, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 25 e 164, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 160 e 163, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 161 e 163, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 162 e 163, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 160 e 164, respectivamente;
SEQ ID N^{os}: 161 e 164, respectivamente; ou
SEQ ID N^{os}: 162 e 164, respectivamente.

Anticorpos da Linhagem de PD1B506

[0149] Os mAbs PD1B506, PD1B750, PD1B751, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849 e PD1B850 são anticorpos exemplificadores da linhagem de mAb PD1B506. Esses mAbs têm HCDR1, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 idênticas, e uma variante

de HCDR2. A identidade da região VH é de entre 80 a 100% e a identidade da região VL cerca de 98%. Os mAbs da linhagem PD1B506 são bloqueantes de ligante. A linhagem é caracterizada pela HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 124, 40, 41, 42 e 43, respectivamente, e pela sequência do gênero VH de SEQ ID N^o: 120 e a sequência do gênero da SEQ ID N^o: 121.

[0150] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento que se liga ao antígeno do mesmo que compreende a HCDR1, a HCDR2 e a HCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 124, 40, 41, 42 e 43, respectivamente.

SEQ ID N^o: 124 (gênero HCDR2 da linhagem PD1B506)

EINPNX₁X₂GIN; em que:

X₁ é N, D, Q, K ou E; e

X₂ é G, A ou I.

[0151] Em algumas modalidades, o anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende a HCDR2 das SEQ ID NOs 33, 34, 35, 36, 37, 38 ou 39.

[0152] Em algumas modalidades, o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo fornecido na presente invenção tem uma, duas, três, quatro ou cinco das seguintes propriedades:

bloqueia a ligação de PD-L1 a PD-1, sendo que o bloqueio é medido pela capacidade do anticorpo de inibir o agrupamento de células que expressam PD-L1 e que expressam PD-1 conforme descrito no Exemplo 1;

se liga a PD-1 com uma constante de dissociação em equilíbrio (K_D) de cerca de 5×10^{-8} M ou menos, sendo que a K_D é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a +25°C;

se liga a PD-1 com uma constante de associação (k_a) de cerca de 4×10^5 1/Ms ou mais, sendo que a k_a é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 C a +25°C;

se liga a PD-1 com uma constante de dissociação (k_d) de cerca de 1×10^{-2} 1/s ou menos, sendo que a k_d é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a $+25^\circ\text{C}$; ou

inibe a proliferação de células T específicas de antígeno; sendo que a proliferação é avaliada em um ensaio de CMV-PBMC conforme descrito no Exemplo 1.

[0153] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, compreende a estrutura principal de VH derivado de IGHV1-2*02 (SEQ ID N°: 127).

[0154] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, compreende a estrutura principal de VL derivado de IGKV 1D-16*1 (SEQ ID N°: 128).

[0155] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, compreende a estrutura principal de VH derivado de IGHV1-2*02 (SEQ ID N°: 127) e a estrutura principal da VL derivado de IGKV1D-16*1 (SEQ ID N°: 128).

SEQ ID N°: 127 IGHV1-2*02

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGL
EWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDT
AVYYCAR

SEQ ID N°: 128 IGKV1D-16*1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSL
IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSY
P

[0156] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a região variável da cadeia pesada (VH)

da SEQ ID N°: 120. SEQ ID N°: 120 é uma sequência do gênero VH de mABs da linhagem de PD1B506.

[0157] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID N°: 121. SEQ ID N°: 121 é uma sequência do gênero VL de mABs da linhagem de PD1B506.

[0158] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a VH da SEQ ID N°: 120 e a VL da SEQ ID N°: 121. As CDRs estão em negrito na SEQ ID N°: 120 e SEQ ID N°: 121.

SEQ ID N°: 120 (gênero VH da linhagem de PD1B506)

QVQLX₁QX₂GAEX₃X₄KPGASVKX₅SCKAS**GYTFTTYWMHWV**X₆QX₇P
GQGLEWX₈**GEINPNX₉X₁₀GINY**

X₁₁X₁₂KFX₁₃X₁₄X₁₅X₁₆TLTVDKSX₁₇STAYMX₁₈LSX₁₉LX₂₀SX₂₁D

X₂₂AVYYCT**IDYYDYGGY**WGQGTX₂₃X₂₄TVSS; em que:

- X₁ é Q ou V;
- X₂ é S ou P;
- X₃ é L ou V;
- X₄ é V ou K;
- X₅ é L ou V;
- X₆ é K ou R;
- X₇ é R ou A;
- X₈ é I ou M;
- X₉ é N, D, Q, K ou E;
- X₁₀ é G, A ou I;
- X₁₁ é N ou A;
- X₁₂ é E ou Q;
- X₁₃ é K ou Q;

X_{14} é K ou G;
 X_{15} é K ou R
 X_{16} é A ou V;
 X_{17} é S ou I;
 X_{18} é Q ou E;
 X_{19} é S ou R;
 X_{20} é T ou R;
 X_{21} é E ou D;
 X_{22} é S ou T;
 X_{23} é T ou L; e
 X_{24} é L ou V.

SEQ ID Nº: 121 (gênero VL da linhagem PD1B506)

DIX₁MTQXS₂X₃X₄X₅SX₆SVX₇DRVX₈X₉TCKASQNVGTNVAWYQQKPX
₁₀X₁₁X₁₂PKX₁₃LIY**SASRYSGV**PX₁₄RFX₁₅GSGSGTDFTLTIX₁₆X₁₇X₁₈Q
 X₁₉EDX₂₀AX₂₁YX₂₂**CQQYNIYPYTF**GX₂₃GTKLEX₂₄K; em que:

X_1 é V ou Q;
 X_2 é Q ou P;
 X_3 é K ou S;
 X_4 é F ou S;
 X_5 é M ou L;
 X_6 é T ou A;
 X_7 é R ou G;
 X_8 é S ou T;
 X_9 é V ou I;
 X_{10} é G ou E;
 X_{11} é Q ou K;
 X_{12} é S ou A;
 X_{13} é A ou S;
 X_{14} é D ou S;
 X_{15} é T ou S;

X_{16} é T ou S;
 X_{17} é N ou S;
 X_{18} é V ou L;
 X_{19} é S ou P;
 X_{20} é L ou F;
 X_{21} é E ou T;
 X_{22} é F ou Y;
 X_{23} é S ou Q; e
 X_{24} é M ou I.

[0159] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a VH das SEQ ID N^{os}: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51.

[0160] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62.

[0161] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a VH das SEQ ID N^{os}: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51 e a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62.

[0162] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 33, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 44 ou 45 e a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 66 ou 67 e a LC das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0163] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 34, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 46 e a VL da SEQ ID N^o: 61. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 68 e a LC da SEQ ID N^o: 83. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0164] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 35, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 47 e a VL da SEQ ID N^o: 61. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 69 e a LC da SEQ ID N^o: 83. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0165] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 36, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 48 e a VL da SEQ ID N^o: 61. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 70 e a LC da SEQ ID N^o: 83. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de

um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0166] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 37, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 49 e a VL da SEQ ID N^o: 61. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 71 e a LC da SEQ ID N^o: 83. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0167] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 38, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 50 e a VL da SEQ ID N^o: 61. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 72 e a LC da SEQ ID N^o: 83. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0168] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 39, 40, 41, 42 e 43, respectivamente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a VH da SEQ ID N^o: 51 e a VL da SEQ ID N^o: 61. Em algumas modali-

dades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID Nº: 73 e a LC da SEQ ID Nº: 83. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0169] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo agonístico.

[0170] A invenção também fornece aqui um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo compete pela ligação a PD-1 com o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende:

- a VH da SEQ ID Nº: 44 e a VL da SEQ ID Nº: 60;
- a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 62;
- a VH da SEQ ID Nº: 46 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 47 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 48 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 49 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 50 e a VL da SEQ ID Nº: 61; ou
- a VH da SEQ ID Nº: 51 e a VL da SEQ ID Nº: 61.

[0171] A invenção também fornece na presente invenção um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo se liga ao mesmo epítipo que é ligado pelo anticorpo que compreende

- a VH da SEQ ID Nº: 44 e a VL da SEQ ID Nº: 60;
- a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 62;
- a VH da SEQ ID Nº: 46 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
- a VH da SEQ ID Nº: 47 e a VL da SEQ ID Nº: 61;

a VH da SEQ ID Nº: 48 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 49 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 50 e a VL da SEQ ID Nº: 61; ou
a VH da SEQ ID Nº: 51 e a VL da SEQ ID Nº: 61.

[0172] Em algumas modalidades, a VH e a VL ou a HC e a LC do anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou ao fragmento de ligação a antígeno dos mesmos são aqui fornecidos codificado por um polinucleotídeo compreendendo a sequência de polinucleotídeo das

SEQ ID Nºs: 52 e 63, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 53 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 53 e 65, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 54 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 55 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 56 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 57 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 58 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 59 e 64, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 74 e 85, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 75 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 75 e 87, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 76 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 77 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 78 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 79 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 80 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 81 e 86, respectivamente;
SEQ ID Nºs: 136 e 137, respectivamente; ou
SEQ ID Nºs: 138 e 139, respectivamente.

Anticorpos da linhagem de PD1B512

[0173] As mAbs PD1B505, PD1B756 e PD1B757 são anticorpos

exemplificadores da linhagem de mAb PD1B512. Esses mAbs têm regiões CDR idênticas com a identidade da região VH de cerca de 84% e a identidade da região VL entre 90 a 99%. Os mAbs da linhagem PD1B512 são ligantes de não bloqueio. A linhagem é caracterizada pela HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 88, 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente, e pela sequência gênica de VH da SEQ ID N^o: 122 e a sequência gênica de VL da SEQ ID N^o: 123.

[0174] A invenção também fornece um anticorpo antagonista que se liga especificamente a PD-1, ou uma sua porção de ligação ao antígeno, que compreende a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 88, 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente.

[0175] Em algumas modalidades, o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo não bloqueia a ligação de PD-L1 a PD-1, sendo que a falta de bloqueio é medida pela incapacidade do anticorpo de inibir o agrupamento de células que expressam PD-L1 e que expressam PD-1, conforme descrito no Exemplo 1.

[0176] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo fornecido aqui compreende a estrutura principal de VH derivado de IIGHV2-5*04 (SEQ ID N^o: 129).

[0177] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo, fornecido aqui compreende a estrutura principal de VL derivado de IGKV2-28*01 (SEQ ID N^o: 130).

[0178] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do mesmo fornecido aqui compreende a estrutura principal de VH derivado de IIGHV2-5*04 (SEQ ID N^o: 129 e a estrutura principal da VL deri-

vado de IGKV2-28*01 (SEQ ID N°: 130).

SEQ ID N°: 129 IGHV2-5*04

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE
WLALIYWND DKRYSPSLKSRLTITKDT SKNQVVL TMTNMDPVDTGT
YCV

SEQ ID N°: 130 IGKV2-28*01

DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQ
SPQLLIYLG SNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM
QALQTP

[0179] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a região variável da cadeia pesada (VH) da SEQ ID N°: 122. SEQ ID N°: 122 é uma sequência do gênero VH de mABs da linhagem de PD1B512.

[0180] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a região variável da cadeia leve (VL) da SEQ ID N°: 123. SEQ ID N°: 123 é uma sequência do gênero VL de mABs da linhagem de PD1B512.

[0181] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a VH da SEQ ID N°: 122 e a VL da SEQ ID N°: 123. As CDRs estão em negrito na SEQ ID N°: 122 e SEQ ID N°: 123.

SEQ ID N°: 122 (gênero VH da linhagem de PD1B112)

QX₁TLKESGPX₂LX₃X₄PX₅QTLX₆LTCX₇FSG**FSLSTSGM**GVSWIRQPX
8GKX₉LEWLA**HIYWDDDKRY**X₁₀PSLKSRLTIX₁₁KDTSX₁₂NQVX₁₃LX₁₄X
15TX₁₆X₁₇DX₁₈X₁₉DTGTYYCVRK**GYDYGYVMDY**WGQGTX₂₀VTVSS,
em que

X₁ é V ou I;

X_2 é G ou T;
 X_3 é L ou V;
 X_4 é Q ou K;
 X_5 é S ou T;
 X_6 é S ou T;
 X_7 é S ou T;
 X_8 é S ou P;
 X_9 é G ou A;
 X_{10} é N ou S;
 X_{11} é S ou T;
 X_{12} é S ou K;
 X_{13} é F ou V;
 X_{14} é K ou T;
 X_{15} é I ou M;
 X_{16} é S ou N;
 X_{17} é V ou M;
 X_{18} é T ou P;
 X_{19} é A ou V; e
 X_{20} é T ou L.

SEQ ID Nº: 123 (gênero VL da linhagem PD1B112)

DIVMTQX₁X₂LSX₃PVTX₄GX₅X₆ASISCRSSKSLLHSNGITYLNWYLQK
 PGQSPQLLIY**QMSNLAS**GVDPDRFSX₇SGSGTDFTLX₈ISRVEAEDVGV
 YYCA**QNL**ELPLTFGX₉GTKX₁₀EX₁₁K, em que

X_1 é A ou S;
 X_2 é A ou P;
 X_3 é N ou L;
 X_4 é L ou P;
 X_5 é T ou E;
 X_6 é S ou P;
 X_7 é S ou G;

X_8 é R ou K;
 X_9 é S ou G;
 X_{10} é L ou V; e
 X_{11} é M ou I.

[0182] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a VH das SEQ ID N^{os}: 94 ou 95.

[0183] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende a VL das SEQ ID N^{os}: 98, 99 ou 100.

[0184] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a VH da sSEQ ID N^{os}: 94 ou 95 e a VL das SEQ ID N^{os}: 98, 99 ou 100.

[0185] A invenção também fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende a VH da SEQ ID N^o: 94 e a VL da SEQ ID N^o: 98. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 104 e a LC da SEQ ID N^o: 108. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0186] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende a VH da SEQ ID N^o: 95 e a VL da SEQ ID N^o: 99. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N^o: 105 e a LC da SEQ ID N^o: 109. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0187] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo fornecido aqui compreende a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 100. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende a HC da SEQ ID N°: 105 e a LC da SEQ ID N°: 110. O anticorpo é também fornecido para uso em terapia, como no tratamento de um distúrbio imunológico, artrite reumatoide, lúpus, lúpus eritematoso sistêmico ou doença de enxerto contra hospedeiro.

[0188] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo agnóstico.

[0189] A invenção também fornece aqui um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo compete pela ligação a PD-1 com o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, que compreende:

- a VH da SEQ ID N°: 94 e a VL da SEQ ID N°: 98;
- a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 99; ou
- a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 100.

[0190] A invenção também fornece na presente invenção um anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, sendo que o anticorpo se liga ao mesmo epítopo que é ligado pelo anticorpo que compreende

- a VH da SEQ ID N°: 94 e a VL da SEQ ID N°: 98;
- a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 99; ou
- a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 100.

[0191] Em algumas modalidades, a VH e a VL ou a HC e a LC do anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno dos mesmos são aqui fornecidos codificado por um polinucleotídeo compreendendo a sequência de polinucleotídeo das

SEQ ID N°s: 96 e 101, respectivamente;

SEQ ID N^{os}: 97 e 102, respectivamente;

SEQ ID N^{os}: 97 e 103, respectivamente;

SEQ ID N^{os}: 106 e 111, respectivamente;

SEQ ID N^{os}: 107 e 112, respectivamente; ou

SEQ ID N^{os}: 107 e 113, respectivamente.

Anticorpos homólogos e anticorpos com mutações conservativas

[0192] Variantes dos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos aqui fornecidos estão dentro do escopo da invenção. Por exemplo, as variantes podem compreender 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 ou 29 substituições de aminoácidos na VH e/ou na VL desde que os anticorpos variantes retenham ou tenham propriedades funcionais melhoradas quando comparados com os anticorpos parentais. Em algumas modalidades, a identidade de sequência pode ser cerca de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% com a sequência de aminoácido da VH e/ou da VL da invenção. Em algumas modalidades, a variação está nas regiões de estrutura principal. Em algumas modalidades, as variantes são geradas por substituições conservativas.

[0193] Por exemplo, os anticorpos da linhagem de PD1B505 podem compreender substituições nas posições de resíduo da VH 1, 5, 6, 9, 16, 17, 20, 38, 43, 46, 57, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 84, 85, 88, 93, 116 e/ou 117 (numeração de resíduos de acordo com a SEQ ID N^o: 8) e nas posições de resíduo da VL 1, 10, 11, 13, 15, 19, 21, 22, 29, 30, 43, 44, 46, 48, 59, 61, 71, 72, 73, 78, 79, 81, 84, 86, 101 e/ou 107 (numeração dos resíduos de acordo com a SEQ ID N^o: 14). Os anticorpos da linhagem de PD1B506 podem compreender substituições nas posições de resíduo da VH 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 48, 55, 56, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 76, 82, 85, 87, 89, 91, 112 e/ou 113 (numeração de

resíduos de acordo com a SEQ ID N°: 44) e nas posições de resíduo da VL 3, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 20, 21, 41, 42, 43, 46, 60, 63, 76, 77, 78, 80, 83, 85, 87, 100 e/ou 106 (numeração dos resíduos de acordo com a SEQ ID N°: 60). Os anticorpos da linhagem de PD1B512 podem compreender substituições nas posições de resíduo da VL 2, 10, 12, 13, 15, 19, 23, 43, 46, 62, 72, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90 e/ou 117 e nas posições de resíduo da VL 7, 8, 11, 15, 17, 18, 69, 79, 105, 109 e/ou 111. Substituição conservativas podem ser feitas em quaisquer posições indicadas e os anticorpos variantes resultantes testados quanto a suas características desejadas nos ensaios aqui descritos. Alternativamente, as substituições em um mAb da linhagem podem ser feitas nas posições indicadas pela substituição com o aminoácido correspondente na posição específica presente nos outros anticorpos dentro da linhagem.

[0194] Também são fornecidos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que compreendem a VH e a VL que são ao menos 80% idênticas a

- a VH da SEQ ID N°: 8 e a VL da SEQ ID N°: 14;
- a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 15;
- a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 144;
- a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 144;

a VH da SEQ ID Nº: 141 e a VL da SEQ ID Nº: 144;
a VH da SEQ ID Nº: 142 e a VL da SEQ ID Nº: 144;
a VH da SEQ ID Nº: 44 e a VL da SEQ ID Nº: 60;
a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 62;
a VH da SEQ ID Nº: 46 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 47 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 48 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 49 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 50 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 51 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
a VH da SEQ ID Nº: 94 e a VL da SEQ ID Nº: 98;
a VH da SEQ ID Nº: 95 e a VL da SEQ ID Nº: 99; ou
a VH da SEQ ID Nº: 95 e a VL da SEQ ID Nº: 100.

[0195] Em algumas modalidades, a identidade é 85%. Em algumas modalidades, a identidade é 90%. Em algumas modalidades, a identidade é 91%. Em algumas modalidades, a identidade é 91%. Em algumas modalidades, a identidade é 92%. Em algumas modalidades, a identidade é 93%. Em algumas modalidades, a identidade é 94%. Em algumas modalidades, a identidade é 94%. Em algumas modalidades, a identidade é 96%. Em algumas modalidades, a identidade é 97%. Em algumas modalidades, a identidade é 98%. Em algumas modalidades, a identidade é 99%.

[0196] A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de identidade= n° de posições idênticas/ n° total de posições x 100), levando em consideração o número de lacunas e o comprimento de cada lacuna, as quais precisam ser introduzidas para o alinhamento ideal das duas sequências.

[0197] A porcentagem de identidade entre duas sequências de

aminoácidos pode ser determinada com o uso do algoritmo de E. Meyers e W. Miller (*Comput Appl Biosci* 4:11-17 (1988)), que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) com o uso de uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade por comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade por lacuna de 4. Além disso, a identidade porcentual entre duas sequências de aminoácido pode ser determinada usando-se o algoritmo de Needleman e Wunsch (*J Mol Biol* 48:444-453 (1970)) que foi incorporado ao programa GAP no pacote de software GCG (disponível em http://_www_gcg_com), com o uso de uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso por lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso por comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[0198] Em algumas modalidades, os anticorpos variantes compreendem uma ou duas substituições conservativas em qualquer das regiões CDR, sendo que os anticorpos retêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos parentais.

[0199] "Modificações conservadoras" se referem a modificações de aminoácido que não afetam ou alteram significativamente as características de ligação do anticorpo contendo as modificações de aminoácidos. Modificações conservativas incluem substituições, adições e deleções de aminoácidos. Substituições conservativas de aminoácidos são aquelas em que o aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares são bem definidos e incluem aminoácidos com cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina, triptofano), cadeias

laterais aromáticas (por exemplo, fenilalanina, triptofano, histidina, tirosina), cadeias laterais alifáticas (por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), amida (por exemplo, asparagina, glutamina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina), e cadeias laterais contendo enxofre (cisteína, metionina). Além disso, qualquer resíduo nativo no polipeptídeo pode também ser substituído por alanina, conforme foi previamente descrito para mutagênese por varredura de alanina (MacLennan *et al.*, (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55 a 67; Sasaki *et al.*, (1988) *Adv Biophys* 35:1 a 24). As substituições de aminoácidos aos anticorpos da invenção podem ser realizadas por meio de métodos conhecidos, por exemplo, pela mutagênese por PCR (patente US nº 4.683.195). Alternativamente, as bibliotecas de variantes podem ser geradas, por exemplo, usando códons aleatórios (NNK) ou não aleatórios, por exemplo, códons DVK, que codificam 11 aminoácidos (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). As variantes de anticorpo resultantes podem ser avaliadas quanto as suas características usando-se os ensaios aqui descritos.

Anticorpos Manipulados e Modificados

[0200] Os anticorpos que especificamente se ligam a PD-1 ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção aqui fornecidos podem ainda ser manipulados para gerar anticorpos modificados com propriedades similares ou alteradas em comparação com os anticorpos parentais. A VH, a VL, a VH e a VL, as regiões constantes, a estrutura principal de cadeia pesada, a estrutura principal de cadeia leve ou qualquer ou todas as seis CDRs podem ser manipuladas nos anticorpos da invenção.

[0201] Os anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos podem ser manipulados por enxertia de CDR. Uma ou mais sequências de CDR dos anti-

corpos da invenção podem ser enxertados a uma diferente sequência do arcabouço. A enxertia de CDR pode ser feita usando-se os métodos conhecidos e os métodos aqui descritos.

[0202] As sequências de estrutura a serem usadas podem ser obtidas junto às bases de dados públicas de DNA ou referências publicadas que incluem sequências de genes de anticorpos de linhagem germinativa. Por exemplo, o DNA da linhagem germinativa e as sequências de proteínas codificadas para genes de domínios variáveis de cadeia pesada e leve podem ser encontrados em IMGT®, o sistema internacional de informação ImMunoGeneTics® http://_www-imgt_org. As sequências de estrutura que podem ser usadas para substituir as sequências de estrutura existentes dos anticorpos da invenção podem ser aquelas que mostram a porcentagem mais alta (%) de identidade para os domínios variáveis parentais ao longo de todo o comprimento da VH ou da VL, ou ao longo do comprimento da FR1, FR2, FR3 e FR4. Além disso, estruturas adequadas podem, ainda, ser selecionadas com base nos comprimentos de CDR1 e CDR2 do VH e do VL ou estrutura canônica idêntica de LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1 e HCDR2. Estruturas adequadas podem ser selecionadas com o uso de métodos conhecidos, como a adaptação da estrutura humana descrita na patente U.S. nº 8.748.356 ou super-humanização descrita na patente U.S. Nº 7.709.226.

[0203] As sequências da estrutura dos anticorpos parentais e manipulados podem ser adicionalmente modificadas, por exemplo, por retromutações para restaurar e/ou melhorar a ligação dos anticorpos gerados ao antígeno, conforme descrito, por exemplo, na patente U.S. nº 6.180.370. As sequências da estrutura dos anticorpos parentais e manipulados podem ser adicionalmente modificadas por mutação de um ou mais resíduos dentro da região da estrutura (ou alternativamente dentro de uma ou mais regiões CDR) para remover os epítomos de

células T para assim reduzir a imunogenicidade potencial do anticorpo. Essa abordagem é também chamada de "desimunização" e está descrita em maiores detalhes na publicação de patente U.S. No. US20070014796.

[0204] Os resíduos de CDR dos anticorpos ou dos fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos aqui fornecidos podem ser mutados para melhorar a afinidade dos anticorpos a PD-1.

[0205] Os resíduos de CDR dos anticorpos ou dos fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos aqui fornecidos podem ser mutados para minimizar o risco de modificações pós-traducionais. Os resíduos de aminoácidos de motivos putativos para a desaminação (NS), hidrólise catalisada por ácido (DP), isomerização (DS), ou oxidação (W) podem ser substituídos com qualquer um dos aminoácidos de ocorrência natural para mutagenizar os motivos, e os anticorpos resultantes podem ser testados quanto à sua funcionalidade e estabilidade com o uso dos métodos aqui descritos.

[0206] Os anticorpos que especificamente se ligam a PD-1 ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, fornecidos aqui que são modificados para melhorar a estabilidade, a seletividade, a reatividade cruzada, a afinidade, a imunogenicidade ou outras propriedades biológicas ou biofísicas desejadas estão dentro do escopo da invenção. A estabilidade de um anticorpo é influenciada por inúmeros fatores, incluindo (1) o empacotamento do núcleo dos domínios individuais que afetam sua estabilidade intrínseca, (2) as interações de interface proteína/proteína que têm impacto no pareamento de HC e LC, (3) a disposição de resíduos polares e carregados, (4) a rede de ligação H a resíduos polares e carregados; e (5) a distribuição dos resíduos polares e carregados na superfície entre outras forças intra e intermoleculares (Worn *et al.*, (2001) *J Mol Biol* 305:989-1010). Resíduos com o potencial para desestabilizar estruturas podem ser identificados com

base na estrutura cristalina do anticorpo ou através de modelagem molecular em determinados casos, e o efeito dos resíduos sobre a estabilidade do anticorpo pode ser testado através da geração e da avaliação de variantes que abrigam mutações nos resíduos identificados. Uma das maneiras de aumentar a estabilidade do anticorpo é aumentar a temperatura de transição de ponto médio (T_m) conforme medida por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC). De modo geral, a T_m da proteína está correlacionada com sua estabilidade e inversamente correlacionada com sua suscetibilidade ao desdobramento e desnaturação em solução e aos processos de degradação que dependem da tendência da proteína a se desdobrar (Remmele *et al.*, (2000) *Biopharm* 13:36-46). Inúmeros estudos revelaram a correlação entre a classificação da estabilidade física das formulações medida como estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial (CVD) e a estabilidade física medida por outros métodos (Gupta *et al.*, (2003) *AAPS PharmSci* 5E8; Zhang *et al.*, (2004) *J Pharm Sci* 93:3076-89; Maa *et al.*, (1996) *Int J Pharm* 140:155-68; Bedu-Addo *et al.*, (2004) *Pharm Res* 21:1353-61; Remmele *et al.*, (1997) *Pharm Res* 15:200-8). Os estudos de formulação sugerem que uma T_m de Fab implica na estabilidade física de longo prazo de um mAb correspondente.

Isótipos de anticorpo, alótipos e anticorpos contendo Fc manipulado

[0207] Os anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos aqui fornecidos podem ser de qualquer isótipo ou alótipo conhecido com Fc de tipo selvagem ou manipulado.

[0208] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um isótipo IgG1.

[0209] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui

fornecido é um isótipo IgG2.

[0210] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um isótipo IgG3.

[0211] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um isótipo IgG4.

[0212] Lisina do terminal C (CTL) pode ser removida de anticorpos injetados por carboxipeptidases endógenas que circulam na corrente sanguínea (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). Durante a fabricação, a remoção de CTL pode ser controlada para menos do que o nível máximo pelo controle de concentração de Zn^{2+} extracelular, EDTA ou EDTA – Fe^{3+} conforme descrito na publicação de patente U.S. No. US20140273092. O teor de CTL nos anticorpos pode ser medido com o uso de métodos conhecidos.

[0213] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno dos mesmos aqui fornecido tem um teor de lisina na terminação C de cerca de 10% a cerca de 90%. Em algumas modalidades, o teor de lisina na terminação C é de cerca de 20% a cerca de 80%. Em algumas modalidades, o teor de lisina na terminação C é de cerca de 40% a cerca de 70%. Em algumas modalidades, o teor de lisina na terminação C é de cerca de 55% a cerca de 70%. Em algumas modalidades, o teor de lisina na terminação C é de cerca de 60%.

[0214] A imunogenicidade de anticorpos terapêuticos está associada a um risco aumentado de reações de infusão e diminuição da duração de resposta terapêutica (Baert *et al.*, (2003) *N Engl J Med* 348:602-08). A extensão na qual os anticorpos terapêuticos induzem uma resposta imune no hospedeiro pode ser determinada em parte pelo alótipo do anticorpo (Stickler *et al.*, (2011) *Genes and Immunity*

12:213-21). O alótipo de anticorpo está relacionado às variações de sequência de aminoácidos em locais específicos nas sequências da região constante do anticorpo. A **Tabela 2** mostra os alótipos de IgG1, IgG2 e IgG4 selecionados.

[0215] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um alótipo G2m(n).

[0216] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um alótipo G2m(n-).

[0217] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um alótipo G2m(n)/(n-).

[0218] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um alótipo nG4m(a).

[0219] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é um alótipo G1m(17,1).

Tabela 2.

Alótipo	Resíduo de aminoácido na posição de diversidade (numeração de resíduo: Índice 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

[0220] As mutações de Fc podem ser feitas aos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou aos fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos aqui fornecidos para modular funções efetoras de an-

ticorpo como ADCC, ADCP e/ou ADCP e/ou propriedades farmacocinéticas. Isso pode ser obtido mediante a introdução de mutação(ões) no Fc que modulam a ligação do Fc mutado ao FcγRs de ativação (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), FcγRIIb inibitório e/ou a FcRn.

[0221] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende ao menos uma mutação no anticorpo Fc.

[0222] Em algumas modalidades, os anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreendem uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze ou quinze mutações no fragmento Fc.

[0223] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende ao menos uma mutação no Fc que modula a ligação do anticorpo ao FcRn.

[0224] As posições de Fc que podem ser mutadas para modular a meia-vida dos anticorpos (por exemplo, a ligação de FcRn incluem as posições 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 e 435. As mutações exemplificadoras que podem ser feitas singularmente ou em combinação são as substituições T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A e H435R. Exemplos de mutações singulares ou em combinação que podem ser feitas para aumentar a meia-vida dos anticorpos aqui fornecidos são as mutações M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A e T307A/E380A/N434A. Exemplos de mutações singulares ou em combinação que podem ser feitas para reduzir a meia-vida dos anticorpos aqui fornecidos são as mutações H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A e H435R.

[0225] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especifi-

camente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno compreende uma mutação M252Y/S254T/T256E.

[0226] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende ao menos uma mutação no Fc do anticorpo que reduz a ligação do anticorpo a um receptor Fcγ (FcγR) de ativação e/ou reduz as funções efectoras de Fc como a ligação de C1q, a citotoxicidade dependente de complemento (CDC), a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) ou a fagocitose (ADCP).

[0227] As posições de Fc que podem ser mutadas para reduzir a ligação do anticorpo ao FcγR de ativação R e subsequentemente para reduzir a função efetora incluem as posições 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 e 365. As mutações exemplificadoras que podem ser feitas singularmente ou em combinação são substituições K214T, E233P, L234V, L234A, deleção de G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S e P331S em IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. As mutações em combinações exemplificadoras que resultam nos anticorpos com ADCC reduzida são as mutações L234A/L235A em IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S em IgG2, F234A/L235A em IgG4, S228P/F234A/L235A em IgG4, N297A em todos os isótipos, V234A/G237A em IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-deletado/A327G/P331A/D365E/L358M em IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S em IgG2, S267E/L328F em IgG1, L234F/L235E/D265A em IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S em IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S em IgG4, e S228P/F234A/L235A/G236-deletado/G237A/P238S em IgG4. Também

podem ser usados domínios Fc IgG2/4 híbridos, como Fc com resíduos 117a 260 a partir de IgG2 e os resíduos 261 a 447, de IgG4.

[0228] A mutação exemplificadora que resulta em anticorpos com CDC reduzido é uma mutação K322A reduzida.

[0229] Uma mutação S228P bem conhecida pode ser feita em anticorpos IgG4 para melhorar a estabilidade de IgG4.

[0230] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende uma mutação em ao menos uma posição de resíduo 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 322, 327, 328, 329, 330, 331 ou 365.

[0231] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende ao menos uma mutação selecionada do grupo que consiste em K214T, E233P, L234V, L234A, deleção de G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, K322, A330S e P331S.

[0232] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo, compreende uma mutação em ao menos uma posição de resíduo 228, 234, 235, 237, 238, 268, 322, 330 ou 331.

[0233] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação K322A.

[0234] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação S228P.

[0235] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção compreendem ao menos uma substituição em uma região Fc do anticorpo

que acentua a ligação do anticorpo a um receptor Fcγ (FcγR) e/ou acentua as funções efetoras de Fc como a ligação a C1q, citotoxicidade dependente do complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP).

[0236] As posições de Fc que podem ser mutadas para aumentar a ligação do anticorpo ao FcγR e/ou acentuar as funções efetoras de anticorpo incluem as posições 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 ou 430 (a numeração do resíduo de acordo com o índice EU). As mutações exemplificadoras que podem ser realizadas individualmente ou em combinação são uma mutação G236A, uma mutação S239D, uma mutação F243L, uma mutação T256A, uma mutação K290A, uma mutação R292P, uma mutação S298A, uma mutação Y300L, uma mutação V305L, uma mutação K326A, uma mutação A330K, uma mutação I332E, uma mutação E333A, uma mutação K334A, uma mutação A339T e uma mutação P396L. As substituições em combinação exemplificadoras que resultam em anticorpos com ADCC ou ADCP aumentada são uma mutação S239D/I332E, uma mutação S298A/E333A/K334A, uma mutação F243L/R292P/Y300L, uma mutação F243L/R292P/Y300L/P396L, uma mutação F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L e uma mutação G236A/S239D/I332E em IgG1.

[0237] As posições Fc que podem ser mutadas para melhorar a CDC do anticorpo incluem as posições 267, 268, 324, 326, 333, 345 e 430. As mutações exemplificadoras que podem ser realizadas individualmente ou em combinação são uma mutação S267E, uma mutação F1268F, uma mutação S324T, uma mutação K326A, uma mutação K326W, uma mutação E333A, uma mutação E345K, uma mutação E345Q, uma mutação E345R, uma mutação E345Y, uma mutação

E430S, uma mutação E430F e uma mutação E430T. As mutações em combinação exemplificadoras que resultam em anticorpos com CDC aumentada são uma mutação K326A/E333A, uma mutação K326W/E333A, uma mutação H268F/S324T, uma mutação S267E/H268F, uma mutação S267E/S324T e uma mutação S267E/H268F/S324T em IgG1.

[0238] Em algumas modalidades, o anticorpo que especificamente se liga a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende ao menos uma mutação na região Fc que intensifica a ligação do anticorpo ao FcγRIIb. A ligação intensificada a FcγRIIb pode resultar na atenuação das células B FcγRIIb+, e/ou resultar no agrupamento do anticorpo e na subsequente ativação de PD-1 nas vias de sinalização a jusante.

[0239] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação S267E.

[0240] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação S267D.

[0241] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação S267E/I332E.

[0242] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação S267E/L328F.

[0243] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo compreende uma mutação G236D/S267E.

[0244] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo

compreende uma mutação P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R.

[0245] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende uma mutação P238D.

[0246] A "citotoxicidade celular dependente de anticorpo", "citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" ou "CCDA" é um mecanismo para induzir morte celular que depende da interação das células-alvo revestidas com anticorpo com células efetoras que possuem atividade lítica, como células natural killer (NK), monócitos, macrófagos e neutrófilos através de receptores gama Fc (FcγR) expressos sobre as células efetoras. Por exemplo, células NK expressam FcγRIIIa, enquanto que os monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIIIa. A atividade de ADCC dos anticorpos aqui fornecidos pode ser avaliada com o uso de um ensaio *in vitro* com o uso de células que expressam a PD-1 como células-alvo e células NK como células efetoras. A citólise pode ser detectada pela liberação do marcador (por exemplo, substratos radioativos, corantes fluorescentes ou proteínas intracelulares naturais) proveniente das células lisadas. Em um ensaio exemplificador, as células-alvo são usadas com uma razão entre células-alvo e células efetoras de 1:4. As células-alvo são pré-identificadas com BATDA e combinada com células efetoras e o anticorpo de teste. As amostras são incubadas durante 2 horas e a lise celular medida pela medição de BATDA liberado no sobrenadante. Os dados são normalizados para citotoxicidade máxima com 0,67% de Triton X-100 (Sigma Aldrich) e controle mínimo determinado pela liberação espontânea de BATDA das células-alvo na ausência de qualquer anticorpo.

[0247] A "fagocitose celular dependente de anticorpo" ("FCDA") se refere a um mecanismo de eliminação das células-alvo revestidas com anticorpo por internalização por células fagocíticas, como macrófagos

ou células dendríticas. A ADCP pode ser avaliada pelo uso de macrófagos derivados de monócito como células efetoras e células Daudi (ATCC® CCL-213™) ou quaisquer outras células que expressam PD-1 como células-alvo manipuladas para expressar GFP ou outra molécula marcada. Em um ensaio exemplificador, razão entre células efetoras:células-alvo pode ser, por exemplo, 4:1. As células efetoras podem ser incubadas com as células alvo por 4 horas com ou sem o anticorpo da invenção. Após a incubação, as células podem ser separadas usando acutase. Os macrófagos podem ser identificados com anticorpos anti-CD11b e anti-CD14 unidos a uma etiqueta fluorescente, e o percentual de fagocitose pode ser determinado com base na % de fluorescência de GFP nos macrófagos CD11⁺CD14⁺ usando métodos-padrão.

[0248] "Citotoxicidade dependente de complemento", ou "CDC", se refere a um mecanismo de indução da morte celular no qual o domínio efetor Fc de um anticorpo limitado por alvo se liga e ativa o componente do complemento C1q, que por sua vez ativa a cascata de complemento levando à morte da célula-alvo. A ativação do complemento pode também resultar em deposição de componentes de complemento na superfície das células alvo que facilitam a CDC pela ligação de receptores de complemento (por exemplo, CR3) em leucócitos. A CDC de células pode ser medida, por exemplo, por plaqueamento de células Daudi a 1×10^5 células/poço (50 μ L/poço) em RPMI-B (RPMI suplementado com 1% de BSA), adição de 50 μ L de anticorpos aos poços em uma concentração final entre 0 a 100 μ g/mL, incubação da reação durante 15 minutos à temperatura ambiente, adição de 11 μ L de "pool" de soro humano aos poços e incubação da reação durante 45 min a 37°C. A porcentagem (%) de células lisadas pode ser detectada como % de células marcadas com iodeto de propídio no ensaio FACS com o uso de métodos-padrão.

[0249] A ligação do anticorpo ao FcγR ou FcRn pode ser avaliada em células manipuladas para expressarem cada receptor com o uso de citometria de fluxo. Em um ensaio de ligação exemplificador, 2×10^5 células por poço são semeadas em placa de 96 poços e bloqueadas em Tampão de Coloração Suplementado com BSA ("Bovine Serum Albumin", albumina de soro bovino) ("BSA Stain Buffer", BD Biosciences, San Jose, EUA) durante 30 min a 4°C. As células são incubadas com um anticorpo de teste em gelo durante 1,5 horas a 4°C. Após serem lavadas duas vezes com o tampão de coloração suplementado com BSA, as células são incubadas com anticorpo secundário anti-IgG humana marcado com R-PE (R-Phycoerythrin, R-Ficoeritrina) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 45 minutos a 4°C. As células são lavadas duas vezes em tampão de coloração e então ressuspensas em 150 µL de tampão de coloração contendo corante "DRAQ7 live/dead" diluído 1:200 (Cell Signaling Technology, Danvers, EUA). Sinais de PE e de DRAQ7 das células coradas são detectados por citômetro de fluxo "Miltenyi MACSQuant" (Miltenyi Biotec, Auburn, EUA) com o uso os canais B2 e B4 respectivamente. As células vivas são agrupadas em janela de análise na exclusão DRAQ7 e os sinais de fluorescência média geométrica são determinados para ao menos 10.000 eventos vivos coletados. O software FlowJo (Tree Star) é usado para a análise. Os dados são plotados como o logaritmo da concentração dos anticorpos em função dos sinais de fluorescência média. A análise de regressão não linear é realizada.

[0250] "Intensificar" ou "intensificado" se refere à função efetora intensificada (por exemplo, ADCC, CDC e/ou ADCP) ou à ligação intensificada a um receptor Fcγ (FcγR) ou um FcRn do anticorpo da invenção que tem pelo menos uma mutação na região Fc quando comparada à do anticorpo parental sem a mutação. "Intensificado" pode ser uma intensificação de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais, ou uma intensificação estatisticamen-

te significativa.

[0251] "Reduzir" ou "reduzido" se refere à função efetora reduzida (por exemplo, ADCC, CDC e/ou ADCP) ou à ligação reduzida a um receptor Fcγ (FcγR) ou um FcRn do anticorpo da invenção que tem pelo menos uma mutação na região Fc quando comparada à do anticorpo parental sem a mutação. "Reduzido" pode ser uma redução de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais, ou uma redução estatisticamente significativa.

[0252] "Modular" se refere à função efetora intensificada ou reduzida (por exemplo, ADCC, CDC e/ou ADCP) ou à ligação intensificada ou reduzida a um receptor Fcγ (FcγR) ou um FcRn do anticorpo da invenção que tem pelo menos uma mutação na região Fc quando comparada à do anticorpo parental sem a mutação.

Anticorpos Glicomanipulados

[0253] A capacidade dos anticorpos monoclonais de induzir ADCC pode ser intensificada por manipulação de seu componente oligossacarídeo. A IgG1 e a IgG3 humanas são N-glicosiladas em Asn297 com a maior parte dos glicanos nas formas biantenárias G0, G0F, G1, G1F, G2 ou G2F bem conhecidas. Anticorpos produzidos pelas células CHO não projetadas normalmente possuem um teor de glicano fucose de ao menos 85%. A remoção da fucose de núcleo dos oligossacarídeos do tipo biantenário complexo ligados às regiões Fc aumenta o CCDA de anticorpos através da ligação FcγRIIIa melhorada sem alterar a ligação do antígeno ou atividade do CDC. Tais mAbs podem ser obtidos com o uso de diferentes métodos relatados por levar à expressão bem-sucedida de anticorpos relativamente altamente desfucosilados portando o tipo de complexo biantenário de Fc-oligossacarídeos como controle da osmolalidade da cultura (Konno *et al.*, Cytotechnology 64:249 a 265, 2012), aplicação de uma linhagem variante de CHO, Lec13, como a linhagem celular hospedeira (Shields *et al.*, *J Biol*

Chem 277:26733-26740, 2002), aplicação de uma linhagem variante de CHO, EB66, como a linhagem celular hospedeira Olivier *et al.*, *MAbs*; 2(4): 405-415, 2010; PMID:20562582), aplicação de uma linhagem celular de hibridoma de rato YB2/O como a linhagem celular hospedeira (Shinkawa *et al.*, *J Biol Chem* 278:3.466 a 3.473, 2003), introdução de pequeno RNA de interferência especificamente contra o gene de 1,6-fucosiltransferase (*FUT8*) (Mori *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 88:901 a 908, 2004), ou coexpressão de β -1,4-N-acetilglicosaminiltransferase III e α -manosidase de Golgi II ou um potente inibidor de alfa-manosidase I, cifunensina (Ferrara *et al.*, *J Biol Chem* 281:5.032 a 5.036, 2006, Ferrara *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 93:851 a 861, 2006; Xhou *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

[0254] Em algumas modalidades aqui descritas, os anticorpos da invenção têm uma estrutura de glicano biantenária com teor de fucose de entre cerca de 1% e cerca de 15%, por exemplo, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, ou 1%. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção têm uma estrutura de glicano com teor de fucose de cerca de 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, ou 20%.

[0255] "Teor de fucose" se refere à quantidade do monossacárido de fucose dentro da cadeia de açúcar em Asn297. A quantidade relativa de fucose é a porcentagem de estruturas contendo fucose relacionadas às todas glicoestruturas. Estas podem ser caracterizadas e quantificadas por vários métodos, por exemplo: 1) usando MALDI-TOF de amostra tratada com N-glicosidase F (por exemplo, estruturas de manose complexa, híbrida, oligo e alta), conforme descrito na Patente Internacional n°. WO2008/077546 2); 2) pela liberação enzimática dos glicanos Asn297 com derivatização subsequente e detecção/quantificação por HPLC (UPLC) com detecção de fluorescência e/ou HPLC-MS (UPLC-MS); 3) análise de proteína intacta de mAb nativa ou redu-

zida, com ou sem tratamento dos glicanos Asn297 com Endo S ou outra enzima que cliva entre os primeiros e os segundos monossacarídeos GlcNAc, deixando a fucose unida ao primeiro GlcNAc; 4) digestão de mAb em péptidos constituintes pela digestão enzimática (por exemplo, tripsina ou endopeptidase Lys-C), e posterior separação, detecção e quantificação por HPLC-MS (UPLC-MS); Separação dos oligossacarídeos mAb a partir da proteína mAb pela desglicosilação enzimática específica com PNGase F em Asn 297. Os oligossacarídeos liberados podem ser marcados com um fluoróforo, separados e identificados por diversas técnicas complementares que permitem: ótima caracterização das estruturas de glicano por espectrometria de massa com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) por comparação das massas experimentais com as massas teóricas, determinação do grau de sialilação por HPLC de troca iônica (GlycoSep C), separação e quantificação das formas de oligossacarídeo de acordo com critérios de hidrofobicidade por HPLC em fase normal (GlycoSep N), e separação e quantificação dos oligossacarídeos por eletroforese capilar de alta eficiência-fluorescência induzida por laser (HPCE-LIF).

[0256] "Fucose baixa" ou "baixo teor de fucose" como usado aqui se refere aos anticorpos com teor de fucose de cerca de 0% a 15%.

[0257] "Fucose normal" ou "teor normal de fucose" como usado na presente invenção, se refere aos anticorpos com teor de fucose superior a cerca de 50%, tipicamente, superior a cerca de 80% ou superior a 85%.

Anticorpos anti-idiotípicos

[0258] Os anticorpos anti-idiotípicos são anticorpos que se ligam especificamente aos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 aqui revelados.

[0259] A invenção também fornece um anticorpo anti-idiotípico que

se liga especificamente aos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 aqui fornecido.

[0260] A invenção também fornece um anticorpo anti-idiotípico que se liga especificamente ao anticorpo que compreende

a VH da SEQ ID N°: 8 e a VL da SEQ ID N°: 14;
a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 15;
a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 16;
a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 144;
a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 143;
a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 144;
a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 144;
a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 144;
a VH da SEQ ID N°: 44 e a VL da SEQ ID N°: 60;
a VH da SEQ ID N°: 45 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 45 e a VL da SEQ ID N°: 62;
a VH da SEQ ID N°: 46 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 47 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 48 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 49 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 50 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 51 e a VL da SEQ ID N°: 61;
a VH da SEQ ID N°: 94 e a VL da SEQ ID N°: 98;
a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 99; ou

a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 100.

[0261] Um anticorpo anti-idiotípico (Id) é um anticorpo que reconhece os determinantes antigênicos (por exemplo, o parátopo ou CDRs) do anticorpo. O anticorpo Id pode ser bloqueador ou não bloqueador de antígeno. O Id bloqueador de antígeno pode ser usado para detectar o anticorpo livre em uma amostra (por exemplo, anticorpo anti-PD-1 da invenção aqui descrito). O Id não bloqueador pode ser usado para detectar o anticorpo total (livre, parcialmente ligado ao antígeno, ou totalmente ligado ao antígeno) em uma amostra. Um anticorpo Id pode ser preparado por imunização de um animal com um anticorpo ao qual um anti-Id está sendo preparado.

[0262] Um anticorpo anti-Id pode também ser usado como um "imunógeno" para induzir uma resposta imunológica em ainda um outro animal, produzindo um chamado anticorpo anti-anti-Id. Um anti-anti-Id pode ser epitopicamente idêntico ao mAb original que induziu o anti-Id. Dessa forma, por meio do uso dos anticorpos para os determinantes idiotípicos de um mAb, é possível identificar outros clones idênticos que expressam anticorpos de especificidade idêntica. Os anticorpos anti-ID podem ser variados (produzindo deste modo variantes de anticorpo anti-ID) e/ou derivatizados por qualquer técnica adequada, como aquelas descritas em outro lugar na presente invenção com relação aos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1.

Conjugados dos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 aqui fornecidos

[0263] A invenção também fornece um imunoconjugado que compreende um anticorpo isolado ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a PD-1 conjugado a uma molécula(s) heteróloga(s).

[0264] Em algumas modalidades, a molécula heteróloga é um marcador detectável ou um agente citotóxico.

[0265] A invenção também fornece um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a PD-1 conjugado a um marcador detectável.

[0266] A invenção também fornece um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a PD-1 conjugado a um agente citotóxico.

[0267] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam a PD-1 podem ser usados para direcionar os agentes terapêuticos às células que expressam PD-1. Células como as células T ativadas que superexpressam PD-1 podem ser direcionadas com um anticorpo que se liga especificamente a PD-1 conjugado a um agente citotóxico que mata a célula mediante a internalização do anticorpo PD-1. Alternativamente, as células que expressam PD-1 poderiam ser direcionadas com um anticorpo PD-1 acoplado a um agente terapêutico destinado a modificar a função celular uma vez internalizado.

[0268] Em algumas modalidades, o marcador detectável é também um agente citotóxico.

[0269] O anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo aqui fornecido conjugado a um marcador detectável pode ser usado para avaliar a expressão de PD-1 em uma variedade de amostras.

[0270] O marcador detectável inclui composições que, quando conjugadas ao anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou ao fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido tornam este último detectável através de meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos ou químicos.

[0271] Marcadores detectáveis exemplificadores incluem isótopos radioativos, microesferas magnéticas, microesferas metálicas, partículas coloidais, corantes fluorescentes, reagentes densos em elétrons,

enzimas (por exemplo, como comumente usado em um ELISA), biotina, digoxigenina, haptenos, moléculas luminescentes, moléculas quemiluminescentes, fluorocromos, fluoróforos, agentes de arrefecimento brusco fluorescente, moléculas coloridas, isótopos radioativos, cintilatos, avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, anticorpos ou fragmentos dos mesmos, poli-histidina, Ni^{2+} , marcadores Flag, marcadores myc, metais pesados, enzimas, fosfatase alcalina, peroxidase, luciferase, doadores/receptores de elétrons, ésteres de acridínio e substratos colorimétricos.

[0272] Um marcador detectável pode emitir um sinal espontaneamente, como quando o marcador detectável é um isótopo radioativo. Em outros casos, o marcador detectável emite um sinal como um resultado de ser estimulado por um campo externo.

[0273] Os isótopos radioativos exemplificadores podem ser emissores de γ , emissores de Auger, emissores de β , um emissor alfa ou isótopo radioativo emissor de pósitron. Isótopos radioativos exemplificadores incluem ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{19}F , ^{55}Co , ^{57}Co , ^{60}Co , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{75}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Sr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{115}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{226}Ra , ^{225}Ac e ^{227}Ac .

[0274] Átomos de metal exemplificadores são metais com um número atômico maior que 20, como átomos de cálcio, átomos de escândio, átomos de titânio, átomos de vanádio, átomos de cromo, átomos de manganês, átomos de ferro, átomos de cobalto, átomos de níquel, átomos de cobre, átomos de zinco, átomos de gálio, átomos de germânio, átomos de arsênico, átomos de selênio, átomos de bromo, átomos de criptônio, átomos de rubídio, átomos de estrôncio, átomos de ítrio, átomos de zircônio, átomos de nióbio, átomos de molibdênio, átomos de tecnécio, átomos de rutênio, átomos de ródio, átomos de paládio, átomos de prata, átomos de cádmio, átomos de índio, átomos de estanho, átomos de antimônio, átomos de telúrio, átomos de iodo,

átomos de xenônio, átomos de cézio, átomos de bário, átomos de lantânio, átomos de háfnio, átomos de tântalo, átomos de tungstênio, átomos de rênio, átomos de ósmio, átomos de irídio, átomos de platina, átomos de ouro, átomos de mercúrio, átomos de tálio, átomos de chumbo, átomos de bismuto, átomos de frâncio, átomos de rádio, átomos de actínio, átomos de cério, átomos de praseodímio átomos, átomos de neodímio, átomos de promécio, átomos de samário, átomos de európio, átomos de gadolínio, átomos de térbio, átomos de disprósio, átomos de hólmio, átomos de érbio, átomos de túlio, átomos de itérbio, átomos de lutécio, átomos de tório, átomos de protactínio, átomos de urânio, átomos de neptúnio, átomos de plutônio, átomos de amerício, átomos de cúrio, átomos de berquélio, átomos de califórnio, átomos de einstênio, átomos de férmio, átomos de mendelévio, átomos de nobélio ou átomos de laurêncio.

[0275] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser metais alcalino-terrosos com um número atômico maior que vinte.

[0276] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser lantanídeos.

[0277] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser actinídeos.

[0278] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser metais de transição.

[0279] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser metais pobres.

[0280] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser átomos de ouro, átomos de bismuto, átomos de tântalo e átomos de gadolínio.

[0281] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser metais com um número atômico de 53 (isto é, iodo) a 83 (isto é, bismuto).

[0282] Em algumas modalidades, os átomos de metal podem ser átomos adequados para imageamento por ressonância magnética.

[0283] Os átomos de metal podem ser íons metálicos na forma de estados de oxidação +1, +2, ou +3, como Ba^{2+} , Bi^{3+} , Cs^+ , Ca^{2+} , Cr^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Cu^{3+} , Ga^{3+} , Gd^{3+} , Au^+ , Au^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , F^{3+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , Mn^{7+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ni^{3+} , Ag^+ , Sr^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} e Zn^{2+} . Os átomos de metal podem compreender um óxido metálico, como óxido de ferro, óxido de manganês ou óxido de gadolínio.

[0284] Corantes adequados incluem quaisquer corantes comercialmente disponíveis, como, por exemplo, 5(6)-carboxifluoresceína, IRDye 680RD maleimida ou IRDye 800CW, corantes de polipiridil rutênio e similares.

[0285] Os fluoróforos adequados são isocianato de fluoresceína (FITC), fluoresceína tiosemicarbazida, rodamina, Texas Red, Corantes Cy (por exemplo, Cy3, Cy5, Cy5.5), Alexa Fluors (por exemplo, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), corantes fluorescentes de infravermelho próximo (NIR) (700 - 900 nm), e corantes de carbocianina e aminoestirila.

[0286] O anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido conjugado a um marcador detectável pode ser usado como um agente de imageamento.

[0287] Em algumas modalidades, o anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido é conjugado a um agente citotóxico.

[0288] Em algumas modalidades, o agente citotóxico é um agente quimioterápico, um fármaco, um agente inibidor do crescimento, uma toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos dos mesmos), ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

[0289] Em algumas modalidades, o agente citotóxico é daunomicina, doxorubicina, metotrexato, vindesina, toxinas bacterianas, como a toxina diftérica, ricina, geldanamicina, maitansinoides ou caliqueamicina. O agente citotóxico pode desencadear seus efeitos citotóxicos e citostáticos através de mecanismos que incluem ligação à tubulina, ligação ao DNA ou inibição de topoisomerase.

[0290] Em algumas modalidades, o agente citotóxico é uma toxina enzimaticamente ativa, como a cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxina de difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *saponaaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos.

[0291] Em algumas modalidades, o agente citotóxico é um radio-núclídeo, como ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

[0292] Em algumas modalidades, o agente citotóxico é dolastatina ou análogos e derivados peptídicos de dolastatina, auristatina ou monometil auristatina fenilalanina. Moléculas exemplificadoras são reveladas nas patentes US nº 5.635.483 e 5.780.588. As dolastatinas e as auristatinas demonstraram interferir com a dinâmica de microtúbulos, com a hidrólise de GTP e com a divisão nuclear e celular (Woyke et al (2001) Antimicrob Agents and Chemother. 45 (12): 3580-3584) e têm atividade anticancerígena e antifúngica. A porção de fármaco de dolastatina ou de auristatina pode ser ligada ao anticorpo da invenção através do N-terminal (amino) ou do C-terminal (carboxila) da porção de fármaco peptídico (WO02/088172), ou através de qualquer cisteína manipulada no anticorpo.

[0293] O anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou

o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido pode ser conjugado a um marcador detectável com o uso de métodos conhecidos.

[0294] Em algumas modalidades, o marcador detectável é complexado com um agente quelante.

[0295] Em algumas modalidades, o marcador detectável é conjugado ao anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido, por meio de um ligante.

[0296] O marcador detectável ou a porção citotóxica pode ser ligado direta ou indiretamente ao anticorpo que se liga especificamente a PD-1, ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui fornecido, com o uso de métodos conhecidos. Os ligantes adequados são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, grupos prostéticos, ligantes não fenólicos (derivados de N-succimidil-benzoatos; dodecaborato), porções quelantes de ambos os quelantes macrocíclicos e acíclicos, como derivados de ácido 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano-1,4,7,10, triacético (DOTA), derivados de ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA), derivados de ácido S-2-(4-Isotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) e derivados de ácido 1,4,8,11-tetra-azaciclododecano-1,4,8,11-tetra-acético (TETA), N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (como suberato de dissuccinimidila), aldeídos (como glutaraldeído), compostos bis-azido (como bis (p azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (como bis-(p-diazôniobenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos (como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativos (como 1,5-difluoro 2,4-dinitrobenzeno) e outras porções quelantes. Os ligantes de peptídeo adequados são bem conhecidos.

[0297] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo que aqui fornecido são removidos do sangue por meio de depuração renal.

Kits

[0298] A invenção também fornece um kit que compreende o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo aqui revelado.

[0299] O kit pode ser usado para usos terapêuticos e como kits de diagnóstico.

[0300] O kit pode ser usado para detectar a presença de PD-1 em uma amostra.

[0301] Em algumas modalidades, o kit compreende o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo da invenção e reagentes para a detecção do anticorpo. O kit pode incluir um ou mais outros elementos incluindo: instruções de uso; outros reagentes, por exemplo, um marcador, um agente terapêutico, ou um agente útil para quelação, ou para acoplar de outro modo, um anticorpo a um marcador ou a um agente terapêutico, ou uma composição radioprotetora; dispositivos ou outros materiais para preparar o anticorpo para administração; carreadores farmacologicamente aceitáveis; e dispositivos ou outros materiais para administração a um indivíduo.

[0302] Em algumas modalidades, o kit compreende o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo da invenção em um recipiente e instruções para uso do kit.

[0303] Em algumas modalidades, o anticorpo no kit está marcado.

[0304] Em algumas modalidades, o anticorpo antagonista que se liga especificamente a PD-1 ou a uma porção de ligação ao antígeno do mesmo compreende

a VH da SEQ ID Nº: 8 e a VL da SEQ ID Nº: 14;
 a VH da SEQ ID Nº: 9 e a VL da SEQ ID Nº: 15;
 a VH da SEQ ID Nº: 9 e a VL da SEQ ID Nº: 16;
 a VH da SEQ ID Nº: 10 e a VL da SEQ ID Nº: 16;
 a VH da SEQ ID Nº: 140 e a VL da SEQ ID Nº: 16;
 a VH da SEQ ID Nº: 141 e a VL da SEQ ID Nº: 16;
 a VH da SEQ ID Nº: 142 e a VL da SEQ ID Nº: 16;
 a VH da SEQ ID Nº: 10 e a VL da SEQ ID Nº: 143;
 a VH da SEQ ID Nº: 10 e a VL da SEQ ID Nº: 144;
 a VH da SEQ ID Nº: 140 e a VL da SEQ ID Nº: 143;
 a VH da SEQ ID Nº: 141 e a VL da SEQ ID Nº: 143;
 a VH da SEQ ID Nº: 142 e a VL da SEQ ID Nº: 143;
 a VH da SEQ ID Nº: 140 e a VL da SEQ ID Nº: 144;
 a VH da SEQ ID Nº: 141 e a VL da SEQ ID Nº: 144;
 a VH da SEQ ID Nº: 142 e a VL da SEQ ID Nº: 144;
 a VH da SEQ ID Nº: 44 e a VL da SEQ ID Nº: 60;
 a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 45 e a VL da SEQ ID Nº: 62;
 a VH da SEQ ID Nº: 46 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 47 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 48 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 49 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 50 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 51 e a VL da SEQ ID Nº: 61;
 a VH da SEQ ID Nº: 94 e a VL da SEQ ID Nº: 98;
 a VH da SEQ ID Nº: 95 e a VL da SEQ ID Nº: 99; ou
 a VH da SEQ ID Nº: 95 e a VL da SEQ ID Nº: 100.

Métodos de detecção de PD-1

[0305] A invenção também fornece um método para detectar PD-1 em uma amostra, que compreende obter a amostra, colocar a amostra

em contato com o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos da invenção, e detectar o anticorpo ligado a PD-1 na amostra.

[0306] Em algumas modalidades, a amostra pode ser derivada de urina, sangue, soro, plasma, saliva, ascite, células circulantes, células de tumor circulantes, células sinoviais, células que não estão associadas a tecidos (isto é, células livres), tecidos (por exemplo, tecido de cirurgicamente removido, biópsias, incluindo aspiração por agulha fina), preparações histológicas e similares.

[0307] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção ligados a PD-1 podem ser detectados com o uso de métodos conhecidos. Métodos exemplificadores incluem marcação direta dos anticorpos com o uso de marcadores fluorescentes ou quimioluminescentes, ou radiomarcadores, ou fixação aos anticorpos da invenção de uma porção que é prontamente detectável, como biotina, enzimas ou etiquetas de epítipo. Marcadores e porções exemplificadores são rutênio, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA), peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina e betagalactosidase, poli-histidina (etiqueta HIS), corantes de acridina, corantes de cianina, corantes de fluorona, corantes de oxazina, corantes de fenantridina, corantes de rodamina, corantes Alexa Fluor®.

[0308] Os anticorpos da invenção podem ser usados em uma variedade de ensaios para detectar PD-1 na amostra. Ensaios exemplificadores são análise por transferência de Western (Western blot), radioimunoensaio, ressonância de plasmon de superfície, imunoprecipitação, diálise de equilíbrio, imunodifusão, imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECL), imuno-histoquímica, separação de células ativadas por fluorescência (FACS) ou ensaio ELISA.

Métodos para gerar anticorpos

[0309] Os anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou os

fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos aqui fornecidos podem ser gerados com o uso de várias tecnologias. Por exemplo, o método do hibridoma de Kohler e Milstein pode ser usado para gerar anticorpos monoclonais. No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro, como um hamster, rato ou galinha, é imunizado com antígenos de PD-1 humana e/ou de cino, como o domínio extracelular de PD-1, seguido pela fusão de células de baço dos animais imunizados com células de mieloma com o uso de métodos-padrão para formar células de hibridoma. As colônias produzidas a partir de células de hibridoma únicas imortalizadas podem ser selecionadas quanto à produção de anticorpos com propriedades desejáveis, como especificidade de ligação, reatividade cruzada ou falta da mesma, afinidade para o antígeno, e funcionalidade como atividade agonística;

[0310] As técnicas de humanização exemplificadoras, incluindo a seleção de estruturas do receptor humano, incluem enxerto de CDR (patente U.S. nº 5.225.539), enxerto de SDR (patente U.S. nº 6.818.749), Recomposição de superfícies (Padlan, *Mol Immunol* 28:489 a 499, 1991), Recomposição de superfícies de resíduos determinantes de especificidade (publicação de patente U.S. nº 2010/0261620), adaptação da estrutura humana (patente U.S. nº 8.748.356) ou super-humanização (patente U.S. nº 7.709, 226). Nesses métodos, as CDRs ou um subconjunto de resíduos de CDR de anticorpos parentais são transferidas para estrutura principal humanas que podem ser selecionadas com base em sua homologia total para as estruturas principais parentais, com base na similaridade do comprimento da CDR, na identidade da estrutura canônica ou uma combinação dos mesmos.

[0311] Os anticorpos humanizados podem ser adicionalmente otimizados para melhorar sua seletividade ou afinidade para um antígeno desejado através da incorporação dos resíduos de suporte de estrutu-

ra alterada para preservar a afinidade da ligação (retromutações) por técnicas, como aquelas descritas nas publicações de patentes internacionais n.ºs. WO1090/007861 e WO1992/22653, ou pela introdução de variação em qualquer uma das CDRs, por exemplo, para melhorar a afinidade do anticorpo.

[0312] Animais transgênicos, como camundongos, ratos, ou galinhas carregando loci da imunoglobulina (Ig) humana no seu genoma podem ser usados para gerar anticorpos contra PD-1 e são descritos, por exemplo, na patente US N.º 6.150.584, na publicação de patente internacional N.º WO1999/45962, nas publicações de patentes internacionais N.º WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 e WO1990/04036. Os loci de imunoglobulina endógena nesses animais podem ser interrompidos ou deletados, e ao menos um locus de imunoglobulina humana completo ou parcial pode ser inserido no genoma do animal usando recombinação homóloga ou não homóloga, usando transcromossomos ou usando minigenes. Empresas, como 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) e Ablexis (http://_www_ablexis_com) podem ser encarregadas de fornecer anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando tecnologias como descritas acima.

[0313] Os anticorpos podem ser selecionados de uma biblioteca de exposição de fago, em que o fago é manipulado para expressar imunoglobulinas humanas ou porções das mesmas, como Fabs, anticorpos de cadeia única (scFv) ou regiões variáveis de anticorpo não pareadas ou pareadas. Os anticorpos da invenção podem ser isolados, por exemplo, da biblioteca de apresentação em fago expressando as regiões variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo, como pro-

teínas de fusão, com a proteína de revestimento do bacteriófago pIX, conforme descrito em Shi *et al.*, (2010) *J Mol Biol* 397:385-96, e na publicação de patente internacional nº WO09/085462). As bibliotecas podem ser triadas para a ligação de fago a PD-1 humana e/ou de cino e os clones positivos obtidos podem ser adicionalmente caracterizados, os Fabs são isolados dos lisados do clone, e expressos como IgGs de comprimento total.

[0314] A preparação de antígenos imunogênicos e a produção de anticorpos monoclonais podem ser realizadas com o uso de qualquer técnica adequada, como produção de proteína recombinante. Os antígenos imunogênicos podem ser administrados a um animal na forma de proteína purificada, ou misturas de proteína incluindo células totais ou extratos de células ou tecidos, ou o antígeno pode ser formado *de novo* no corpo do animal a partir de ácidos nucleicos que codificam o dito antígeno ou uma porção do mesmo.

[0315] Em algumas modalidades, o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo da invenção é um anticorpo biespecífico.

[0316] Em algumas modalidades, o anticorpo ou o fragmento de ligação a antígeno do mesmo da invenção é um anticorpo multiespecífico.

[0317] Os anticorpos monoespecíficos que se ligam especificamente a PD-1 da invenção aqui fornecidos podem ser manipulados em anticorpos biespecíficos que são também abrangidos no escopo da invenção.

[0318] Os anticorpos biespecíficos de comprimento total podem ser gerados, por exemplo, com o uso de troca de braço Fab (ou troca de meia-molécula, trocando um par cadeia pesada - cadeia leve) entre dois anticorpos bivalentes monoespecíficos pela introdução de substituições na interface CH3 da cadeia pesada em cada meia-molécula

para favorecer a formação de heterodímero de duas meias-moléculas do anticorpo tendo especificidade diferente *in vitro* no ambiente isento de células ou com o uso de coexpressão. A reação de troca do braço Fab é o resultado de uma reação de isomerização de ponte dissulfeto e dissociação-associação de domínios CH3. As pontes dissulfetos de cadeia pesada nas regiões de dobradiça dos anticorpos monoespecíficos parentais são reduzidas. As cisteínas livres resultantes de um dos anticorpos monoespecíficos parentais formam uma ponte de dissulfeto intercadeias-pesadas com resíduos de cisteína de uma segunda molécula de anticorpo monoespecífico parental, e, simultaneamente, domínios CH3 dos anticorpos parentais liberam e reformam por dissociação-associação. Os domínios CH3 dos braços Fab podem ser manipulados para favorecer a heterodimerização em relação à homodimerização. O produto resultante é um anticorpo biespecífico tendo dois braços Fab ou meias-moléculas que, se ligam, cada um(a), a um epítopo diferente.

[0319] Anticorpos biespecíficos podem também ser gerados com o uso de designs como o "Triomab/Quadroma" (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-in-Hole ("botão no orifício", Genentech), "CrossMAbs" (Roche) e a interação de CH3 eletrostaticamente induzida ("electrostatically-induced CH3 interaction" (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), o "LUZ-Y" (Genentech), o "Strand Exchange Engineered Domain body" (SEEDbody) (EMD Serono), o "Biclonic" (Merus) e os produtos "DuoBody®" (Genmab A/S).

[0320] A tecnologia quadroma Triomab pode ser usada para gerar anticorpos biespecíficos de comprimento total. A tecnologia Triomab promove a troca de braço Fab entre dois anticorpos quiméricos parentais, um mAb parental tendo IgG2a e o segundo mAb parental tendo regiões constantes de IgG2b de rato, produzindo anticorpos biespecíficos quiméricos.

[0321] A estratégia "knob-in-hole" ("protuberância -em-cavidade") pode ser usada para gerar anticorpos biespecíficos de comprimento total. Resumidamente, os aminoácidos selecionados que formam a interface dos domínios CH3 na IgG humana podem ser mutados em posições que afetam as interações do domínio CH3 para promover a formação de heterodímero. Um aminoácido com uma cadeia lateral (orifício) é introduzido em uma cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um primeiro antígeno e um aminoácido com uma cadeia lateral grande (botão) é introduzido em uma cadeia pesada de um anticorpo que se liga especificamente a um segundo antígeno. Após a coexpressão dos dois anticorpos, um heterodímero é formado como resultado da interação preferencial da cadeia pesada com uma "hole" (cavidade) com a cadeia pesada com uma "knob" (protuberância). Pares de substituição de CH3 exemplificadores que formam uma "knob" (protuberância) e uma "hole" (cavidade) são (expressos como posição modificada no primeiro domínio CH3 da primeira cadeia pesada/posição modificada no segundo domínio CH3 da segunda cadeia pesada): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S e T366W/T366S_L368A_Y407V.

[0322] A tecnologia CrossMAb pode ser usada para gerar anticorpos biespecíficos de comprimento. CrossMAbs, em adição ao uso da estratégia de "knob-in-hole" para favorecer a troca de braço Fab, têm em um dos meios-braços o domínio CH1 e o domínio CL trocados para assegurar o correto emparelhamento das cadeias leves do anticorpo biespecífico resultante (consulte por exemplo a patente US nº 8.242.247).

[0323] Outras estratégias de entrecruzamento ("cross-over") podem ser usadas para gerar anticorpos biespecíficos de comprimento total pela troca de domínios variáveis ou constantes, ou de ambos os

domínios, entre a cadeia pesada e a cadeia leve ou dentro da cadeia pesada dos anticorpos biespecíficos, em um braço ou em ambos os braços. Estas trocas incluem por exemplo VH-CH1 com VL-CL, VH com VL, CH3 com CL e CH3 com CH1 conforme descrito nas publicações de patente internacional n° WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 e WO2009/080252.

[0324] Podem ser utilizadas outras estratégias, como favorecimento da heterodimerização da cadeia pesada com o uso de interações eletrostáticas pela substituição de resíduos positivamente carregados em uma superfície CH3 e de resíduos negativamente carregados em uma segunda superfície CH3, conforme descrito na publicação de patente US n° US2010/0015133; publicação de patente US n° US2009/0182127; publicação de patente US n° US2010/028637, ou publicação de patente US n° US2011/0123532. Em outras estratégias, a heterodimerização pode ser favorecida pelas seguintes substituições (expressas como posição modificada no primeiro domínio CH3 da primeira posição da cadeia pesada/posição modificada no segundo domínio CH3 da segunda cadeia pesada): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F, ou T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W conforme descrito na publicação de patente US n° US2012/0149876 ou publicação de patente US n° US2013/0195849.

[0325] A tecnologia LUZ-Y pode ser utilizada para gerar anticorpos biespecíficos. Nesta tecnologia, um zíper de leucina é adicionado ao terminal C dos domínios CH3 para direcionar a montagem do heterodímero a partir dos mAbs parentais, que é removido após a purificação.

[0326] A tecnologia SEEDbody pode ser utilizada para gerar anti-

corpos biespecíficos. SEEDbodies têm, em seus domínios constantes, resíduos de IgG selecionados substituídos por resíduos de IgA para favorecer a heterodimerização conforme descrito no pedido de patente US nº 20070287170.

[0327] Os anticorpos biespecíficos podem ser gerados *in vitro* em um ambiente livre de células através da introdução de mutações assimétricas nas regiões de CH3 de dois anticorpos homodiméricos monoespecíficos e da formação do anticorpo heterodimérico biespecífico de dois anticorpos homodiméricos monoespecíficos parentais em condições redutoras para permitir a isomerização da ligação de dissulfeto de acordo com os métodos descritos na publicação de patente internacional nº WO2011/131746. Nos métodos, o primeiro anticorpo bivalente monoespecífico e o segundo anticorpo bivalente monoespecífico são manipulados para terem determinadas substituições no domínio de CH3 que favorece a estabilidade de heterodímero; os anticorpos são incubados juntos sob condições redutoras suficientes para permitir que as cisteínas na região da dobradiça sofram isomerização da ligação de dissulfeto; gerando, assim, o anticorpo biespecífico pela troca do braço do Fab. As substituições que podem ser usadas são F405L em uma cadeia pesada e K409R na outra cadeia pesada em anticorpos IgG1. Em anticorpos IgG4, uma cadeia pesada pode ser uma IgG4 de tipo selvagem tendo F na posição 405 e R na posição 409 e a outra cadeia pesada pode ter substituições F405L e R409K. As condições de incubação podem ser idealmente restauradas para não redutoras. Agentes redutores exemplificadores que podem ser usados são 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatona, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína e beta-mercaptoetanol. Por exemplo, a incubação durante pelo menos 90 min, a uma temperatura de pelo menos 20°C na presença de 25 mM de 2-MEA ou na presença de pelo menos 0,5 mM de ditioneitol a um

pH 5-8, por exemplo pH 7,0 ou pH 7,4, pode ser usada.

[0328] Em algumas modalidades, os anticorpos biespecíficos incluem moléculas de direcionamento dual do tipo IgG recombinantes, nas quais cada um dos dois lados da molécula, contém o fragmento Fab ou parte do fragmento Fab de ao menos dois anticorpos diferentes; moléculas de fusão com IgG, sendo que os anticorpos IgG de comprimento total são integrados a um fragmento Fab extra ou partes do fragmento Fab; moléculas de fusão Fc, em que as moléculas Fv de cadeia única ou diacorpos estabilizados são fusionados a domínios constantes de cadeia pesada, regiões Fc ou partes das mesmas; moléculas de fusão Fab, sendo que diferentes fragmentos Fab são fusionados juntos; anticorpos com base em ScFv e diacorpos e de cadeia pesada (por exemplo, anticorpos de domínio, nanocorpos) em que diferentes moléculas Fv de cadeia única ou diferentes diacorpos ou diferentes anticorpos de cadeia pesada (por exemplo, anticorpos de domínio, nanocorpos) são fusionados entre si ou a uma outra proteína ou molécula carreadora.

[0329] As substituições são tipicamente feitas ao nível de DNA em uma molécula como o domínio constante do anticorpo com o uso de métodos-padrão.

[0330] Os anticorpos da invenção podem ser manipulados em várias formas de anticorpo bem conhecidas.

[0331] Por exemplo, um anticorpo biespecífico para PD-1/CD3 pode ser gerado com o uso dos domínios VH/VL dos anticorpos PD-1 aqui descritos e de quaisquer regiões VH/VL de anticorpos anti-CD3 publicados.

[0332] Uma outra modalidade da invenção é um anticorpo biespecífico que compreende um primeiro domínio que se liga a PD-1 e um segundo domínio que se liga ao CD3.

Métodos de Caracterização de Anticorpos

Anticorpos Agonísticos

[0333] Uma atividade biológica típica induzida pelos anticorpos agonísticos aqui fornecidos é a inibição (por exemplo, supressão) de células T CD4⁺ ou CD8⁺ específicas para o antígeno. Várias leituras podem ser usadas para avaliar o agonismo dos anticorpos aqui fornecidos, como proliferação reduzida ou produção reduzida de interferon- γ (IFN - γ), IL-17 IL-2, IL-6, IL-22, IL-23 ou GM-CSF por células TCD4⁺ ou CD8⁺ específicas para o antígeno. Em um ensaio exemplificador, o efeito dos anticorpos sobre as células T de doador normal que são estimuladas por células dendríticas alogênicas ou antígenos específicos, como o toxoide tetânico ou CMV são usados. Nesta configuração, as alterações na função das células T com tratamento com anticorpos podem ser detectadas mediante a medição dos níveis de citocina ou marcadores de ativação de células T no sobrenadante. Em um ensaio exemplificador, as PBMCs determinadas como reativas a antígenos CMV são usadas como fonte de células T CD4⁺ ou CD8⁺ específicas para o antígeno. 1,5 x 10⁶ células/mL ou 2 x 10⁶ células/mL de PBMCs reativas a CMV são plaqueadas sobre placas de cultura e 0,1 a 0,2 μ g/mL de peptídeos de CMV adicionados às culturas. Os peptídeos de CMV podem ser adquiridos, por exemplo, junto à JPT Tecnologias. Os anticorpos de teste são adicionados em dose única de 10 μ g/mL, as placas incubadas durante 6 dias, e a proliferação celular avaliada pela adição de 1 μ Ci/poço de metil-3H-timidina (PerkinElmer) durante 6 horas e a radioatividade medida em cada amostra. Alternativamente, a produção de citocina pelas células é medida com o uso de ELISA ou ensaios multiplex conhecidos.

Anticorpos que bloqueiam a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 a PD-1

[0334] Os anticorpos da invenção aqui fornecidos (como anticorpos agonísticos que se ligam especificamente a PD-1) podem ser bloqueios ou não bloqueios de ligante. A capacidade dos anticorpos ago-

nísticos aqui fornecidos pode ser avaliada por sua capacidade de bloquear o ligante, por exemplo, PD-L1 ou PD-L2 ou ambos com o uso de ensaios de competição como o ensaio de agrupamento celular.

[0335] Em um ensaio exemplificador, as células HEK diferencialmente identificadas que superexpressam PD-1 ou PD-L1 (ou PD-L2) são misturadas em uma razão de 1:1, e a capacidade dos anticorpos de inibir o agrupamento de células que expressam PD-1 e PD-L1 ou PD-1 e PD-L2 é quantificada. As células que superexpressam PD-1 humana podem ser marcadas com corante Cll Trace Violet e as células que superexpressam PD-L1 ou PD-L2 podem ser marcadas com o corante Far Red Cell Trace (Life Technologies). As células que expressam PD-1 são misturadas com o anticorpo de teste e após uma breve incubação, as células que expressam PD-L1 são adicionadas à mistura. A mistura é incubada durante uma hora, e a porcentagem de eventos duplo-positivos (por exemplo, agrupamentos de células positivas com corante Violet Cell Trace e corante Far Red Cell Trace) é avaliada com o uso de citometria de fluxo. O nível do agrupamento é medido pela porcentagem de eventos duplo-positivos, e a porcentagem de agrupamento na presença dos anticorpos de teste é comparada à dos anticorpos de isótipo de controle positivo e negativo. O anticorpo aqui fornecido bloqueia a ligação de PD-L1 (ou PD-L2) a PD-1 quando o anticorpo inibe eventos duplo-positivos de células que expressam PD-1 e PD-L1 (ou PD-L2) de uma maneira estatisticamente significativa quando comparado ao controle de isótipo com o uso de um valor p de $\leq 0,01$ como uma medida de significância. O anticorpo aqui fornecido não bloqueia a ligação de PD-L1 (ou PD-L2) a PD-1 quando o anticorpo inibe eventos duplo-positivos de PD-1 e PD-L1 (ou PD-L2) de uma maneira estatisticamente insignificante, por exemplo, $p > 0,01$.

Medições de Afinidade do Anticorpo

[0336] A afinidade de um anticorpo a PD-1 humana ou não huma-

na, como PD-1 de cinomolgo, pode ser determinada experimentalmente com o uso de qualquer método adequado. Tais métodos podem usar a instrumentação ProteOn XPR36, Biacore 3000 ou KinExA, ELISA ou testes de ligação competitiva conhecidos pelos versados na técnica. A afinidade medida de uma interação entre um anticorpo específico/ PD-1 pode variar se medida sob diferentes condições (por exemplo, osmolaridade, pH). Dessa forma, as medições de afinidade e outros parâmetros de ligação (por exemplo, K_D , K_{lig} , K_{desl}) são, tipicamente, realizadas sob condições padronizadas e um tampão padronizado, como o tampão aqui descrito no Exemplo 1. O versado na técnica vai entender que o erro interno das medições de afinidade, por exemplo, usando Biacore 3000 ou ProteOn (medido como desvio padrão, DP) pode tipicamente estar dentro de 5 a 33% para as medições dentro dos limites de detecção típicos. Portanto, o termo "cerca de" no contexto de K_D reflete o desvio padrão típico no ensaio. Por exemplo, o DP típico para uma K_D de 1×10^{-9} M é de até $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ M.

Anticorpos que competem pela ligação a PD-1 com um anticorpo de referência

[0337] A concorrência entre ligação a PD-1 com anticorpos da invenção (por exemplo, anticorpos de referência) que compreende certas sequências VH e VL pode ser testada *in vitro* sobre uma plataforma Octet Red384 (Forte Bio). O antígeno PD1 marcado com histidina é carregado em seus sensores e os sensores são expostos a 20 µg/mL de anticorpo anti-PD1 de referência, seguido de exposição a uma concentração igual de um anticorpo anti-PD1 de teste. A ligação adicional pelo anticorpo de teste após saturação com o anticorpo de referência indica ligação simultânea dos dois anticorpos a PD-1, indicando que a referência e o anticorpo de teste não competem pela ligação a PD-1. Alternativamente, nenhuma ligação adicional do anticorpo de teste indica que os dois anticorpos competem pela ligação a PD-1.

[0338] Os anticorpos que competem pela ligação com PD-1 com um anticorpo de referência podem ser gerados pelo isolamento dos anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 com o uso de bibliotecas de apresentação em fago, e triagem dos anticorpos gerados por sua capacidade de competir pela ligação a PD-1 com os anticorpos de referência anteriormente mencionados.

[0339] O anticorpo de teste compete com a ligação a PD-1 com o anticorpo de referência quando o anticorpo de teste se liga a PD-1 na concentração de saturação do anticorpo de referência. A ligação pode ser detectada com o uso de interferometria de biocamada (como Octet) pelo registro de um deslocamento do comprimento de onda devido ao anticorpo ligado aumentar a densidade óptica da ponta do biossensor ao longo do tempo.

Epítopo do Anticorpo

[0340] O epítopo de PD-1 ao qual o anticorpo da invenção se liga pode ser resolvido, por exemplo, com o uso de troca de hidrogênio/deutério (troca H/D) ou pela análise de uma estrutura cristalina do anticorpo em complexo com PD-1. Dois anticorpos PD-1 "se ligam ao mesmo epítopo no PD-1" quando cerca de 70% ou mais resíduos de aminoácido de PD-1 protegidos pelo anticorpo em ao menos 5% de diferença em níveis de deuteração através de troca H/D são idênticos entre os dois anticorpos, ou quando 70% ou mais dos resíduos de aminoácido expostos na superfície de PD-1 determinados para ligar o anticorpo em uma estrutura cristalina de um complexo do anticorpo e PD-1 são idênticos entre os dois anticorpos. Na estrutura cristalina de um complexo do anticorpo e PD-1, os resíduos de epítopo são aqueles resíduos de PD-1 que residem dentro da distância de 4 Å ou menos a partir de qualquer um dentre os resíduos de CDR de anticorpo.

[0341] Em um ensaio de troca H/D, a proteína PD-1 é incubada na presença ou ausência do anticorpo em água deuterada durante tem-

pos predeterminados resultando na incorporação de deutério em átomos de hidrogênio permutáveis que não estão protegidos pelo anticorpo, seguido pela digestão por protease da proteína e análises dos fragmentos peptídicos com o uso de LC-MS. Em um ensaio exemplificador, 5 µL do anticorpo de teste (10 µg) ou 5 µL do complexo de PD-1 e o anticorpo de teste (10 µg e 7,35 µg, respectivamente) são incubados com 120 µL de tampão para marcação com óxido de deutério (fosfato 50 mM, cloreto de sódio 100 mM em pH 7,4) durante 0 s, 60 s, 300 s, 1.800 s, 7.200 s, e 14.400 s. A troca de deutério é interrompida pela adição de 63 µL de cloridrato de guanidina 5 M e o pH final é 2,5. A amostra interrompida é submetida à digestão em coluna de pepsina/protease tipo XIII e à análise por LC-MS. Para digestão por pepsina/protease tipo XIII, 5 µg das amostras em 125 µL de tampão de controle (fosfato 50 mM, cloreto de sódio 100 mM em pH 7,4) são desnaturados pela adição de 63 µL de cloridrato de guanidina 5 M (pH final é 2,5) e pela incubação da mistura durante 3 min. Então, a mistura é submetida a uma digestão em coluna de pepsina/protease tipo XIII e os peptídeos resultantes são analisados com o uso de um sistema UPLC-MS compreendido de um Waters Acquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massa Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo). Os dados de MS brutos são processados com o uso de HDX WorkBench, software para a análise de dados de MS de troca H/D. Os níveis de deutério são calculados com o uso da diferença média de massa entre o peptídeo deuterado e sua forma nativa (t_0). A identificação de peptídeo é feita através de busca de dados de MS/MS, com Mascot, em comparação com a sequência de PD-1. A tolerância de massa para os íons de produto e precursor é 0,05 Da e 20 ppm, respectivamente.

[0342] Para cristalografia de raios X, PD-1 e o anticorpo de teste são expressos e purificados com o uso de protocolos-padrão. O com-

plexo de PD-1/anticorpo de teste é incubado de um dia para o outro a 4°C, concentrado, e separado das espécies não complexadas com o uso de cromatografia de exclusão por tamanho. O complexo é cristalizado pelo método de difusão de vapor a partir de várias soluções de teste conhecidas por exemplo soluções contendo PEG3350, citrato de amônio e ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES).

[0343] Os anticorpos que ligam o mesmo epítipo em PD-1 como um anticorpo de referência podem ser gerados pelo isolamento de anticorpos que ligam PD-1 com o uso de bibliotecas de apresentação em fago, seleção dos anticorpos que competem com o anticorpo de referência para a ligação a PD-1 em 100%, e identificação do epítipo do anticorpo por meio de troca H/D ou por cristalografia de raios X.

[0344] Alternativamente, camundongos ou coelhos podem ser imunizados com o uso de peptídeos que abrangem os resíduos de epítipo, e os anticorpos gerados podem ser avaliados por sua ligação dentro da região mencionada.

Polinucleotídeos, Vetores, Células Hospedeiras

[0345] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica qualquer dos anticorpos da invenção.

[0346] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica qualquer das regiões variáveis de cadeia pesada de anticorpo, qualquer das regiões variáveis de cadeia leve de anticorpo, qualquer das cadeias pesadas de anticorpo e/ou as cadeias leves de anticorpo da invenção.

[0347] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VH das SEQ ID N^{os}: 8, 9, 10, 140, 141 ou 142.

[0348] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VL das SEQ ID N^{os}: 14, 15, 16, 143 ou 144.

[0349] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VH das SEQ ID N^{os}: 9, 10, 140, 141 ou 142 e a VL das SEQ

ID N^{os}: 14, 15, 16, 143 ou 144.

[0350] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a cadeia pesada (HC) das SEQ ID N^{os}: 20, 21, 22, 150, 151 ou 152.

[0351] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 26, 27, 28, 153 ou 154.

[0352] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a HC das SEQ ID N^{os}: 20, 21, 22, 150, 151 ou 152 e a LC das SEQ ID N^{os}: 26, 27, 28, 153 ou 154.

[0353] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que compreende a sequência de polinucleotídeo das SEQ ID N^{os}: 11, 12, 13, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 132, 133, 134, 135, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 ou 164.

[0354] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VH das SEQ ID N^{os}: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51.

[0355] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62.

[0356] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VH das SEQ ID N^{os}: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51 e a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62.

[0357] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a cadeia pesada das SEQ ID N^{os}: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73.

[0358] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a cadeia leve das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84.

[0359] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a HC das SEQ ID N^{os}: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73 e a LC das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84.

[0360] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que compreende a sequência de polinucleotídeo das SEQ ID N^{os}: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 85, 86,

87, 136, 137, 138 ou 139.

[0361] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VH das SEQ ID N^{os}: 94 ou 95.

[0362] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VL das SEQ ID N^{os}: 98, 99 ou 100.

[0363] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a VH das SEQ ID N^{os}: 94 ou 95 e a VL das SEQ ID N^{os}: 98, 99 ou 100.

[0364] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a HC das SEQ ID N^{os}: 104 ou 105.

[0365] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a LC das SEQ ID N^{os}: 108, 109 ou 110.

[0366] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que codifica a HC das SEQ ID N^{os}: 104 ou 105 e a LC das SEQ ID N^{os}: 108, 109 ou 110.

[0367] A invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que compreende a sequência de polinucleotídeo das SEQ ID N^{os}: 96, 97, 101, 102, 103, 106, 107, 111, 112 ou 113.

[0368] As sequências de polinucleotídeos que codificam a VH ou a VL ou fragmentos de ligação ao antígeno das mesmas dos anticorpos da invenção, ou a cadeia pesada e/ou a cadeia leve dos anticorpos da invenção, podem ser funcionalmente ligadas a um ou mais elementos reguladores, como um promotor ou um intensificador, que permitem a expressão da sequência de nucleotídeos na célula hospedeira desejada. O polinucleotídeo pode ser um cDNA.

[0369] A invenção também fornece um vetor que compreende o polinucleotídeo da invenção. Tais vetores podem ser vetores plasmidiais, vetores virais, vetores para expressão de baculovírus, vetores de transposon ou quaisquer outros vetores adequados para a introdução do polinucleotídeo da invenção em um dado organismo ou anteceden-

te genético por quaisquer meios. Por exemplo, os polinucleotídeos que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve dos anticorpos da invenção, opcionalmente ligados a regiões constantes, são inseridos em vetores de expressão. As cadeias pesadas e/ou leves podem ser clonadas nos mesmos vetores de expressão ou em diferentes. Os segmentos de DNA que codificam a VH, a VL, a HC e/ou a LC ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser operacionalmente ligados a sequências de controle nos vetores de expressão que asseguram a expressão de polipeptídeos. Essas sequências de controle incluem sequências de sinalização, promotores (por exemplo, promotores associados naturalmente ou heterólogos), elementos de acentuador e sequência de terminação da transcrição e são escolhidas por serem compatíveis com a células hospedeira escolhida para expressar o anticorpo. Depois que o vetor for incorporado no hospedeiro adequado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão de alto nível das proteínas codificadas pelos polinucleotídeos incorporados.

[0370] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 11 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 17.

[0371] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 12 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 18.

[0372] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 12 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 19.

[0373] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 13 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 19.

[0374] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 52 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 63.

[0375] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 53 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0376] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucle-

otídeo da SEQ ID N°: 53 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 65.

[0377] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 54 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0378] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 55 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0379] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 56 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0380] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 57 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0381] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 58 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0382] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 59 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 64.

[0383] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 96 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 101.

[0384] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 97 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 102.

[0385] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 97 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 103.

[0386] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 132 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 133.

[0387] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 134 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 135.

[0388] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 136 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 137.

[0389] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 138 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 139.

[0390] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 155 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 19.

[0391] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucle-

otídeo da SEQ ID N°: 156 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 19.

[0392] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 157 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 19.

[0393] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 13 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 158.

[0394] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 13 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 159.

[0395] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 155 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 158.

[0396] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 156 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 158.

[0397] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 157 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 158.

[0398] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 155 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 159.

[0399] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 156 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 159.

[0400] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 157 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 159.

[0401] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 160 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 31.

[0402] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 161 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 31.

[0403] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 162 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 31.

[0404] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 25 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 163.

[0405] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 25 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 164.

[0406] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucle-

otídeo da SEQ ID N°: 160 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 163.

[0407] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 161 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 163.

[0408] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 162 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 163.

[0409] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 160 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 164.

[0410] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 161 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 164.

[0411] Em algumas modalidades, o vetor compreende o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 162 e/ou o polinucleotídeo da SEQ ID N°: 164.

[0412] Os vetores de expressão adequados são tipicamente replicáveis nos organismos hospedeiros ou como epissomas ou como uma parte integrada do DNA cromossômico hospedeiro. Comumente, os vetores de expressão contêm marcadores de seleção, como resistência à ampicilina, resistência à higromicina, resistência à tetraciclina, resistência à canamicina ou resistência à neomicina para permitir a detecção dessas células transformadas com as sequências de DNA desejadas. O sistema de glutamina sintetase pode ser usado para expressar proteínas recombinantes como anticorpos em células.

[0413] Elementos do promotor e acentuador adequados são conhecidos na técnica. Para expressão em uma célula eucariote, promotores exemplificadores incluem elementos do promotor e acentuador do gene da imunoglobulina de cadeia leve e/ou pesada; promotor inicial imediato de citomegalovírus; promotor da timidina quinase do vírus da herpes simples; promotores SV40 iniciais e tardios; promotor presente em longas repetições terminais de um retrovírus; promotor da metalotioneína-I do camundongo e vários promotores específicos para tecido conhecidos na técnica. A seleção do vetor e promotor adequados está dentro do nível do versado na técnica.

[0414] Grandes números de vetores e promotores adequados são conhecidos dos versados na técnica; muitos estão comercialmente disponíveis para gerar construtos recombinantes. Os vetores a seguir são fornecidos a título de exemplo. Bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Califórnia, EUA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 e pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Eucarióticos: pWL-neo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL (Pharmacia), e pEE6.1 e pEE14.1 (Lonza).

[0415] A invenção também fornece uma célula hospedeira que compreende um ou mais vetores da invenção. O termo "célula hospedeira" se refere a uma célula na qual um vetor foi introduzido. Entende-se que o termo célula hospedeira se refere não apenas à célula do específica em questão, mas à progênie desta célula, e também a uma linhagem celular estável gerada da célula do específica em questão. Uma vez que certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido a mutações ou influências ambientais, tal progênie pode não ser idêntica à célula progenitora, mas ainda assim ser incluída no escopo do termo "células hospedeira" para uso na presente invenção. Tais células hospedeiras podem ser células eucarióticas, células bacterianas, células vegetais ou células de arquea.

[0416] *Escherichia coli*, bacilos, como *Bacillus subtilis*, e outras Enterobacteriaceae, como Salmonella, Serratia, e várias espécies de Pseudomonas, são exemplos de células hospedeiras procarióticas. Outros micróbios, como leveduras, também são úteis para a expressão. *Saccharomyces* (por exemplo, *S. cerevisiae*) e *Pichia* são exemplos de células hospedeiras de levedura adequadas. As células eucarióticas exemplificadoras podem ser de origem de mamífero, de inseto, de aves ou de outra origem animal. As células eucarióticas de mamífero incluem linhagens celulares imortalizadas, como linhagens celulares

de hibridoma ou mieloma, como linhagens celulares de murino SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EUA CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Reino Unido, ECACC nº 85110503), FO (ATCC CRL-1646) e Ag653 (ATCC CRL-1580). Uma linhagem celular de mieloma humana exemplificadora é U266 (ATTC CRL-TIB-196). Outras linhagens celulares úteis incluem aquelas derivadas de células de ovário de hamster chinesa (CHO) como CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD, EUA), CHO-K1 (ATCC CRL-61) ou DG44.

[0417] A invenção também fornece um método de produção do anticorpo da invenção, que compreende o cultivo da célula hospedeira da invenção em condições nas quais o anticorpo é expresso, e a recuperação do anticorpo produzido pela célula hospedeira. Os métodos de produção de anticorpos e de purificação dos mesmos são conhecidos. Depois de sintetizados (ou quimicamente ou por recombinação), os anticorpos inteiros, seus dímeros, cadeias individuais leves e/ou pesadas, ou outros fragmentos de anticorpo, como VH e/ou VL, podem ser purificados de acordo com procedimentos convencionais, incluindo precipitação por sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese em gel e similares (consulte, em geral, Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). Um anticorpo em questão pode ser substancialmente puro, por exemplo, com ao menos cerca de 80% a 85% de pureza, com ao menos cerca de 85% a 90% de pureza, com ao menos cerca de 90% a 95% de pureza, ou com ao menos cerca de 98% a 99%, ou mais, de pureza, por exemplo, isento de contaminantes, como resíduos celulares, macromoléculas, etc. que não sejam o anticorpo em questão.

[0418] A invenção também fornece um método para a produção de um anticorpo de que se liga especificamente a PD-1, que compreende:

incorporar do primeiro polinucleotídeo que codifica a VH do anticorpo e o segundo polinucleotídeo que codifica a VL do anticorpo em um vetor de expressão;

transformar uma célula hospedeira com o vetor de expressão;

cultivar a célula hospedeira em um meio de cultura sob condições em que a VL e VH do anticorpo são expressas e formam o anticorpo; e

recuperar o anticorpo a partir da célula hospedeira ou meio de cultura.

[0419] Os polinucleotídeos que codificam certas sequências de VH ou VL da invenção podem ser incorporados nos vetores com o uso de métodos-padrão de biologia molecular. A transformação na célula hospedeira, cultura, expressão e purificação do anticorpo são feitos usando métodos bem conhecidos.

Composições farmacêuticas/administração

[0420] A invenção também fornece composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos ou o fragmento de ligação a antígeno dos mesmos da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável. Para uso terapêutico, os anticorpos da invenção podem ser preparados na forma de composições farmacêuticas contendo uma quantidade eficaz dos anticorpos como um ingrediente ativo em um veículo farmaceuticamente aceitável. O termo "veículo" se refere a um diluente, adjuvante, excipiente ou carreador com o qual o anticorpo da invenção é administrado. Tais veículos podem ser líquidos, como água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares. Por exemplo, solução salina a 0,4% e glicina a 0,3% podem ser usadas. Estas soluções são estéreis e, em geral, isentas de matéria particulada. As mesmas podem ser esterilizadas

através de técnicas de esterilização convencionais bem conhecidas (por exemplo, filtração). As composições podem conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis conforme exigido para aproximá-las das condições fisiológicas, como agentes de tamponamento e de ajuste de pH, estabilizantes, espessantes, lubrificantes e agentes corantes, etc. A concentração dos anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção em tal formulação farmacêutica pode variar de menos de cerca de 0,5%, usualmente a ao menos cerca de 1%, até 15 ou 20%, em peso, e pode ser selecionada primariamente com base na dose necessária, volumes do fluido, viscosidades, etc., de acordo com o modo específico de administração selecionado. Veículos adequados e formulações adequadas, inclusive de outras proteínas humanas, por exemplo, albumina sérica humana, são descritos, por exemplo, em "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 21ª Edição, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, EUA, Parte 5, "Pharmaceutical Manufacturing" páginas 691 a 1092, consulte especialmente as páginas 958 a 989.

[0421] O modo de administração para uso terapêutico dos anticorpos ou dos fragmentos de ligação a antígeno do mesmo da invenção pode ser qualquer rota adequada que forneça o anticorpo a um indivíduo, como administração parenteral, por exemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, pulmonar, transmucosal (oral, intranasal, intravaginal, retal), com o uso de uma formulação em um comprimido, cápsula, solução, pó, gel, partícula; e contida dentro de uma seringa, um dispositivo implantado, uma bomba osmótica, um cartucho, uma microbomba; ou outro meio reconhecido pela pessoa versada na técnica, como é bem conhecido na técnica. A administração sítio-específica pode ser realizada, por exemplo, por aplicação intratumoral, intra-articular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitária, intracelular, intracerebe-

lar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intracardíaca, intraosteal, intrapélvica, intrapericardíaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarretal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrassinovial, intratorácica, intrauterina, intravascular, intravesical, intralesional, vaginal, retal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica.

[0422] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção podem também ser administrados profilaticamente para reduzir o risco de desenvolver uma doença autoimune e/ou atrasar o início dos sintomas.

[0423] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção podem ser liofilizados para armazenamento e reconstituídos em um veículo adequado antes do uso. Esta técnica mostrou-se eficaz com preparações de proteínas convencionais e as técnicas de reconstituição e de liofilização bem conhecidas na técnica podem ser utilizadas.

Métodos e usos

[0424] Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção têm utilidades diagnósticas *in vitro* e *in vivo*, e também utilidades terapêuticas e profiláticas. Por exemplo, os anticorpos ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos da invenção podem ser administrados às células em cultura, *in vitro* ou *ex vivo*, ou a um indivíduo para tratar, evitar e/ou diagnosticar uma variedade de doenças, como distúrbio imunológico ou quaisquer condições nas quais atenuação da atividade de células T que expressam PD-1 e/ou modulação negativa da resposta imune são desejadas.

[0425] A invenção também fornece um método de supressão da ativação de uma célula T que expressa PD-1 em um indivíduo, que compreende administrar a um indivíduo o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção por um tempo

suficiente para suprimir a ativação da célula T que expressa PD-L1.

[0426] Em algumas modalidades, a célula de T que expressa PD-1 é uma célula T CD4⁺ específica para o antígeno.

[0427] Em algumas modalidades, a célula de T que expressa PD-1 é uma célula T CD8⁺ específica para o antígeno.

[0428] "Suprimir a ativação" se refere à capacidade dos anticorpos aqui fornecidos de inibir a ativação de células T que expressam PD-1, por exemplo inibir a proliferação ou a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ específicas para o antígeno. O anticorpo suprime a ativação de células T que expressam PD-1 quando o anticorpo inibe a proliferação ou a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ específicas para o antígeno em 20%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% maior que na ausência do anticorpo (por exemplo, controle negativo), ou quando a inibição é estatisticamente significativa quando comparada à inibição na ausência do anticorpo.

[0429] A célula T que expressa PD-1 pode estar situada próximo a uma resposta inflamatória inadequada. Os anticorpos ou os fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos da invenção pode suprimir a ativação a célula T que expressa PD-1 por aumento de sinalização a jusante de PD-1 resultando na inibição da sinalização de TCR e na inibição da ativação, proliferação e/ou sobrevivência das células T. Os anticorpos da invenção podem, alternativamente, mediar a morte das células de T positivas para PD-1 por funções efetoras mediadas por anticorpo ADCC, ADCP e/ou CDC.

[0430] É também fornecido um método de modulação negativa de uma resposta imunológica que compreende administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção para modular negativamente a resposta imune.

[0431] É também fornecido um método de tratamento de um distúrbio imunológico que compreende administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anti-corpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção para tratar o distúrbio imunológico.

[0432] O distúrbio imune pode ser crônico ou agudo, como doença inflamatória crônica ou doença inflamatória aguda.

[0433] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é lúpus, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, artrite, artrite reumatoide, asma, DPOC, doença inflamatória pélvica, doença de Alzheimer, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença de Peyronie, doença celíaca, doença da vesícula biliar, doença pilonidal, peritonite, psoríase, artrite psoriática, vasculite, adesões cirúrgicas, acidente vascular cerebral, diabetes tipo I, doença de Lyme, meningoencefalite, uveíte autoimune, esclerose múltipla, lúpus (como, lúpus eritematoso sistêmico), síndrome de Guillain-Barr, dermatite atópica, hepatite autoimune, alveolite fibrosante, doença de Grave, nefropatia IgA, púrpura trombocitopênica idiopática, doença de Ménière, pênfigo, cirrose biliar primária, sarcoidose, esclerodermia, granulomatose de Wegener, outras doenças autoimunes, pancreatite, traumas (cirurgia), doença de enxerto contra hospedeiro, rejeição de transplante, doença cardíaca incluindo doenças isquêmicas como enfarte do miocárdio bem como aterosclerose, coagulação intravascular, reabsorção óssea, osteoporose, osteoartrite, periodontite e hipocloridria, infertilidade relacionada com a falta de tolerância materna ao feto, síndrome de Sjogren, vitiligo, miastenia gravis ou esclerose sistêmica.

[0434] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é artrite reumatoide.

[0435] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença de

enxerto contra hospedeiro.

[0436] Em algumas modalidades, a doença autoimune é artrite.

[0437] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é asma.

[0438] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é COPD.

[0439] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença inflamatória pélvica.

[0440] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença de Alzheimer.

[0441] Em algumas modalidades, a doença autoimune é doença inflamatória intestinal.

[0442] Em algumas modalidades, a doença inflamatória intestinal é doença de Crohn.

[0443] Em algumas modalidades, a doença inflamatória intestinal é colite ulcerativa.

[0444] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença de Peyronie.

[0445] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença celíaca.

[0446] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença de vesícula biliar.

[0447] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença Pilonidal.

[0448] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é peritonite.

[0449] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é psoríase.

[0450] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é artrite psoriática.

[0451] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é vasculite.

[0452] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é adesão cirúrgica.

[0453] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é aciden-

te vascular cerebral.

[0454] Em algumas modalidades, a doença autoimune é diabetes tipo 1.

[0455] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é doença de lyme.

[0456] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é meningoencefalite.

[0457] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é uveíte autoimune.

[0458] Em algumas modalidades, a doença autoimune é esclerose múltipla.

[0459] Em algumas modalidades, a doença autoimune é lúpus.

[0460] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é lúpus eritematoso sistêmico.

[0461] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é síndrome de Guillain-Barr.

[0462] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é dermatite atópica.

[0463] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é hepatite autoimune.

[0464] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é alveolite fibrosante.

[0465] Em algumas modalidades, a doença inflamatória intestinal é doença de Grave.

[0466] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é nefropatia por IgA.

[0467] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é púrpura trombocitopénica idiopática.

[0468] Em algumas modalidades, a doença imune é doença de Meniere.

- [0469] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é pênfigo.
- [0470] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é cirrose biliar primária.
- [0471] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é sarcoidose.
- [0472] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é escleroder-mia.
- [0473] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é granuloma-tose de Wegener.
- [0474] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é pancreatite.
- [0475] Em algumas modalidades, o distúrbio imunológico é rejei-ção de transplante.
- [0476] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é doença car-díaca incluindo doenças isquêmicas como infarto do miocárdio.
- [0477] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é aterosclero-se.
- [0478] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é coagulação intravascular.
- [0479] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é reabsorção óssea.
- [0480] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é osteoporose.
- [0481] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é osteoartrite.
- [0482] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é periodontite.
- [0483] Em algumas modalidades, a doença autoimune é hipoclori-dria.
- [0484] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é Síndrome de Sjogren.
- [0485] Em algumas modalidades, o distúrbio imune é vitiligo.
- [0486] Em algumas modalidades, a doença autoimune é miastenia gravis.
- [0487] Em algumas modalidades, a doença autoimune é esclerose

múltipla.

[0488] Também é fornecido um método de tratamento de dor associado com inflamação, que compreende administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção para tratar a dor associada com inflamação.

[0489] A invenção também fornece o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 da invenção para uso em terapia.

[0490] A invenção também fornece o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 da invenção para uso no tratamento de um distúrbio imunológico.

[0491] A invenção também fornece o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 da invenção para uso no tratamento de artrite reumatoide.

[0492] A invenção também fornece o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 da invenção para uso no tratamento de lúpus, como lúpus eritematoso sistêmico.

[0493] A invenção também fornece o anticorpo que se liga especificamente a PD-1 da invenção para uso no tratamento de doença de enxerto contra hospedeiro.

[0494] A invenção também fornece o uso do anticorpo que se liga especificamente a PD-1 da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de um distúrbio imunológico.

Terapias de Combinação

[0495] Os anticorpos aqui fornecidos podem ser administrados em combinação com um segundo agente terapêutico.

[0496] O segundo agente terapêutico pode ser qualquer terapia conhecida para um distúrbio imunológico, como doenças autoimunes ou inflamatórias, incluindo qualquer agente ou combinação de agentes que são conhecidos por serem úteis, ou que foram ou estão atualmen-

te em uso, para o tratamento dessas doenças. Tais terapias e agentes terapêuticos incluem cirurgia ou procedimentos cirúrgicos (por exemplo, esplenectomia, linfadenectomia, tireoidectomia, plasmaforese, leucophoresis, célula, tecido, ou órgão transplantados, procedimentos intestinais, órgão de perfusão, e similares), radioterapia, terapias como terapia com terapia esteroidal e terapia não esteroidal, terapia hormonal, terapia com citocina, terapia com agentes dermatológicos (por exemplo, os agentes tópicos usados para tratar condições da pele como alergias, dermatite de contato, e psoríase), terapia imunossupressora, e outra terapia anti-inflamatória de anticorpo monoclonal anti-inflamatórios.

[0497] O segundo agente terapêutico pode ser um corticosteroide, um medicamento antimalárico, um imunossupressor, um medicamento citotóxico ou um modulador de célula B.

[0498] Em algumas modalidades, o segundo agente terapêutico é prednisona, prednisolona, metilprednisolona, deflazacorte, hidroxicloroquina, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, micofenolato de mofetila (MMF), micofenolato sódico, ciclosporina, leflunomida, tacrolimus, RITUXAN® (rituximabe), ou BENLYSTA® (belimumabe).

[0499] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção são administrados em combinação com um segundo agente terapêutico. Exemplos de segundos agentes terapêuticos são corticosteroides, fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), salicilatos, hidroxicloroquina, sulfassalazina, fármacos citotóxicos, fármacos imunossuppressores, anticorpos imunomoduladores, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tacrolimus (FK506; ProGrafrM), micofenolato mofetila, azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), deoxispergualina, leflunomida e seus análogos malononitrioloamida; anticorpos anti-CTLA4 e fusões Ig, anticorpos anti-B estimuladores de linfócito (por exemplo, LYMPHOSTAT-BTM) e fusões

CTLA4-Ig (BLyS-Lg), anticorpos anti-CD80, anticorpos anti-célula T como anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, corticoesteroides como, por exemplo, clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, triancinolona, betametasona, fluocinol, fluocinonida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona; fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) como, por exemplo, sulfadiazina, medicamentos contendo mesalamina (conhecidos como agentes 5-ASA), celecoxibe, diclofenaco, etodolaco, fenpropeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, meclofamato, meloxicama, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicama, rofecoxibe, salicilatos, sulindaco e tolmetina; inibidores de fosfodiesterase-4, anticorpos anti-TNF α REMICADE[®] (infliximabe), SIMPONI[®] (golimumabe) e HUMIRA[®] (adalimumabe), talidomida ou seus análogos como lenalidomida.

[0500] Os anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação com um segundo agente terapêutico, de forma simultânea, sequencial ou separada.

[0501] A eficácia de tratamento ou RA pode ser determinada com o uso de eficácia como medido por respostas clínicas definidas pelos critérios do American College of Rheumatology, os critérios do European League of Rheumatism, ou quaisquer outros critérios. Consulte, por exemplo, Felson et al. (1995) Arthritis Rheum. 38: 727-35 e van Gestel et al. (1996) Arthritis Rheum. 39: 34-40.

[0502] Embora a invenção tenha sido descrita em termos gerais, as modalidades da invenção serão descritas adicionalmente nos exemplos a seguir, que não devem ser interpretados como limitadores do escopo das reivindicações.

Exemplo 1. Métodos

Medições de afinidade com o uso de ressonância de plásmon de superfície (SPR)

[0503] As medições de afinidade foram realizadas com o uso de

um sistema ProteOn XPR36T (BioRad). A superfície do biossensor foi preparada acoplando-se o Fc de IgG anti-humano (Jackson cat#109-005-098) à superfície da camada de polímero de alginato modificado de um chip GLC (BioRad, Cat#176-5011) segundo as instruções do fabricante para a química de acoplamento de amina. Aproximadamente 5.000 UR (unidades de resposta) de mAbs de foram imobilizadas. Os experimentos cinéticos foram realizados a 25°C em tampão de corrida (DPBS+0,01% P20+100 µg/mL de BSA). Para realizar os experimentos cinéticos, 200 UR de mAbs foram capturadas seguido por injeções de analitos (PD-1 cino ou humano) em 400 concentrações na faixa de 1,563 nM a 400 nM (em uma diluição em série de 4 vezes). A fase de associação foi monitorada durante 3 minutos a 50 µL/min, seguida de 10 ou 15 minutos de fluxo de tampão (fase de dissociação). A superfície do chip foi regenerada com dois pulsos de 18 segundos de 100 mM H₃PO₄ (Sigma, n° de catálogo 7961) a 100 µL/min.

[0504] Os dados coletados foram processados usando-se o software ProteOn Manager. Primeiro, os dados foram corrigidos para o fundo (background) com o uso de inter-pontos (inter-spots). Então, a subtração dos dados de referência dupla foi realizada usando a injeção de tampão para injeções de analito. A análise cinética dos dados foi realizada como uso de um modelo de ligação 1:1 de Langmuir. O resultado para cada mAb foi registrado no formato de k_a (taxa de associação), k_d (taxa de dissociação) e K_D (constante de dissociação em equilíbrio).

Inibição de células T específicas de antígeno: Ensaio de ativação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) induzidas por citomegalovírus (CMV) ("CMV-PBMC")

[0505] Um ensaio que utiliza resposta de recuperação específica para CMV foi usado para avaliar a capacidade dos anticorpos gerados para inibir a ativação de células T medido pela inibição da proliferação

celular mediante o tratamento de doadores de PBMC reativos a CMV com mistura de peptídeos de CMV (JPT Tecnologias).

[0506] As PBMC (Astarte Biologics, Hemacare, Precision for Medicine) foram determinadas como sendo reativas a antígenos CMV pelos respectivos fornecedores. Frascos congelados de PBMC foram adquiridos junto aos fornecedores e mantidos em nitrogênio líquido. No dia do experimento, uma alíquota de PBMC congeladas foi descongelada e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de ensaio (RPMI-1640/Glutamax/HEPES contendo solução de 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA), 10% de soro fetal bovino inativado por calor (todos adquiridos junto à Thermo Fisher Scientific). As células foram centrifugadas, 200 g durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em meio de ensaio de 10 mL e centrifugadas a 250 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de ensaio, passadas através de uma peneira de 70 µmetros, e contadas. A concentração das células foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ células/mL ou 2×10^6 células/mL de, e as células foram colocadas em placas a 100 µlitros/poço com o uso de placas de 96 poços de fundo redondo tratadas com cultura de tecido (Corning). A densidade celular de plaqueamento foi específica para o doador e predeterminada em experimentos preliminares para maximizar a janela de ensaio. A mistura peptídica de CMV foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 40 µL de sulfóxido de dimetila (Sigma) foram adicionados a um frasco contendo 25 µg de mistura peptídica de CMV em pó liofilizado e pipetados suavemente para dissolver o reagente. O estoque de DMSO da mistura peptídica de CMV foi diluído em PBS para preparar uma solução de 50 µg/mL que foi deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos. Diluição adicional foi prepa-

rada em um meio de ensaio a uma concentração final 4x, e 50 µL da solução peptídica de CMV foram adicionados em cada poço estimulados; enquanto que os poços de controle não estimulados receberam meio não suplementado. A concentração final foi otimizada para uma PBMC específica para o doador em experimentos preliminares (0,1 a 0,2 µg/mL). O anticorpo anti PD-1 foi adicionado em dose única de 10 µg/mL diluída em série no meio de ensaio a uma concentração final 4x, e 50 µL da diluição de anticorpo foram adicionados a cada poço, enquanto os poços de controle "nenhum anticorpo" receberam 50 µL de meio. As placas foram incubadas a 37°C, sob 5% de CO₂ durante 6 horas. Após a incubação, 100 µL do sobrenadante foi coletado de cada poço, e 100 µL de meio de ensaio contendo 1 µCi/poço de metil-3H- timidina (PerkinElmer) foram adicionados em cada poço, e as placas foram incubadas durante 6 horas a 37°C/5% de CO₂. As células foram colhidas em placas Unifilter-96, GF/C (Perkin Elmer), que foram deixadas secar de um dia para o outro à temperatura ambiente. Cinquenta µL de Microscint-20 (PerkinElmer) foram adicionados em cada poço. As placas foram vedadas e contadas com o uso do TopCount NXT (PerkinElmer).

Inibição do agrupamento celular para determinar a capacidade de bloqueio do ligante-receptor dos anticorpos

[0507] Um ensaio com o uso de uma mistura 1:1 de células renais embrionárias humanas (HEK) que superexpressam PD-1 (células PD-1-HEK) ou ligante de PD-1 (células PD-L1-HEK) ou PD-L2 (células PD-L2-HEK) foi usado para avaliar a capacidade dos anticorpos gerados para inibir a interação receptor:ligante em um contexto à base de células, medida pela inibição do agrupamento celular conforme quantificado por citometria de fluxo.

[0508] As células HEK que superexpressam PD1 humano (Crown Bio) foram marcadas com corante Violet Cell Trace (Life Technology-

es). Células HEK que superexpressam PD-L1 ou PD-L2 de macaco cinomolgo foram marcadas com corante Far Red Cell Trace Stain (Life technologies). Brevemente, os corantes foram solubilizados em 20 μL de DMSO para fazer um estoque de 5 mM, então 5 μL foram diluídos em 10 mL de PBS para fazer uma solução 2,5 μM . As células foram contadas e 50×10^6 células foram centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas uma vez em PBS, e 1×10^6 células foram colocadas de lado como controles não manchados. Após a repetição da centrifugação o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas nas soluções de corante adequadas descritas acima e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, 4 mL de soro fetal bovino (FBS) em banho de gelo foram adicionados e incubados durante mais 5 minutos. As células foram então centrifugadas como acima, lavadas uma vez em tampão de ensaio (PBS, 10% de FBS, 1 mM de EDTA), centrifugadas novamente e o sobrenadante aspirado, então cada tipo de célula foi ressuspensa em tampão de ensaio em 3×10^6 células/mL. Os anticorpos de teste foram diluídos três vezes até a concentração final desejada (60 $\mu\text{g/mL}$) no tampão de ensaio. Para preparar as amostras finais de célula/anticorpo (em triplicata), 100 μL de células PD-1-HEK foram misturadas com 100 μL de anticorpo. Após 10 minutos de incubação, 100 μL de células de PD-L1-HEK ou PD-L2-HEK foram adicionados e as amostras finais misturadas foram incubadas em gelo durante um mínimo de uma hora. Finalmente, 5 μL de iodeto de propídio foram adicionados e as amostras foram misturadas gentilmente, transferidas para tubos de fundo redondo de poliestireno e analisadas em um citômetro de fluxo LSRII (BD Biosciences). Após os eventos de "gating" nas células vivas, a porcentagem de eventos duplo-positivos, para os canais Pacific Blue e APC, foi determinada com o uso de software Flowjo e representada graficamente em GraphPad Prism 6. O nível de

agrupamento, conforme medido pela porcentagem de eventos duplo-positivos, para os mAbs anti-PD-1 foi comparado aos anticorpos de controle de isótipos positivos e negativos.

Binagem de epítopo em octet

[0509] A binagem de epítopo dos anticorpos com um ensaio de ligação por competição foi realizada em uma plataforma Octet Red384 (Forte Bio), que se baseia na interferometria de biocamada. Esta técnica mede a ligação de um anticorpo inicial ao biossensor revestido com PD-1 como um deslocamento do comprimento de onda devido ao anticorpo ligado aumentar a densidade óptica da ponta do biossensor ao longo do tempo. Resumidamente, o antígeno PD-1 marcado com histidina foi carregado em seus sensores HIS. Os sensores foram então expostos a 20 µg/mL de anticorpo anti-PD-1 primário, seguido de exposição a uma concentração igual de um segundo anticorpo anti-PD-1. Os dados foram processados com o uso do software de análise de dados ForteBio. A ligação adicional pelo segundo anticorpo após a saturação com o primeiro anticorpo indica a ligação simultânea dos dois anticorpos que necessariamente têm epítomos únicos não sobrepostos. Alternativamente, nenhuma ligação adicional indica que os dois anticorpos competem pela ligação ao antígeno PD-1.

Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC)

A ativação de células T de memória humanas (células-alvo):

[0510] Alíquotas congeladas de células T de memória humanas (AllCells LLC) foram descongeladas em banho de água a 37°C e novamente suspenso em 40 mL de meio de cultura (RPMI + 10% de FBS ou 5% de HuSAB + 50 µM βME (1:1000). + 1% de GlutaMax + 10 mM de Hepes. As placas foram centrifugadas, 250 g durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em meio de cultura de 10 mL e centrifugadas a 250 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, as

células foram ressuspensas em meio de ensaio de 10 mL, e contadas. A concentração das células foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ células/mL e 10 mL da suspensão de células foi transferida para placas de cultura de tecido pré-revestidas com anticorpo anti-CD3 (eBioscience, 5 ug/mL em PBS, uma hora a 37°C). O meio de cultura foi suplementado com 2 µg/mL de anticorpo anti-CD28 (eBioscience) e um coquetel de citocinas IL-2, IL-15 e IL-7 (R&D Systems and Peprotech) a 100 ng/mL conc. Os experimentos preliminares demonstraram que a expressão de PD-1 atingiu um pico no dia 5 após a ativação e, portanto, esse ponto no tempo foi escolhido para o ensaio. As células T de memória em repouso recentemente isoladas (não ativadas por estimulação de CD3/CD28) também foram incluídas na análise como um controle, porque elas expressam níveis baixos de PD-1.

Preparação de células efectoras (NK92.CD16 e PBMCs):

[0511] Células NK-92 foram cultivadas em frascos de cultura de tecido armazenados na vertical e mantidos a uma densidade de 0,5 a $1,0 \times 10^6$ células/mL em meio de 6 mL (Myelocult 40 (Stemcell Technologies), piruvato de sódio 1X/ aminoácidos não essenciais/Pen Strep (Invitrogen), Hidrocortisona 4 µM (StemCell Technologies), 100 ng/mL de rhIL-2 (R&D Systems)). As células PBMC (Hemacare) congeladas foram descongeladas um dia antes do experimento e ressuspensas em meio XVIVO-10 (Lonza), 10% de FBS (Nitrocelulose) e 100 ng/mL de IL2 (R&D Systems). As placas foram centrifugadas, 250 g durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em meio de cultura de 10 mL e centrifugadas a 250 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura e contadas. A concentração celular foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ células/mL e o número necessário de células foi plaqueado em placa TC.

[0512] No dia da análise, as células PBMCs e NK foram colhidas e

ressuspensas a 1×10^7 células/mL e 4×10^6 células/mL respectivamente em meio de ensaio (RPMI, 10% de FBS, 1 mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de NEAA). As células T de memória foram lavadas uma vez, ressuspenas em 1×10^6 células/mL e marcadas com 6 μ L de BATDA (Perkin Elmer por mL de células a 37°C por 30 min. Células marcadas com BATDA foram lavadas três vezes com meio de ensaio frio, em excesso e suas densidades ajustadas para $0,2 \times 10^6$ células/mL. Diluições seriadas dos Abs de teste começando a 20 μ g/mL preparadas no meio de ensaio foram liberadas (100 μ L, concentração final 2x) para se obter placas de ensaio de fundo em U de 96 poços. Células-alvo marcadas com BATDA (50 μ L) foram adicionadas a $0,2 \times 10^6$ células/mL e incubadas com mAbs de teste. PBMC(50 μ L) foram adicionadas em 1×10^7 células/mL em uma razão entre células efetoras:células-alvo de 50:1, enquanto que células NK (50 μ L) foram adicionadas a 4×10^6 células/mL em uma razão entre células efetoras e células-alvo de 20:1. Poços de controle de lise máximo contendo células-alvo marcadas e 20 μ L de 2% de Triton X-100 foram montados em triplicata. Os poços de controle (liberação de BATDA no fundo) contendo células-alvo marcadas em meio de ensaio foram também montados em triplicata. O volume final em todas os poços de placas de ensaio foi de 200 μ L. Os conteúdos dos poços foram misturados suavemente por pipeta. As placas foram centrifugadas brevemente e incubadas a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂ durante 2,5 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes (30 μ L) foram transferidos para placas Nunc brancas opacas (ThermoFisher, 136101) contendo 200 μ L de solução de európio (PerkinElmer, C135-100). As placas foram cobertas para proteger contra a luz e misturadas durante 15 minutos em um agitador. As amostras foram lidas em um leitor Envision MultiLabel (PerkinElmer). A porcentagem de lise foi calculada da seguinte forma: $100 \times (\text{Liberação experi-}$

mental - liberação de fundo)/(liberação máxima - liberação de fundo).

Citotoxicidade dependente de complemento (CDC)

[0513] Alíquotas congeladas de células Pan T humanas (Biological Specialty, LSII 49301C) foram descongeladas em banho-maria a 37°C e ressuspensas em 40 mL de RPMI 1640 + Glutamax + 25 mM HEPES pré-aquecida (Life Technologies, Cat# 72400-047) + 10% FBS (Gibco, 160000-36). As células foram centrifugadas a 250 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em meio de 10 mL a 20 mL e contadas. As células Pan-T humanas (Biological Specialty, LSII 49301C) foram ativadas por 5 a 6 dias antes do ensaio de CDC com o uso do ativador-T humano CD3/CD28 Dynabeads™ (Life Technologies, Cat #11132D). Brevemente, 75 µL de Dynabeads pré-lavadas foram misturados com $6,0 \times 10^6$ células/frasco de células T, adicionados a T175 em 10 a 20 mL de meio e incubadas durante 6 dias em um incubador a 37°C/5% em CO₂. Após 6 dias, as microesferas foram removidas da mistura com o uso de magnetos EasySep™ (STEMCELL Tecnologias, 18000).

[0514] Em preparação para os ensaios de CDC, as células foram centrifugadas a 250 g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura isento de soro, e contadas. A concentração celular foi ajustada para $1,6 \times 10^6$ células/mL em meio isento de soro e 50 µL/poço foram plaqueados em placas de fundo redondo de 96 poços (Falcon 353077). Os anticorpos de teste foram diluídos em série 1:3 até onze pontos em meio isento de soro, começando em 25 µg/mL (3x). 50 µL/poço de anticorpos de teste foram adicionados aos poços de células-alvo adequados. 50 µL/poço de meio isento de soro foram adicionados aos poços de controle de fundo e de lise. As placas foram cobertas e incubadas durante 1 hora à tem-

peratura ambiente (rt). 50 µL/poço de 10% de complemento de coelho (3x) (Invitrogen, 31038-100) diluído em um meio isento de soro foram adicionados aos poços de teste. 50 µL/poço de meio isento de soro foram adicionados aos poços de controle de fundo. 50 µL/poço de 2% de Triton-X em meio isento de soro foram adicionados aos poços de controle de lise. As placas foram incubadas a 37°C, sob 5% de CO₂ durante 60 horas. As células foram centrifugadas a 250 g durante 5 minutos. 50 µL/poço de sobrenadante foram removidos e transferidos para placas UV-Vis de fundo plano de 96 poços (Corning, 3635). 50 µL/poço de reagente de detecção de LDH (Roche, 11-644-793-001) foram adicionados a cada amostra; as placas foram cobertas e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. A absorbância a 490 e 650 nm foi registrada em um SpectraMax Plus M5 (Molecular Devices). As análises estatísticas foram realizadas com o uso do Microsoft Excel e GraphPad Prism 6. A absorbância a 650 nm foi subtraída daquela a 490 nm para normalizar quanto à turvação. A porcentagem (%) de citotoxicidade foi determinado para cada amostra com o uso da seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{Valor experimental} - \text{controle baixo})}{(\text{controle alto} - \text{controle baixo})} \times 100$$

[0515] Sendo que o controle alto é a média dos poços de controle de lise de Triton X, e o controle baixo é a média dos poços de controle de fundo 'meio apenas'. Um modelo de ajuste de curva logística de quatro parâmetros, [log(agonista) vs. resposta - coeficiente angular variável (quatro parâmetros), foi aplicado no GraphPad Prism ao log₁₀ da concentração de Ab em relação à citotoxicidade % calculada. As amostras foram executadas em duplicata, e o ensaio foi realizado duas vezes.

[0516] Para confirmar a expressão do alvo, os níveis de PD-1 em células de Pan-T humanas ativadas foram medidos por citometria de

fluxo no dia 5 ou no dia 6 após a ativação. Brevemente, as células T foram centrifugadas a 250 g durante 5 minutos, e ressuspensas em 1×10^6 células/mL em tampão de corante com BSA (BD Biosciences, 554657). 100 a 200K foram incubadas em 100 μ L de volume total com concentrações saturantes de Ab PE-PD-1 (Biolegend, 329906). As células foram lavadas 2x com tampão de corante com BSA, e ressuspensas em um volume igual de tampão contendo corante DRAQ7 vivo/morto mancha (Cell Signaling Technology, 7406S). A intensidade fluorescente média foi registrada para eventos de 5K de células vivas em um citômetro de fluxo MACSQuant Analisador 10. Os níveis do receptor foram determinados com o uso de uma curva-padrão gerada com o uso de microesferas PE Quantibrite™ (BD, 340495) e expressos como anticorpos ligados por célula.

Exemplo 2. Geração de anticorpos agonísticos que se ligam especificamente a PD-1 e sua caracterização estrutural

[0517] Três camundongos Balb/c e três camundongos C3H foram imunizados com domínio extracelular (ECD) de PD-1 humana (**SEQ ID Nº: 1**) conjugado a Fc (huPD-1-Fc) e os hibridomas gerados com o uso de protocolos-padrão. Os hibridomas foram triados por ELISA para ligação a PD-1 recombinante (ECD). Acertos ("hits") foram definidos como amostras dando um sinal ELISA maior que cinco vezes a média de controle negativo. Os clones positivos foram submetidos a triagem cruzada contra uma proteína de fusão Fc irrelevante e para ligação ao PD-1 de camundongo. Os sobrenadantes de hibridomas clonados de célula única foram testados quanto à ligação à proteína PD-1 humana e de cino. Os acertos foram definidos como sinal maior que a média + 3 D.P. dos controles negativos.

[0518] Os anticorpos de camundongo selecionados foram clonados como mAbs quiméricos na IgG1 humana e testados quanto à sua capacidade de inibir a ativação da célula T específicas para antígeno

no ensaio de recuperação de CMV de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 1 (ensaio CMV-PBMC). A Figura **1A** e a Figura **1B** mostram que a maioria dos anticorpos testados inibiram a proliferação de células T em um nível de cerca de 50% ou mais. PD1B199 é um mAb anti-PD1 antagonístico. CNTO3930: controle de isótipo.

SEQ ID Nº: 1 PD-1 ECD

PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN
WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVV
RARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLV

SEQ ID Nº: 131 FL de PD-1 madura

PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLN
WYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVV
RARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLVVGVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTG
QPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVF
PSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

Exemplo 3. Humanização de anticorpos anti-PD-1

[0519] Vários anticorpos parentais incluindo PD1B505, PD1B506 e PD1B512 foram humanizados. Para encontrar a melhor combinação de VH e VL humanizadas, uma ou mais sequências de linhagem germinativa humana da região V pesada e leve humana foram selecionadas para cada um dos anticorpos. Segmentos J humanos para VL e VH de cada anticorpo parental foram escolhidos pela comparação da sequência de segmento J parental com as sequências de segmento J humano para maximizar a identidade de sequência. Todos os pares de VH/VL humanizados foram feitos e testados em matriz como sobrenadantes brutos para a ligação do antígeno e a expressão de proteína. Com base nesses dados, os anticorpos que demonstram ligação de PD-1 comparável ou aprimorada à do anticorpo de camundongo pa-

rental foram purificados e testados quanto à sua eficácia no ensaio de CMV-PBMC.

[0520] Os anticorpos gerados foram analisados quanto a possíveis riscos de modificação pós-traducional indesejados. Motivos de desamidação de alto risco localizados nas CDRs e cisteínas livres em qualquer lugar no anticorpo foram removidos por mutagênese e os anticorpos resultantes testados quanto à sua ligação a PD-1 e eficácia no ensaio CMV-PBMC.

[0521] Os anticorpos humanizados e suas variantes foram clonados como IgG1.

[0522] A **Tabela 3** mostra os anticorpos gerados. A **Tabela 4** mostra as SEQ ID N^{os}: das sequências de aminoácidos da VH, da VL, da HC e da LC dos anticorpos. A **Tabela 5** mostra as SEQ ID N^{os}: das sequências de polinucleotídeos que codificam a VH, a VL, a HC e a LC dos anticorpos. A **Tabela 6** mostra as SEQ ID N^{os}: das sequências de aminoácidos da HCDR1, da HCDR2, da HCDR3, da LCDR1, da LCDR2 e da LCDR3 dos anticorpos. A **Tabela 7** mostra as sequências de aminoácidos de HCDR1 e de HCDR3 dos anticorpos. A **Tabela 8** mostra as sequências de aminoácidos da LCDR1 e da LCDR3 dos anticorpos. A **Tabela 9** mostra as sequências de aminoácidos da aVH e da VL dos anticorpos. A **Tabela 10** mostra as sequências de polinucleotídeos que codificam a VH dos anticorpos. A **Tabela 11** mostra as sequências de polinucleotídeo que codificam a VL dos anticorpos. A **Tabela 12** mostra as sequências de aminoácidos da HC. A **Tabela 13** mostra as sequências de aminoácidos da LC. A **Tabela 14** mostra as sequências de polinucleotídeo que codificam a HC dos anticorpos. A **Tabela 15** mostra as sequências de polinucleotídeo que codificam a LC dos anticorpos.

Tabela 3.

mAb	Origem do anticorpo	Nome de VH	Nome de VL
PD1B505	Parental	PD1H93	PD1L30
PD1B742	PD1B505 humanizado	PD1H384	PD1L468
PD1B743	PD1B505 humanizado	PD1H384	PD1L469
PD1B878	Variante C84S de PD1B743	PD1H405	PD1L469
PD1B506	Parental	PD1H90	PD1L28
PD1B750	PD1B506 humanizado	PD1H388	PD1L470
PD1B751	PD1B506 humanizado	PD1H388	PD1L471
PD1B845	Variante G56A de PD1B750	PD1H399	PD1L470
PD1B846	Variante N55D, G56A de PD1B750	PD1H400	PD1L470
PD1B847	Variante N55Q de PD1B750	PD1H401	PD1L470
PD1B848	Variante N55K de PD1B750	PD1H402	PD1L470
PD1B849	Variante N55E de PD1B750	PD1H403	PD1L470
PD1B850	Variante G56I de PD1B750	PD1H404	PD1L470
PD1B512	Parental	PD1H81	PD1L43
PD1B756	PD1B512 humanizado	PD1H389	PD1L472
PD1B757	PD1B512 humanizado	PD1H389	PD1L473

Tabela 4.

mAb	Nome de VH	Nome de VL	A sequência de aminoácidos SEQ ID N ^{os} :			
			VH	VL	HC	LC
PD1B505	PD1H93	PD1L30	8	14	20	26
PD1B742	PD1H384	PD1L468	9	15	21	27
PD1B743	PD1H384	PD1L469	9	16	21	28
PD1B878	PD1H405	PD1L469	10	16	22	28
PD1B506	PD1H90	PD1L28	44	60	66	82
PD1B750	PD1H388	PD1L470	45	61	67	83
PD1B751	PD1H388	PD1L471	45	62	67	84
PD1B845	PD1H399	PD1L470	46	61	68	83
PD1B846	PD1H400	PD1L470	47	61	69	83
PD1B847	PD1H401	PD1L470	48	61	70	83
PD1B848	PD1H402	PD1L470	49	61	71	83
PD1B849	PD1H403	PD1L470	50	61	72	83
PD1B850	PD1H404	PD1L470	51	61	73	83
PD1B512	PD1H81	PD1L43	94	98	104	108
PD1B756	PD1H389	PD1L472	95	99	105	109
PD1B757	PD1H389	PD1L473	95	100	105	110

Tabela 5.

mAb	Nome de VH	Nome de VL	Sequência de polinucleotídeos SEQ ID N ^{os} :			
			VH	VL	HC	LC
PD1B505	PD1H93	PD1L30	11	17	23	29
PD1B742	PD1H384	PD1L468	12	18	24	30
PD1B743	PD1H384	PD1L469	12	19	24	31
PD1B878	PD1H405	PD1L469	13	19	25	31
PD1B506	PD1H90	PD1L28	52	63	74	85
PD1B750	PD1H388	PD1L470	53	64	75	86
PD1B751	PD1H388	PD1L471	53	65	75	87
PD1B845	PD1H399	PD1L470	54	64	76	86
PD1B846	PD1H400	PD1L470	55	64	77	86
PD1B847	PD1H401	PD1L470	56	64	78	86
PD1B848	PD1H402	PD1L470	57	64	79	86
PD1B849	PD1H403	PD1L470	58	64	80	86
PD1B850	PD1H404	PD1L470	59	64	81	86
PD1B512	PD1H81	PD1L43	96	101	106	111
PD1B756	PD1H389	PD1L472	97	102	107	112
PD1B757	PD1H389	PD1L473	97	103	107	113

Tabela 6.

Anticorpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PD1B505	2	3	4	5	6	7
PD1B742	2	3	4	5	6	7
PD1B743	2	3	4	5	6	7
PD1B878	2	3	4	5	6	7
PD1B506	32	33	40	41	42	43
PD1B750	32	33	40	41	42	43
PD1B751	32	33	40	41	42	43
PD1B845	32	34	40	41	42	43
PD1B846	32	35	40	41	42	43
PD1B847	32	36	40	41	42	43
PD1B848	32	37	40	41	42	43
PD1B849	32	38	40	41	42	43
PD1B850	32	39	40	41	42	43
PD1B512	88	89	90	91	92	93
PD1B756	88	89	90	91	92	93
PD1B757	88	89	90	91	92	93

Tabela 7.

Anticorpo	HCDR1 (SEQ ID N°:)	HCDR2 (SEQ ID N°:)	HCDR3 (SEQ ID N°:)
PD1B505	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID N°: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B742	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID N°: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B743	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID N°: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B878	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID N°: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B506	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNNGGIN (SEQ ID N°: 33)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B750	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNNGGIN (SEQ ID N°: 33)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B751	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNNGGIN (SEQ ID N°: 33)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B845	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNNAGIN (SEQ ID N°: 34)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B846	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNDAGIN (SEQ ID N°: 35)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B847	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNQGGIN (SEQ ID N°: 36)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B848	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNKGGIN (SEQ ID N°: 37)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B849	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNEGGIN (SEQ ID N°: 38)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B850	GYTFTTYWMH (SEQ ID N°: 32)	EINPNNIGIN (SEQ ID N°: 39)	DYYDYGGY (SEQ ID N°: 40)
PD1B512	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID N°: 88)	HIYWDDDKR (SEQ ID N°: 89)	KGYDYGYVMDY (SEQ ID N°: 90)
PD1B756	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID N°: 88)	HIYWDDDKR (SEQ ID N°: 89)	KGYDYGYVMDY (SEQ ID N°: 90)
PD1B757	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID N°: 88)	HIYWDDDKR (SEQ ID N°: 89)	KGYDYGYVMDY (SEQ ID N°: 90)

Tabela 8.

Anticorpo	LCDR1 (SEQ ID Nº:)	LCDR2 (SEQ ID Nº:)	LCDR3 (SEQ ID Nº:)
PD1B505	TASSSVSSSYLH (SEQ ID Nº: 5)	STSNLAS (SEQ ID Nº: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID Nº: 7)
PD1B742	TASSSVSSSYLH (SEQ ID Nº: 5)	STSNLAS (SEQ ID Nº: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID Nº: 7)
PD1B743	TASSSVSSSYLH (SEQ ID Nº: 5)	STSNLAS (SEQ ID Nº: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID Nº: 7)
PD1B878	TASSSVSSSYLH (SEQ ID Nº: 5)	STSNLAS (SEQ ID Nº: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID Nº: 7)
PD1B506	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B750	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B751	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B845	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B846	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B847	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B848	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B849	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B850	KASQNVGTNVA (SEQ ID Nº: 41)	SASYRYS (SEQ ID Nº: 42)	QQYNIYPYT (SEQ ID Nº: 43)
PD1B512	RSSKSLHSNGITYLN (SEQ ID Nº: 91)	QMSNLAS (SEQ ID Nº: 92)	AQNLELPLT (SEQ ID Nº: 93)
PD1B756	RSSKSLHSNGITYLN (SEQ ID Nº: 91)	QMSNLAS (SEQ ID Nº: 92)	AQNLELPLT (SEQ ID Nº: 93)
PD1B757	RSSKSLHSNGITYLN (SEQ ID Nº: 91)	QMSNLAS (SEQ ID Nº: 92)	AQNLELPLT (SEQ ID Nº: 93)

Tabela 9.

Nome da cadeia VH ou VL (SEQ ID NO)	Sequência de aminoácido
PD1H93 (SEQ ID Nº: 8)	DVQLQESGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSMHWVKQAPGKGLKW MGWINIETGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNEDTATYFC ARDYYGTYFYAMDYWGQGTTTLTVSS
PD1H384 (SEQ ID Nº: 9)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTDYSMHWVRQAPGQGLE WMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYF CARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H405 (SEQ ID Nº: 10)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTDYSMHWVRQAPGQGLE WMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYF CARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H90 (SEQ ID Nº: 44)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYFTTTYWMHWVKQRPQGGL WIGEINPNNGGINYNEKFKKKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CTIDYYDYGGYWGQGTTTLTVSS
PD1H388 (SEQ ID Nº: 45)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPNNGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVY YCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS
PD1H399 (SEQ ID Nº: 46)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPNNAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYY CTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS
PD1H400 (SEQ ID Nº: 47)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPDAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYY CTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS
PD1H401 (SEQ ID Nº: 48)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPNQGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVY YCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS
PD1H402 (SEQ ID Nº: 49)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPNKGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVY YCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS
PD1H403 (SEQ ID Nº: 50)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPNEGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVY YCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS
PD1H404 (SEQ ID Nº: 51)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTTTYWMHWVRQAPGQGLE WMGEINPNNIGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRRLSDDTAVYY CTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS

PD1H81 (SEQ ID N°: 94)	QVTLKESGPGLLQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLE WLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTGTYYC VRKGYDYGYVMDYWGQGTTVTVSS
PD1H389 (SEQ ID N°: 95)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEW LAHIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDGTGTYYCV RKGYDYGYVMDYWGQGTTLTVSS
PD1L30 (SEQ ID N°: 14)	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWI YSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYHRSP TFGAGTKLELK
PD1L468 (SEQ ID N°: 15)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSSYLHWYQQKPGAPRLLIY STSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSP TFGQGTKLEIK
PD1L469 (SEQ ID N°: 16)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSSYLHWYQQKPGAPRLLIY STSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLISRLEPEDFAVYYCHQYHRSP TFGQGTKLEIK
PD1L28 (SEQ ID N°: 60)	DIVMTQSQKFMSTSVRDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKAL IYSASYRYSQVPSRFRSGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQYNIYPY TFGSGTKLEMK
PD1L470 (SEQ ID N°: 61)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPEKAPKSLIY SASYRYSQVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNIYPYTF GQGTKLEIK
PD1L471 (SEQ ID N°: 62)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPEKAPKALIIY SASYRYSQVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYNIYPYTF GQGTKLEIK
PD1L43 (SEQ ID N°: 98)	DIVMTQAALSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYLNWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLE LPLTFGSGTKLEMK
PD1L472 (SEQ ID N°: 99)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYLNWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLE LPLTFGGGKVEIK
PD1L473 (SEQ ID N°: 100)	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGITYLNWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLE LPLTFGGGKVEIK

Tabela 10.

Cadeia de VH (SEQ ID Nº: de polinucleotídeo)	Sequência de polinucleotídeos
PD1H93 (SEQ ID Nº: 11)	GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGCC TGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATAC CTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGG AAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACATTGAGACTGG TGAGCCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTT CTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAA CAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCTAG AGATTACTACGGTACTTACTTCTATGCTATGGACTACTGGGGT CAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
PD1H384 (SEQ ID Nº: 12)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGAC CGGCGAGCCACCTACGCCAGGGCTTTACCGGACGGTTTCG TGTTCAGCCTGGATACATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGA TCTGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTGTACTTCTGCG CCCGGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGACTACT GGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H405 (SEQ ID Nº: 13)	CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAAACC TGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACA CCTTTACCGACTACAGCATGCACTGGGTCCGACAGGCTCCA GGACAAGGCTTGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGAC AGGCGAGCCACATACGCCAGGGCTTTACCGGCAGATTTCG TGTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACCGCCTACCTGCAGA TCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGC GCCAGAGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGATTAC TGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTTTCTTCT
PD1H90 (SEQ ID Nº: 52)	CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCC TGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAC CTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTG GACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAACAATG GTGGTATTAATTACAATGAGAAGTTCAAGAAGAAGGCCACAC TGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAA TAGACTACTATGATTACGGGGGCTACTGGGGCCAAGGCACC ACTCTCACAGTCTCCTCA

PD1H388 (SEQ ID Nº: 53)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAA CGGCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGA CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H399 (SEQ ID Nº: 54)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAA CGCCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGA CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H400 (SEQ ID Nº: 55)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACGA CGCCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGA CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H401 (SEQ ID Nº: 56)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACCA GGGCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGA CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H402 (SEQ ID Nº: 57)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAA GGGCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTTCAGGGACGGGTGA

	CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H403 (SEQ ID Nº: 58)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACGA GGGCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTACAGGACGGGTGA CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H404 (SEQ ID Nº: 59)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACC TGGAGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACA CCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCT GGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAA CATCGGCATCAACTACGCCCAGAAATTTACAGGACGGGTGA CCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTACAGCCTACATGGAAC TGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGC ACCATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGG AACACTGGTGACAGTGTCTTCT
PD1H81 (SEQ ID Nº: 96)	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGTTATTGCAGCCC TCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTAC TGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTGTCAGCCTT CAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGAT GATGACAAGCGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCAC AATCTCCAAAGATACCTCCAGCAACCAGGTATTCCTCAAGAT CACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGGCACATACTACTGTGT TCGAAAGGGCTACTATGATTACGGCTATGTAATGGACTACTG GGGTCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
PD1H389 (SEQ ID Nº: 97)	CAGATCACACTGAAAGAATCTGGACCTACACTGGTGAAACCT ACACAGACCCTGACACTGACCTGTACCTTCAGCGGCTTCAGC CTGAGCACCAGCGGCATGGGCGTGAGCTGGATTCTGGCAGC CTCCTGGAAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCACATCTACTGG GACGACGACAAGCGGTACAGCCCTAGCCTGAAGTCTCGGCT GACAATCACCAAGGATACCTCTAAGAACCAGGTGGTGCTGAC AATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGGCACCTACTACTG CGTGCGGAAGGGCTACTACGACTACGGCTACGTGATGGACT ACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCT

Tabela 11.

Nome da VL (SEQ ID N°: de polinucleotídeo)	cDNA de VL
PD1L30 (SEQ ID N°: 17)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTC TAGGGGAACGGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGT GTAAGTTCCAGTTACTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGA TCCTCCCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCT TCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC CTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGC TGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCGCTCAC GTTCTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
PD1L468 (SEQ ID N°: 18)	GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCT CCTGGAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCA GCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCT GGACTGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCT GGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTG GCACAGATTTTAACTGACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAG GATTTTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCACCGGAGCCCC CTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
PD1L469 (SEQ ID N°: 19)	GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCT CCTGGAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCA GCGTGAGCAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCT GGACTGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCT GGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTG GCACAGATTACAACTGACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAG GATTTTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCACCGGAGCCCC CTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
PD1L28 (SEQ ID N°: 63)	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCA GTAAGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAA TGTGGGCACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCA ATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAG TGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGG CAGAATATTTCTGTCAGCAATATAACATCTATCCGTACACGTT CGGATCGGGGACCAAGCTGGAAATGAAA
PD1L470 (SEQ ID N°: 64)	GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCT GTGGGAGATCGGGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAA CGTGGGCACCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGAAA AAGCCCCTAAGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTAC

	AGCGGCGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAAC AGATTTACACTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTT GCCACATACTACTGCCAGCAGTACAACATCTACCCCTACACC TTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
PD1L471 (SEQ ID Nº: 65)	GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCT GTGGGAGATCGGGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAA CGTGGGCACCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGAAA AAGCCCCTAAGGCCCTGATCTACAGCGCCAGCTACCGGTAC AGCGGCGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAAC AGATTTACACTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTT GCCACATACTTTTGCCAGCAGTACAACATCTACCCCTACACC TTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
PD1L43 (SEQ ID Nº: 101)	GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACTCTCCAATCCAGTCACT CTTGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGT CTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGAATTGGTATCTGC AGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGATGT CCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTAGCAGT GGGTCAGGAACTGATTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGA GGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGA ACTTCCGCTCACGTTCGGATCGGGGACCAAGCTGGAAATGA AA
PD1L472 (SEQ ID Nº: 102)	GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACA CCTGGCGAACCTGCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAG CCTGCTGCACAGCAACGGCATCACCTACCTGAACTGGTACCT GCAGAAACCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACCAGAT GAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCGGCT CTGGAAGCGGCACAGACTTCACACTGAAGATCTCTCGGGTG GAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTAATACTGCGCCAGAACCT GGAGCTGCCCCTGACCTTCGGAGGCGGAACAAAGGTGGAGA TCAAG
PD1L473 (SEQ ID Nº: 103)	GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACA CCTGGCGAACCTGCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAG CCTGCTGCACAGCAACGGCATCACCTACCTGAACTGGTACCT GCAGAAACCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACCAGAT GAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCAGCT CTGGAAGCGGCACAGACTTCACACTGAAGATCTCTCGGGTG GAAGCCGAGGACGTGGGAGTGTAATACTGCGCCAGAACCT GGAGCTGCCCCTGACCTTCGGAGGCGGAACAAAGGTGGAGA TCAAG

Tabela 12.

mAb	HC
HC de PD1B505 (SEQ ID Nº: 20)	DVQLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQA PGKGLKWMGWINIETGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYL QINNLIKNETATYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
PD1B742, HC de PD1B743 (SEQ ID Nº: 21)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHWVRQ APGQGLEWMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTA YLQICSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
HC de PD1B878 (SEQ ID Nº: 22)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHWVRQ APGQGLEWMGWINIETGEPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
HC de PD1B506 (SEQ ID Nº: 66)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQ RPGQGLEWIGEINPNNGGINYNEKFKKKATLTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
PD1B750, HC de PD1B751 (SEQ ID Nº: 67)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNNGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTA YMELSRRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

HC de PD1B845 (SEQ ID Nº: 68)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNNAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
HC de PD1B846 (SEQ ID Nº: 69)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNDAGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
HC de PD1B847 (SEQ ID Nº: 70)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNQGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

	CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
HC de PD1B848 (SEQ ID Nº: 71)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNKGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTA YMELSRRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
HC de PD1B849 (SEQ ID Nº: 72)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNEGGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTA YMELSRRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
HC de PD1B850 (SEQ ID Nº: 73)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQ APGQGLEWMGEINPNNIGINYAQKFQGRVTLTVDKSISTAY MELSRRLRSDDTAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

	GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
HC de PD1B512 (SEQ ID Nº: 104)	QVTLKESGPGLLQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIR QPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSSNQV FLKITSVDTADTGTYCVRKGYDYGYVMDYWGQGTTVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
PD1B756, HC de PD1B757 (SEQ ID Nº: 105)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQ PPGKALEWLAHIYWDDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTGTYCVRKGYDYGYVMDYWGQGTTLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Tabela 13.

mAb	LC (SEQ ID N°:)
LC de PD1B505 (SEQ ID N°: 26)	QIVLTQSPAISASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKP GSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCHQYHRSPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
LC de PD1B742 (SEQ ID N°: 27)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSSYLHWYQQKP GLAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCHQYHRSPLTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTCSFNREGEC
PD1B743, LC de PD1B878 (SEQ ID N°: 28)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVSSSYLHWYQQKP GLAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPED FAVYYCHQYHRSPLTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTCSFNREGEC
LC de PD1B506 (SEQ ID N°: 82)	DIVMTQSQKFMSTSVRDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQK PGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQS EDLAIEYFCQQYNIYPYTFGSGTKLEMKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTCSFNREGEC
PD1B750, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848,	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQK EKAPKSLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQYNIYPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS

PD1B849, LC de PD1B850 (SEQ ID Nº: 83)	PVTKSFNRGEC
LC de PD1B751 (SEQ ID Nº: 84)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNVGTNVAWYQQKP EKAPKALIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYFCQQYNIYPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
LC de PD1B512 (SEQ ID Nº: 108)	DIVMTQAALSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYLNWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLRISRV EAEDVGVIYCAQNLELPLTFGSGTKLEMKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
LC de PD1B756 (SEQ ID Nº: 109)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLNWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVIYCAQNLELPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
LC de PD1B757 (SEQ ID Nº: 110)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLNWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVIYCAQNLELPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

Tabela 14.

cDNA de HC (SEQ ID Nº:)
HC de PD1B505 (SEQ ID Nº: 23) GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGA TCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAG GCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACATTGAGACTGGTGAGCCAA CATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACT GCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCTAGA GATTACTACGGTACTTACTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACCACTCTCACA GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGC TGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG ACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGTGGTGGTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA
PD1B742, HC de PD1B743 (SEQ ID Nº: 24) CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG TGTCTTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCA GGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCGAGCC CACCTACGCCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACGCCTGGATACATCTGTGTCTA CAGCCTATCTGCAGATCTGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCGTGTACTTCTGCGCC CGGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGG TGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC

GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC
 AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA
 GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCCTCAC
 CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
 TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
 TGTCTCCGGGTAAA

HC de PD1B878 (SEQ ID N°: 25)

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG
 TGTCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTACCGACTACAGCATGCACTGGGTCCGACAG
 GCTCCAGGACAAGGCTTGGAAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACAGGCGAGCCCA
 CATA CGCCCAGGGCTTTACCGGCAGATTCTGTGTTGAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACC
 GCCTACCTGCAGATCAGTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCA
 GAGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTT
 ACCGTTTCTTCTGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
 GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
 CCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
 GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA
 GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCCTCAC
 CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
 TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT

CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA

HC de PD1B506 (SEQ ID Nº: 74)

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGT
TGTCTTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAG
AGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAACAATGGTGGTATTAA
TTACAATGAGAAGTTCAAGAAGAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAG
CCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAATA
GACTACTATGATTACGGGGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGC
CTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
TGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA
AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

PD1B750, HC de PD1B751 (SEQ ID Nº: 75)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
TGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
GGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAACGGCGGCAT
CAACTACGCCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTA
CAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCAC
CATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCT
TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTCT
ACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA

AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAA

HC de PD1B845 (SEQ ID Nº: 76)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
 TGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
 GGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAACGCCGGCAT
 CAACTACGCCCAGAAATTTAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTA
 CAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCAC
 CATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCT
 TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT
 CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
 CGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCT
 ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAA

HC de PD1B846 (SEQ ID Nº: 77)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
TGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
GGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACGACGCCGGCAT
CAACTACGCCCAGAAATTTAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTA
CAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCAC
CATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCT
TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAA

HC de PD1B847 (SEQ ID Nº: 78)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
TGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
GGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACCAGGGCGGCAT
CAACTACGCCCAGAAATTTAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTA
CAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCAC
CATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCT
TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT

GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAA

HC de PD1B848 (SEQ ID Nº: 79)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
 TGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
 GGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAAGGGCGGCAT
 CAACTACGCCCAGAAATTCAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTA
 CAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCAC
 CATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCT
 TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
 CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
 CGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT
 ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT
 GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
 GAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAA

PD1B849 (SEQ ID Nº: 80)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
TGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
GGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACGAGGGCGGCAT
CAACTACGCCCAGAAATTTAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTA
CAGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCAC
CATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCT
TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCT
ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAGCAACCAAGGACACCCTCAT
GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAAA

HC de PD1B850 (SEQ ID Nº: 81)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAAGTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGAAAG
TGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGCGGCA
GGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGAGATCAACCCCAACAACATCGGCATC
AACTACGCCCAGAAATTTAGGGACGGGTGACCCTGACAGTGGATAAGAGCATCTCTAC
AGCCTACATGGAAGTGTCTCGGCTGCGGAGCGATGACACAGCCGTGTACTACTGCACC
ATCGACTACTACGACTACGGCGGCTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTT
CTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC
GGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA
GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTG
AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAGCAACCAAGGACACCCTCATG

ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
 GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
 CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
 CACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
 AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
 AAA

HC de PD1B512 (SEQ ID Nº: 106)

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGTTATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCT
 GACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTG
 TCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAG
 CGCTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAAGATACCTCCAGCAACCA
 GGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGGCACATACTACTGTGTTC
 GAAAGGGCTACTATGATTACGGCTATGTAATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA
 GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
 CCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
 GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
 GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA
 GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA
 CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
 GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
 AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC
 CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
 GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
 TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
 TGTCTCCGGGTAAA

PD1B756, HC de PD1B757 (SEQ ID Nº: 107)

CAGATCACACTGAAAGAATCTGGACCTACACTGGTGAAACCTACACAGACCCTGACACT

GACCTGTACCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGGGCGTGAGCTGGATT
 CGGCAGCCTCCTGGAAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCACATCTACTGGGACGACGACA
 AGCGGTACAGCCCTAGCCTGAAGTCTCGGCTGACAATCACCAAGGATACCTCTAAGAAC
 CAGGTGGTGCTGACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGGCACCTACTACTGCG
 TGCGGAAGGGCTACTACGACTACGGCTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACT
 GGTGACAGTGTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT
 CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTC
 CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC
 CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGT
 GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCCTTCCCCAAACCCAA
 GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATG
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
 CACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG
 AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT
 CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT
 CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCGGGTAAA

Tabela 15.

cDNA de LC (SEQ ID N°:)

LC de PD1B505 (SEQ ID N°: 29)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGG
 GTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTACTTGCACTGG
 TACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCCAAC
 CTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTA
 CTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA
 CCAGTATCATCGTTCCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGA
 AACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
 GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA

CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
GTGT

LC de PD1B742 (SEQ ID Nº: 30)

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAACG
GGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGCAC
TGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAG
CAACCTGGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAG
ATTTTAACTGACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACT
GCCACCAGTACCACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGA
AATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC
CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT
CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG
CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
GGAGAGTGT

PD1B743, LC de PD1B878 (SEQ ID Nº: 31)

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCCGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAAAG
AGCCACACTGAGCTGTACCGCCAGCAGCTCTGTGTCCAGCAGCTACCTGCACT
GGTATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCACAAGC
AATCTGGCCAGCGGCATCCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGA
CTACACCCTGACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACT
GCCACCAGTACCACAGAAGCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAA
ATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG
CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC
CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG
CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT

LC de PD1B506 (SEQ ID Nº: 85)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAAGAGACAGG
GTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGCACTAATGTAGCCTGGTA

TCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCG
 GTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCA
 CTCTCACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAATATTTCTGTCAGC
 AATATAACATCTATCCGTACACGTTTCGGATCGGGGACCAAGCTGGAAATGAAAC
 GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
 AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
 CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG
 AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
 GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

PD1B750, PD1B845, PD1B846, PD1B847, PD1B848, PD1B849, LC de PD1B850
 (SEQ ID Nº: 86)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCTGTGGGAGATCG
 GGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGCCTGG
 TACCAGCAGAAACCTGAAAAAGCCCCTAAGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTA
 CCGGTACAGCGGCGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAACAGATT
 TCACACTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATACTACTGCC
 AGCAGTACAACATCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCA
 AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
 GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
 CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
 GTGT

LC de PD1B751 (SEQ ID Nº: 87)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCTAGCTCTCTGAGCGCCTCTGTGGGAGATCG
 GGTGACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGCCTGG
 TACCAGCAGAAACCTGAAAAAGCCCCTAAGGCCCTGATCTACAGCGCCAGCTA
 CCGGTACAGCGGCGTGCCTTCTCGGTTTAGCGGCTCTGGAAGCGGAACAGATT
 TCACACTGACCATCTCTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCCACATACTTTTGCC
 AGCAGTACAACATCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCA
 AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
 TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG

AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
GTGT

LC de PD1B512 (SEQ ID Nº: 111)

GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATCA
GCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACT
TATTTGAATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTAT
CAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTAGCAGTGGGTC
AGGAACTGATTTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTG
TTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTCCGCTCACGTTCCGATCGGGGACCA
AGCTGGAAATGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT
TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT
ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGT

LC de PD1B756 (SEQ ID Nº: 112)

GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCT
GCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCATCAC
CTACCTGAACTGGTACCTGCAGAAACCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTA
CCAGATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCGGCTCTGGAA
GCGGCACAGACTTCACACTGAAGATCTCTCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGG
AGTGTACTACTGCGCCAGAACCTGGAGCTGCCCCTGACCTTCGGAGGCGGAA
CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT

LC de PD1B757 (SEQ ID Nº: 113)

```
GACATCGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCTCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCT
GCCTCTATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGCAACGGCATCAC
CTACCTGAACTGGTACCTGCAGAAACCTGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTA
CCAGATGAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCTGATCGGTTTAGCAGCTCTGGAA
GCGGCACAGACTTCACACTGAAGATCTCTCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGG
AGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAGCTGCCCCTGACCTTCGGAGGCGGAA
CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT
```

[0523] As sequências de cDNA que codificam a VH, VL, HC e LC do anticorpo aqui fornecidas podem ser otimizadas por códon para expressão em várias células, por exemplo, para expressão em células HEK ou CHO. As sequências de cDNA adicionais que podem ser usadas para codificar e expressar a VH, a VL, a HC e a LC de PD1B878 e PD1B849 são mostradas abaixo.

SEQ ID N°: 132 cDNA de VH de PD1B878

```
CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAACCTGG
CGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTAC
CGACTACAGCATGCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCT
TGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACAGGCGAGCCCACA
TACGCCCAGGGCTTTACCGGCAGATTCGTGTTCAGCCTGGACACC
TCTGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAG
GATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGAGACTACTACGGCACCTAC
TTCTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTTACCGTT
TCTTCT
```

SEQ ID N°: 133 cDNA de VL de PD1B878

```
GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCCGCCACACTGTCACTGTCTCCA
GGCGAAAGAGCCACACTGAGCTGTACCGCCAGCAGCTCTGTGTC
```

CAGCAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCCC
CTCGGCTGCTGATCTACAGCACAAGCAATCTGGCCAGCGGCATC
CCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTACACCCTG
ACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC
CACCAGTACCACAGAAGCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGGCACCAA
GCTGGAAATCAAG

SEQ ID Nº: 134 cDNA de HC de PD1B878

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAAAACCTGG
CGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTAGCGGCTACACCTTTAC
CGACTACAGCATGCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCT
TGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACAGGCGAGCCCACA
TACGCCCAGGGCTTTACCGGCAGATTCGTGTTCAGCCTGGACACC
TCTGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAG
GATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGAGACTACTACGGCACCTAC
TTCTACGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTTACCGTT
TCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGG
ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC

CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID Nº: 135 cDNA de LC de PD1B878

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCCGCCACACTGTCACTGTCTCCA
GGCGAAAGAGCCACACTGAGCTGTACCGCCAGCAGCTCTGTGTC
CAGCAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACTGGCCC
CTCGGCTGCTGATCTACAGCACAAGCAATCTGGCCAGCGGCATC
CCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGAAGCGGCACCGACTACACCCTG
ACAATCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGC
CACCAGTACCACAGAAGCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAA
GCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID Nº: 136 cDNA de VH de PD1B849

CAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGG
CGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTAC
CACCTACTGGATGCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCT
TGGAGTGGATGGGCGAGATCAACCCCAATGAAGGCGGCATCAAC
TACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACAA

GAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCTGAGCCGGCTGAGATCCG
ATGACACCGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACG
GCGGCTATTGGGGGCCAGGGGCACACTGGTTACAGTGTCCTCT

SEQ ID Nº: 137 cDNA de VL de PD1B849

GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTG
GGCGATAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGG
CACCAATGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGAGAAGGCCCTTA
AGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATACAGCGGCGTGCCA
AGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAC
AATTAGTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA
GCAGTACAACATCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCT
GGAAATCAAG

SEQ ID Nº: 138 cDNA de HC de PD1B849

CAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGG
CGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTAC
CACCTACTGGATGCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGACAAGGCT
TGGAGTGGATGGGCGAGATCAACCCCAATGAAGGCGGCATCAAC
TACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGTGGACAA
GAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCTGAGCCGGCTGAGATCCG
ATGACACCGCCGTGTACTACTGCACCATCGACTACTACGACTACG
GCGGCTATTGGGGGCCAGGGGCACACTGGTTACAGTGTCCTCTGCC
TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAGTCAACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT

CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA

SEQ ID Nº: 139 cDNA de LC de PD1B849

GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTG
GGCGATAGAGTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGG
CACCAATGTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGAGAAGGCCCCCTA
AGAGCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATACAGCGGCGTGCCA
AGCAGATTTTCTGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAC
AATTAGTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCA
GCAGTACAACATCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCT
GGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG
CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0524] A Figura **2A** e a Figura **2B** mostram o alinhamento das sequências de aminoácidos VH e VL de mAbs da linhagem PD1B505, respectivamente.

[0525] A Figura **3A** e a Figura **3B** mostram o alinhamento das sequências de aminoácidos VH e VL de mAbs da linhagem PD1B506, respectivamente.

[0526] A Figura **4A** e a Figura **4B** mostram o alinhamento das sequências de aminoácidos VH e VL de mAbs da linhagem PD1B512, respectivamente.

Exemplo 4. Anticorpos anti-PD-1 humanizados inibem células T específicas de antígeno

[0527] Os anticorpos humanizados selecionados foram caracterizados por sua capacidade de inibir células T ativadas em um ensaio de recuperação específico de CMV (ensaio CMV-PBMC descrito no Exemplo 1). Os anticorpos parentais PD1B505 e PD1B506 demonstraram inibição robusta de células T ativadas avaliadas através de três doadores diferentes em vários experimentos separados conforme mostrado na **Tabela 16**, em que os resultados são mostrados como porcentagem (%) de inibição da proliferação de células T em 10 µg/mL de mAb. A Figura **5A** mostra a porcentagem de inibição média e o desvio padrão (STDEC) para PD1B505 (57,8% ± 9,5%) e PD1B506 (77,0% +/- 7,8%) quando comparada ao controle isotípico (IgG1 humana) (-9,5% ± 28,8%). Os anticorpos humanizados PD1B743, PD1B750 e PD1B756 também inibiram a ativação de células T conforme mostrado na **Tabela 17** como % de inibição em 10 µg/mL. A Figura **5B** mostra a porcentagem de inibição média e o desvio padrão (STDEV) para PD1B743 (58,0% ± 11,3%) PD1B750 (65,9% ± 13,2%), PD1B756 (36,7% ± 15,5%) quando comparada ao controle isotípico (IgG1 humana) (3,5% ± 25,6%). Os ensaios que demostram acima de 25% de desvio padrão (STDEV) foram excluídos da análise. Os anti-

corpos manipulados PD1B878 E PD1B849 de modo similar inibiram as células T ativadas conforme mostrado na **Tabela 18**. A Figura **5C** mostra a porcentagem de inibição média e o desvio padrão (STDEV) para PD1B878 ($78,3\% \pm 18,1\%$) e PD1B849 ($69,0\% \pm 4,0\%$) quando comparada ao controle isotípico (IgG1 humana) ($4,1\% \pm 28,7\%$).

Tabela 16.

	PD1B505		PD1B506		Isótipo	
Doador	Média	STDEV	Média	STDEV	Média	STDEV
D1	86,5	9,0	95,2	1,4	4,7	13,3
D2	74,8	0,8	100,1	3,3	13,2	12,9
D1	77	23,0	98	9,8	4,2	33,6
D2	87,7	3,7	100,0	5,8	-16,6	30,6
D3	0,7	8,3	49,5	11,4	6,1	5,7
D1	77,1	4,1	87,8	4,0	-33,1	59,1
D1	69,7	5,4	85,2	2,7	3,1	24,5
D3	63,4	4,9	101,4	8,7	-23,5	44,3
D1	84,5	7,2	86,4	6,5	-35,6	60,4
D1	76,6	2,5	103,1	5,2	-17,7	28,1
D1	49,8	12,7	64,2	11,5	-14,9	19,5
D1	-7,0	17,1	3,8	12,1	-20,0	29,3
D2	49,1	16,6	76,6	6,8	-0,9	28,1
D1	20,1	17,0	26,2	20,7	-2,0	14,2

Tabela 17.

	PD1B743		PD1B750		PD1B756		Isótipo	
Doador	Média	STDEV	Média	STDEV	Média	STDEV	Média	STDEV
D1	90,1	3,1	97,2	10,0	59,3	18,2	-17,7	28,1
D3	21,1	13,8	74,9	16,7	27,4	14,2	-6,6	17,7
D4	30,5	23,6	24,2	15,5	0,3	17,1	2,7	7,7
D5	64,0	5,9	75,0	9,9	69,3	12,8	14,1	35,6
D1	66,7	14,8	58,1	19,8	27,4	15,4	-13,1	45,2
D3	35,1	8,2	55,6	5,8			0,5	20,8
D1	84,2	2,2	72,1	18,8			43,1	17,5
D1	58,4	8,4	64,7	7,3			5,8	31,6
D1	72,1	21,4	71,6	14,8			2,5	25,9

Tabela 18.

	PD1B878		PD1B849		Isótipo	
Doador	Média	STDEV	Média	STDEV	Média	STDEV
D1			64,3	2,5	5,8	31,6
D1	78,3	18,1	73,7	5,6	2,5	25,9

Exemplo 5. Anticorpos anti-PD-1 humanos se ligam a PD-1 com alta afinidade

[0528] A afinidade dos anticorpos parentais e humanizados com PD-1 foi medida com o uso de SPR, conforme descrito no Exemplo 1.

[0529] A **Tabela 19** mostra os resultados dos experimentos de afinidade. Os anticorpos ligaram-se a PD-1 com uma K_D na faixa de cerca de $5,2 \times 10^{-8}$ M e $2,1 \times 10^{-8}$ M.

Tabela 19.

mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
PD1B505	8,11E+04	2,36E-03	2,91E-08
PD1B742			
PD1B743	9,15E+04	3,00E-03	3,28E-08
PD1B878	5,98E+04	3,51E-03	5,89E-08
PD1B506	1,95E+05	1,02E-02	5,24E-08
PD1B750	3,59E+05	8,32E-03	2,32E-08
PD1B751			
PD1B845*	3,51E+05	8,43E-03	2,40E-08
PD1B846*	3,49E+05	7,53E-03	2,16E-08
PD1B847*	3,03E+05	7,44E-03	2,46E-08
PD1B848*	2,53E+05	9,91E-03	3,92E-08
PD1B849	1,88E+05	8,83E-03	4,71E-08
PD1B850*	3,13E+05	7,19E-03	2,30E-08
PD1B512			
PD1B756	1,18E+05	2,14E-03	1,81E-08
PD1B757			
*A ligação foi avaliada como sobrenadantes brutos			

Exemplo 6. Anticorpos PD-1 bloqueiam diferencialmente a interação PD/ligante

[0530] O bloqueio de ligante foi avaliado mediante a avaliação do efeito dos anticorpos no agrupamento de células que superexpressam PD-1 ou ligante de PD-1 (PD-L1 ou PD-L2) com o uso do protocolo descrito no Exemplo 1. A porcentagem mais baixa (%) de eventos du-

plasmócitos registrados indicou que o mAb testado bloqueou a ligação de PD-1 ao ligante testado.

[0531] A Figura **6A** mostra a porcentagem de agrupamentos de células PD-1-HEK e PD-L1-HEK que permaneceu após o tratamento das células com PD1B743, PD1B750 ou PD1B756. PD1B743 e PD1B756 não bloquearam a ligação de PD-L1 a PD-1, enquanto PD1B750 bloqueou. De modo similar, PD1B743 e PD1B756 não bloquearam a ligação de PD-L2 a PD-1 ao passo que PD1B750 bloqueou (**Figura 6B**). O mAb bloqueador de ligante de PD-1 conhecido foi usado como um controle positivo nos experimentos.

Exemplo 7. Binagem de epítipo de anticorpos

[0532] Grupos ("bins") de cinco epítipo distintos foram identificados em ensaios iniciais de matriz com o uso de anticorpos quiméricos seguindo o protocolo descrito no Exemplo 1. Os grupos 4 e 5 não tiveram competição cruzada com quaisquer outros grupos. Os grupos 1, 2 e 3 foram parcialmente sobrepostos; O grupo 1 competiu com os grupos 2 e 3, e os grupos 2 e 3 competiram com o grupo 1. Os grupos 1, 2, 3 e 4 não bloquearam a ligação de PD-L1 a PD-1, enquanto que o grupo 5 bloqueou a interação PD-L1/PD-1. A Figura 7 mostra os grupos de epítipos distintos e os anticorpos em cada grupo.

[0533] Um experimento de controle com controle isotópico como o primeiro anticorpo adicionado foi feito para demonstrar como o segundo anticorpo se ligaria sozinho a PD-1 humana. Então no experimento de competição, o sinal (nm) da associação do segundo anticorpo foi tomado em 180 segundos após o início desta etapa. O sinal de cada anticorpo que competiu potencialmente foi comparado a uma média do sinal de 3 execuções do mesmo anticorpo adicionado após a controle de isotipo. Uma razão entre esses sinais foi determinada. Se a razão estava abaixo de 0,7, então foi determinado que o segundo anticorpo não poderia se ligar a PD-1 humana e os dois anticorpos compartilham

o mesmo epítopo. Se a razão era maior que 0,7, foi determinado o segundo anticorpo poderia se ligar na presença do primeiro anticorpo e, portanto, os dois anticorpos ligaram-se aos epítopos que não competiram.

[0534] Não se espera que a humanização e a engenharia de PTM resulte em uma mudança no epítopo, portanto, espera-se que PD1B743, PD1B742 e PD1B878 se liguem ao mesmo epítopo como o grupo 1 quimérico parental PD1B505. De modo similar, espera-se PD1B750, PD1B751 e PD1B849 se liguem ao mesmo epítopo como o grupo 5 quimérico parental PD1B506, e espera-se que PD1B756 se ligue ao mesmo epítopo como o grupo 2 quimérico parental PD1B512.

[0535] PD1B503 compreende a VL e a VH das SEQ ID N^{os}: **114 e 115**, respectivamente.

[0536] PD1B517 que compreende a VL e a VH das SEQ ID N^{os}: **116 e 117**, respectivamente.

SEQ ID N^o: 114 VH de PD1B503 (PD1H96)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVRQRPEQGLE
WIGWIFPGDGSTKYNEKFKGKATLTDDKSSSTAYMQFSRLTSEDSAV
YFCARGGMRQLGRFVYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID N^o: 115 VL da PD1B503 (PD1L32)

DIVLTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIY
AASTLD SGV PKRFSGSRSGSDYSLTSSLESEDFADYYCLQYASNPY
TFGGGTKLEIK

SEQ ID N^o: 116 VH da PD1B517 (PD1H73)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNVKDTYFHWVKQRPDQGL
EWIGRIVSANGDTKYAPKLQDKATITDDTSSNTAYLQLSRLTSEDTAV
YYCVLIYYGFEEGDFWGQGTTTLTVSS

SEQ ID N^o: 117 VL da PD1B517 (PD1L34)

DIVMTQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINWLSWYQQKPGNVPKLLI

YKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLNISLQPEDIATYYCQQGQSFP
LTFGAGTKLELK

Exemplo 8. Maturação de afinidade de PD1B878

[0537] Para melhorar a afinidade de ligação de PD1B878, foram realizadas varreduras de CDR em cadeias pesadas e cadeias leves. Bibliotecas não combinatórias foram projetadas para diversificar cada posição de todas as seis CDRs (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3).

[0538] Resumidamente, as bibliotecas de Fab foram construídas em um sistema de apresentação de Fab de fago pIX, conforme descrito em WO2009/085462, Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397: 385-396 (2010), and Tornetta *et al.* *J Immunol Methods* 360: 39-46 (2010) com pequenas modificações nos sítios de enzima de restrição. Estas bibliotecas foram triadas ("panned") contra PD-1/PDCD1 humana biotinilada (Acro Biosystems. Cat # PD1-H82E4) de acordo com esquemas de triagem ("panning") conhecidos na técnica, como descrito em WO2009/085462 e em Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397: 385-396 (2010). O fago foi produzido por infecção de fago auxiliar. Os aglutinantes foram recuperados pela adição de esferas para formar um complexo de esfera/antígeno/fago. Após a lavagem final, o fago foi resgatado por infecção de células TG-1 de *Escherichia coli* que cresceram exponencialmente.

[0539] Para a triagem de acompanhamento, o DNA plasmidial foi preparado a partir de cultura de um dia para o outro das células TG-1 de *Escherichia coli* e o gene pIX foi excisado pela digestão de NheI/Spel. Após a ligação, o DNA foi transformado em células TG-1 e cultivado em placas LB/água de um dia para o outro. No dia seguinte, as colônias foram colhidas, cultivadas de um dia para outro, e as culturas usadas para (i) sequenciamento de colônias das regiões V e (ii) indução da produção de Fab. Para a produção de Fab, a cultura de um dia foi diluída 100 vezes em meio novo e cultivadas durante 5 a 6 ho-

ras a 37°C. A produção de Fab foi induzida pela adição de meio fresco contendo IPTG e as culturas foram cultivadas de um dia para o outro a 30°C. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes, contendo as proteínas Fab solúveis, foram usados para ELISA Fab. Para o ELISA, as proteínas Fab solúveis foram capturadas nas placas por um anticorpo anti-Fd (CH1) policlonal. Após a lavagem e o bloqueio, PD-1/PDCD1 humano biotinilado foi adicionado a uma concentração de 5 nM. Esta concentração permitiu a classificação das variantes de Fab, definido como a alteração em vezes em função do parente, no qual o Fab parental, presente como um controle em todas as placas, é definido como 100% de ligação. A PD-1 humana biotinilada foi detectado por estreptavidina conjugada com HRP com quimioluminescência medida em um leitor de placas. Por este critério, foram selecionadas 3 cadeias pesadas e duas cadeias leves que se ligam a PD-1 em 10 vezes ou mais em relação ao Fab parental.

[0540] A **Tabela 20** mostra a variante com substituições na posição 57 na HCDR2 da VH e na posição 29 ou 30 da LCDR1 of VL. A **Tabela 21** mostra as SEQ ID N^{os}: das CDRs dos anticorpos. A **Tabela 22** mostra as SEQ ID N^{os}: das sequências de aminoácidos da VH, da VL, da HC e da LC. A **Tabela 23** mostra as SEQ ID N^{os}: dos polinucleotídeos que codificam a VH, a VL, a HC e a LC dos anticorpos. A **Tabela 24** mostra as sequências de aminoácidos do HCDR1, do HCDR2 e do HCDR3. A **Tabela 25** mostra as sequências de aminoácidos da LCDR1, da LCDR2 e da LCDR3. A **Tabela 26** mostra as sequências de aminoácidos de VH. A **Tabela 27** mostra as sequências de aminoácidos de VH. Espera-se que as variantes maturadas por afinidade se liguem ao mesmo epítipo em PD-1 como o anticorpo parental PD1B878.

Tabela 20.

ID do mAb	ID do peptídeo da VH	Mutação de VH em comparação com o parental	ID do peptídeo da VL	Mutação de VL em comparação com a parental
PD1B1085	PD1H585	E57Y	PD1L469	
PD1B1086	PD1H586	E57H	PD1L469	
PD1B1087	PD1H587	E57W	PD1L469	
PD1B1088	PD1H405		PD1L651	V29F
PD1B1089	PD1H405		PD1L652	S30P
PD1B1090	PD1H585	E57Y	PD1L651	V29F
PD1B1091	PD1H586	E57H	PD1L651	V29F
PD1B1092	PD1H587	E57W	PD1L651	V29F
PD1B1093	PD1H585	E57Y	PD1L652	S30P
PD1B1094	PD1H586	E57H	PD1L652	S30P
PD1B1095	PD1H587	E57W	PD1L652	S30P

Tabela 21.

Anticorpo	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
PD1B1085	2	145	4	5	6	7
PD1B1086	2	146	4	5	6	7
PD1B1087	2	147	4	5	6	7
PD1B1088	2	3	4	148	6	7
PD1B1089	2	3	4	149	6	7
PD1B1090	2	145	4	148	6	7
PD1B1091	2	146	4	148	6	7
PD1B1092	2	147	4	148	6	7
PD1B1093	2	145	4	149	6	7
PD1B1094	2	146	4	149	6	7
PD1B1095	2	147	4	149	6	7

Tabela 22.

ID do mAb	ID do peptídeo da VH	ID do peptídeo da VL	VH SEQ ID Nº:	VL SEQ ID Nº:	HC SEQ ID Nº:	LC SEQ ID Nº:
PD1B1085	PD1H585	PD1L469	140	16	150	28
PD1B1086	PD1H586	PD1L469	141	16	151	28
PD1B1087	PD1H587	PD1L469	142	16	152	28
PD1B1088	PD1H405	PD1L651	10	143	22	153
PD1B1089	PD1H405	PD1L652	10	144	22	154
PD1B1090	PD1H585	PD1L651	140	143	150	153
PD1B1091	PD1H586	PD1L651	141	143	151	153
PD1B1092	PD1H587	PD1L651	142	143	152	153
PD1B1093	PD1H585	PD1L652	140	144	150	154
PD1B1094	PD1H586	PD1L652	141	144	151	154
PD1B1095	PD1H587	PD1L652	142	144	152	154

Tabela 23.

ID do mAb	Nome do peptídeo de VH	Nome do peptídeo de VL	SEQ ID Nº: de cDNA de VH	SEQ ID Nº: de cDNA de VL	SEQ ID Nº: de cDNA de HC	SEQ ID Nº: de cDNA de LC
PD1B1085	PD1H585	PD1L469	155	19	160	31
PD1B1086	PD1H586	PD1L469	156	19	161	31
PD1B1087	PD1H587	PD1L469	157	19	162	31
PD1B1088	PD1H405	PD1L651	13	158	25	163
PD1B1089	PD1H405	PD1L652	13	159	25	164
PD1B1090	PD1H585	PD1L651	155	158	160	163
PD1B1091	PD1H586	PD1L651	156	158	161	163
PD1B1092	PD1H587	PD1L651	157	158	162	163
PD1B1093	PD1H585	PD1L652	155	159	160	164
PD1B1094	PD1H586	PD1L652	156	159	161	164
PD1B1095	PD1H587	PD1L652	157	159	162	164

Tabela 24.

Anticorpo	HCDR1 (SEQ ID N°:)	HCDR2 (SEQ ID N°:)	HCDR3 (SEQ ID N°:)
PD1B1085	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGYPT (SEQ ID N°: 145)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1086	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGHPT (SEQ ID N°: 146)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1087	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGWPT (SEQ ID N°: 147)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1088	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID N°: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1089	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGEPT (SEQ ID N°: 3)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1090	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGYPT (SEQ ID N°: 145)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1091	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGHPT (SEQ ID N°: 146)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1092	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGWPT (SEQ ID N°: 147)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1093	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGYPT (SEQ ID N°: 145)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1094	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGHPT (SEQ ID N°: 146)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)
PD1B1095	GYTFTDYSMH (SEQ ID N°: 2)	WINIETGWPT (SEQ ID N°: 147)	DYYGTYFYAMDY (SEQ ID N°: 4)

Tabela 25.

Anticorpo	LCDR1 (SEQ ID N°:)	LCDR2 (SEQ ID N°:)	LCDR3 (SEQ ID N°:)
PD1B1085	TASSSVSSSYLH (SEQ ID N°: 5)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1086	TASSSVSSSYLH (SEQ ID N°: 5)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1087	TASSSVSSSYLH (SEQ ID N°: 5)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1088	TASSSFSSSYLH (SEQ ID N°: 148)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1089	TASSVPSSSYLH (SEQ ID N°: 149)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1090	TASSSFSSSYLH (SEQ ID N°: 148)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1091	TASSSFSSSYLH (SEQ ID N°: 148)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1092	TASSSFSSSYLH (SEQ ID N°: 148)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1093	TASSVPSSSYLH (SEQ ID N°: 149)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1094	TASSVPSSSYLH (SEQ ID N°: 149)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)
PD1B1095	TASSVPSSSYLH (SEQ ID N°: 149)	STSNLAS (SEQ ID N°: 6)	HQYHRSPLT (SEQ ID N°: 7)

Tabela 26.

Nome do peptídeo de VH	Sequência de aminoácido de VH	SEQ ID Nº:
PD1H585	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHW VRQAPGQGLEWMGWINIETGYPTYAQGFTGRFVFSL DTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDY WGQGTLLTVSS	140
PD1H586	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHW VRQAPGQGLEWMGWINIETGHPTYAQGFTGRFVFSL DTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDY WGQGTLLTVSS	141
PD1H587	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHW VRQAPGQGLEWMGWINIETGWPTYAQGFTGRFVFSL DTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYYGTYFYAMDY WGQGTLLTVSS	142

Tabela 27.

Nome do peptídeo de VL	Sequência de aminoácido de VL	SEQ ID Nº:
PD1L651	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSFSSSYLHWYQ QKPGAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTIS RLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGQGTKLEIK	143
PD1L652	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVPSYLHWYQ QKPGAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTIS RLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGQGTKLEIK	144

SEQ ID Nº: 150 PD1B1085, PD1B1090, HC de PD1B1093

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHWVRQAPGQGL
EWMGWINIETGYPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTA
VYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 151 PD1B1086, PD1B1091, HC de PD1B1094

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHWVRQAPGQGL
EWMGWINIETGHPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTA
VYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 152 PD1B1087, PD1B1092, HC de PD1B1095

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHWVRQAPGQGL
EWMGWINIETGWPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTA
VYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°: 153 PD1B1088, PD1B1090, PD1B1091, LC de PD1B1092

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSFSSSYLHWYQQKPGAPRLL
IYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSP
LTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID N°: 154 PD1B1089, PD1B1093, PD1B1094, LC de PD1B1095

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVPSYHLHWYQQKPGAPRLL

IYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSP
LTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID Nº: 155 cDNA de PD1H585

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGG
AGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAC
CGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAGGGC
CTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCTATCCCAC
CTACGCCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTCAGCCTGGATAC
ATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGA
AGATACAGCCGTGTACTTCTGCGCCCCGGGACTACTACGGCACCTA
CTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAG
TGTCTTCT

SEQ ID Nº: 156 cDNA de PD1H586

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGG
AGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAC
CGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAGGGC
CTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCCATCCCAC
CTACGCCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTCAGCCTGGATAC
ATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGA
AGATACAGCCGTGTACTTCTGCGCCCCGGGACTACTACGGCACCTA
CTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAG
TGTCTTCT

SEQ ID Nº: 157 cDNA de PD1H587

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGG
AGCCTCTGTGAAAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAC
CGACTACAGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAGGGC
CTGGAATGGATGGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCTGGCCCAC
CTACGCCCAGGGCTTTACCGGACGGTTCGTGTTCAGCCTGGATAC

ATCTGTGTCTACAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGA
AGATACAGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGGACTACTACGGCACCTA
CTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAG
TGTCTTCT

SEQ ID N°: 158 cDNA de PD1L651

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCT
GGAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCTTCAG
CAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCC
CTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATC
CCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTG
ACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTGC
CACCAGTACCACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAA
GCTGGAAATCAAG

SEQ ID N°: 159 cDNA de PD1L652

GAGATCGTGCTGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCT
GGAGAACGGGCCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGC
CAAGCAGCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCC
CCTCGGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCAT
CCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTACACACT
GACCATCAGCCGGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTG
CCACCAGTACCACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAA
AGCTGGAAATCAAG

SEQ ID N°: 160 PD1B1085, PD1B1090, cDNA de HC de PD1B1093

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGG
TGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGC
GCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTTCC
ATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATCCACTAGTCCAGT
GTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCT
ATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATACAGGCCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGA

AAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAGCA
TGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT
GGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCTATCCCACCTACGCCCAGG
GCTTTACCGGACGGTTCGTGTTACGCCTGGATACATCTGTGTCTA
CAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCG
TGTA CT TCTGCGCCCGGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCA
TGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCC
TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATGATAGTT CGAATTCCTAGAAGACATGATAAGA

TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTAGAATGCAGTGAAAAA
AATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACC
ATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTT
TATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

SEQ ID Nº: 161 PD1B1086, PD1B1091, cDNA de HC de PD1B1094

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAAGTCCCGTTGCGGTGCTGTAAACGG
TGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGC
GCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTTCC
ATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATCCACTAGTCCAGT
GTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCT
ATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATACAGGCCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGA
AAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAGCA
TGCACTGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT
GGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCCATCCACCTACGCCCAGG
GCTTTACCGGACGGTTCGTGTTTCAGCCTGGATACATCTGTGTCTA
CAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCG
TGTAATTCTGCGCCCGGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCA
TGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCC
TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC

GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATGATAGTTCTGAATTCCTAGAAGACATGATAAGA
TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAA
AATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACC
ATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTT
TATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

SEQ ID Nº: 162 PD1B1087, PD1B1092, cDNA de HC de PD1B1095

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGG
TGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGC
GCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCCTTTCC
ATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATCCACTAGTCCAGT
GTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCT
ATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATACAGGCCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGTCTGGAAGCGAACTGAAGAAACCTGGAGCCTCTGTGA
AAGTGTCTTGTAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAGCA
TGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT
GGGCTGGATCAACATCGAGACCGGCTGGCCACCTACGCCAGG
GCTTTACCGGACGGTTCGTGTTTACGCCTGGATACATCTGTGTCTA
CAGCCTATCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAAGATACAGCCG
TGTAATTCTGCGCCCGGGACTACTACGGCACCTACTTCTACGCCA

TGGA CTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACAGTGTCTTCTGCC
TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGC
CCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
AAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATGATAGTTCTGAATTCCTAGAAGACATGATAAGA
TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAA
AATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACC
ATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTT
TATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

SEQ ID Nº: 163 PD1B1088, PD1B1090, PD1B1091, cDNA de LC
PD1B1092

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAAC TCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGG
TGGAGGGCAGTG TAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGC
GCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTTCC
ATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATCCACTAGTCCAGT
GTGGTGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCT
ATTCCTGATGGCGGCCGCCAAAGTATACAGGCCGAGATCGTGC
TGACACAGTCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAACGGG
CCACACTGAGCTGCACCGCCAGCAGCAGCTTCAGCAGCAGCTAC
CTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCTCGGCTGCT
GATCTACAGCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCTGATCGGT
TTTCTGGCAGCGGATCTGGCACAGATTACACACTGACCATCAGCC
GGCTGGAACCTGAGGATTTTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACC
ACCGGAGCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATC
AAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCA
GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA
GGGGAGAGTGTTAGTGATTCTGAATTCCTAGAAGACATGATAAGAT
ACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAA
ATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCA
TTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTT
ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

SEQ ID Nº: 164 PD1B1089, PD1B1093, PD1B1094, cDNA de LC de PD1B1095

TCTGATAAGAGTCAGAGGTAAC TCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGT
GGAGGGCAGTG TAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCGC
CACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCTTTCCATGG

GTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTAGATCCACTAGTCCAGTGTGGT
 GAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTG
 ATGGCGGCCGCCCAAAGTATACAGGCCGAGATCGTGCTGACACAG
 TCTCCTGCCACACTGTCTCTGTCTCCTGGAGAACGGGCCCACTGA
 GCTGCACCGCCAGCAGCAGCGTGCCAAGCAGCTACCTGCACTGGT
 ACCAGCAGAAACCTGGACTGGCCCCCTCGGCTGCTGATCTACAGCA
 CCAGCAACCTGGCCAGCGGCATCCCTGATCGGTTTTCTGGCAGCG
 GATCTGGCACAGATTACACACTGACCATCAGCCGGCTGGAACCTGA
 GGATTTTGCCGTGTACTACTGCCACCAGTACCACCGGAGCCCCCTG
 ACCTTCGGCCAGGGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
 TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
 CTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
 AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
 ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC
 CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTGATTCTGAATTCC
 TAGAAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACT
 AGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATT
 GCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAAC
 AATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGA

[0541] A afinidade dos anticorpos com PD-1 humana e de cino foi medida com o uso de SPR, conforme descrito no Exemplo 1. Os anticorpos ligados a PD-1 com uma K_D na faixa entre 1×10^{-8} M e 10×10^{-10} M (**Tabela 28**) e a PD-1 de cino com uma K_D na faixa entre 7×10^{-8} M e 1×10^{-9} M (**Tabela 26**). As afinidades da maior parte das variantes de PD1B878 maturadas por afinidade melhoraram cerca de 100 vezes em comparação com o anticorpo parental.

Tabela 28.

mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
PD1B1085	1,56E+05	1,42E-04	9,11E-10
PD1B1086	1,24E+05	3,94E-04	3,19E-09
PD1B1087	1,66E+05	2,39E-04	1,44E-09
PD1B1088	3,13E+04	3,41E-04	1,09E-08
PD1B1089	5,86E+04	4,74E-04	8,09E-09
PD1B1090	1,06E+05	2,37E-05	2,23E-10
PD1B1091	7,77E+04	6,44E-05	8,30E-10
PD1B1092	1,40E +05	3,00E-05	2,14E-10
PD1B1093	1,25E+05	4,36E-05	3,49E-10
PD1B1094	1,05E+05	9,16E-05	8,71E-10
PD1B1095	1,51E+05	7,12E-05	4,71E-10

Tabela 29.

mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
PD1B1085	2,00E+05	1,29E-03	6,45E-09
PD1B1086	1,71E+05	5,44E-03	3,18E-08
PD1B1087	2,12E+05	2,47E-03	1,16E-08
PD1B1088	6,61E+04	4,79E-03	7,24E-08
PD1B1089	9,32E+04	8,39E-03	9,00E-08
PD1B1090	1,30E+05	1,85E-04	1,43E-09
PD1B1091	9,91E+04	9,24E-04	9,32E-09
PD1B1092	1,29E+05	4,11E-04	3,18E-09
PD1B1093	1,69E+05	3,68E-04	2,18E-09
PD1B1094	1,35E+05	1,62E -03	1,20E-08
PD1B1095	1,85E+05	7,81E-04	4,23E-09

[0542] PD1B1086, PD1B1090 E PD1B1094 foram caracterizados por sua capacidade de inibir células T ativadas no ensaio de recuperação específico de CMV (ensaio CMV-PBMC descrito no Exemplo 1). A **Tabela 30** mostra a porcentual médio de inibição em dois doadores

em um experimento. Todos os anticorpos testados inibiram o ensaio de recuperação específico de CMV em um grau de 70% ou mais.

Tabela 30.

	PD1B1086	PD1B1090	PD1B1094	IgG1
% de inibição média	72,7	74,8	77,9	6,0

Exemplo 9. Anticorpos agonísticos de PD-1 seletivamente direcionam células T de memória cronicamente ativadas

[0543] Verificou-se que PD-1 é principalmente expressa em células T de memória (células CD45RO⁺) e não em células T puras (sem tratamento prévio), e que a expressão é regulada positivamente mediante a ativação de células T. A expressão de PD-1 aumentou em células T de memória estimuladas com peptídeos de CMV (**Figura 8A**).

[0544] Os anticorpos PD1B849 e PD1B878 foram testados por sua capacidade de inibir a proliferação de células T CD4⁺ ou CD8⁺ com o uso de PBMCs ativadas com CMV. Tanto PD1B849 quanto PD1B878 inibiram a proliferação de PBMCs ativadas específicas para CMV no ensaio de recuperação de CMV-PBMC (**Figura 8B**).

Exemplo 10. Anticorpos agonísticos de PD-1 que esgotam células T de memória ativadas, mas não em repouso, por ADCC

[0545] PD1B849 e PD1B878 foram testados por sua capacidade de mediar ADCC de células T de memória ativadas ou de células T de memória em repouso com o uso de células NK ou PBMCs como células efetoras. As células T de memória ativadas foram identificadas como tendo maior expressão de PD-1 quando comparadas com as células T de memória em repouso. O experimento foi realizado de acordo com os protocolos descritos no Exemplo 1. PD1B849 e PD1B878 foram expressos em duas linhagens celulares separadas de CHO, uma produzindo anticorpos com perfil de glicosilação de anticorpo de CHO normal e a outra produzindo anticorpos tendo teor reduzido de fucosila no carboidrato (por exemplo, linhagem celular de baixa fucose (LF). Os

anticorpos expressos na linhagem celular de baixa fucose tem um teor de fucosila de cerca de 1 a 15%.

[0546] PD1B849 e PD1B878 induziram a ADCC de células T de memória ativadas tanto na presença de células NK (**Figura 9A**, painel esquerdo) quanto de células efetoras PBMC (**Figura 9A**, painel direito). Anticorpos com baixo teor de fucose (PD1B849-LF e PD1B878-LF) demonstraram maior atividade de ADCC em direção as células T de memória. PD1B849 e PD1B878 foram incapazes de induzir CCDA detectável em células T de memória em repouso, que expressam níveis baixos de PD-1 na presença de células NK (**Figura 10A**, painel esquerdo) ou na presença de células efetoras PBMCs (**Figura 10B**, painel direito) células efetoras. PD1B849-LF e PD1B878-LF desencadearam ADCC de baixo nível na presença de células NK ou PBMCs.

Exemplo 11. Anticorpos agonísticos de PD-1 não induzem CDC

[0547] PD1B849 e PD1B878 foram testados quanto por sua capacidade de mediar CDC de células Pan T ativadas com o uso de complemento de coelho adicionado. As células T ativadas têm maior expressão de PD-1 quando comparadas com as células T em repouso. O experimento foi realizado de acordo com os protocolos descritos no Exemplo 1. PD1B849 e PD1B878 não induziram a CDC de células T ativadas nas concentrações testadas (**Figura 11**). O controle positivo OKT3 demonstrou atividade de CDC em direção às células T ativadas na presença, mas não na ausência de complemento.

Exemplo 12. Anticorpos maturados por afinidade não bloqueiam a ligação de PD-L1 a PD-1

[0548] Os anticorpos selecionados foram testados quanto à sua capacidade de bloquear a ligação de PD-L1-Fc dexamerizado a células Jurkat que expressam PD-1. O experimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito a seguir. PD1B878, PD1B1090 e PD1B1094 não bloquearam a ligação de PD-L1 nas concentrações testadas (**Fi-**

gura 12). Como controle positivo, foi demonstrado que um anticorpo antagonista conhecido compete com PD-L1 pela ligação a PD-1 em uma maneira dependente de dose.

[0549] Método: PD-L1-Fc biotinilado (Acro Biosystems) e dextrâmeros SA & APC conjugados (Immudex) foram preparados a uma concentração 4x e foram misturados a uma razão de 100 nM:10 nM em tampão de coloração. Misturas de PD-L1-Fc biotinilado com dextrâmeros e dextrâmeros com meio apenas foram preparadas da mesma maneira para controles negativos ou não específicos de ligação. Essa mistura foi coberta com folha laminada e incubada em gelo durante uma hora, enquanto o restante do experimento era preparado. Diluições em série de anticorpos de teste foram preparadas em tampão de coloração a uma concentração 2x de 20 nM, 2 nM e 0,2 nM. Células Jurkat que superexpressam PD-1 foram colhidas no dia do ensaio e lavadas uma vez com tampão de coloração (BD Pharmingen) por centrifugação das células a 300 g durante 5 minutos a 4°C. As células foram contadas, verificadas quanto à viabilidade e ressuspensas a 2×10^6 células/mL em tampão de coloração. As células foram adicionadas a 25 µL/poço (50.000 células/poço) em uma placa de ensaio de fundo em U de 95 poços, seguido pela adição de anticorpos de teste preparados em 50 µL/poço. As células com anticorpos foram incubadas durante 15 minutos em gelo. Complexos pré-misturados de PD-L1-Fc:Dextrâmero biotinilado, IgG1-Fc:Dextrâmero e Dextrâmeros:tampão foram adicionados a 25 µL/poço. Essa mistura de células, anticorpos e PD-L1 ligados a dextrâmeros foi incubada por 1 hora e coberta com uma folha laminada.

[0550] As células foram lavadas duas vezes pela adição de tampão corante 150 µL, centrifugação em 300 g durante 5 minutos para peletizar as células e sacudida das placas para remover os sobrenadantes. O pélete de células após lavagem final foi ressuspenso em 40

µL de tampão de funcionamento IntelliCyt (tampão corante BD suplementado com 1 mM de EDTA e 0,1% de ácido plurônico) contendo uma diluição 1:1000 de corante Sytox Green para detecção de viabilidade celular vivo/morto (ThermoFisher). As concentrações finais de anticorpos no ensaio foram de 10 nM, 1 nM e 0,1 nM. A concentração final de proteína ligante PD-L1-Fc biotinilada foi de 25 nM. A concentração final de dextrâmeros foi de 2,5 nM.

[0551] As placas foram executadas em iQue Screener (IntelliCyt). Brevemente, as células foram selecionadas em FCS v. SCS para eliminar detritos. Os singletos foram selecionados em SCS-A versus SCS-H e da população de singletos, as células vivas foram selecionadas no canal baixo BL1 para detecção de viabilidade negativa com corante de viabilidade Sytox Green. A porcentagem de células vivas positivas que se ligam a PD-L1-Fc-Dextrâmeros foi avaliada por Geomeans no canal RL1/APC e comparada ao controle negativo, ligação de Fc-Dex isolada. Com o uso de métricas avançadas em ForeCyt (programa de software de processamento IntelliCyt), a população positiva de PD-L1 foi calculada como a % de população viva. A porcentagem específica de ligação de PD-L1 foi calculada da seguinte forma = $(\% \text{positivo com mAb} - \% \text{positivo com dextrâmero IgG1-Fc biotina}) / (\% \text{positivo com controle de isótipo} - \% \text{positivo com dextrâmero IgG1-Fc biotina}) * 100$. Os resultados finais são tabulados em Excel e representados graficamente em prisma mostrando a % de ligação de ligante PD-L1 na presença de mM de anti-PD-1.

Exemplo 13. Anticorpos agonísticos PD-1 são eficazes em um modelo de camundongo de doença de enxerto contra hospedeiro (GvHD)

[0552] Para Estudar o efeito dos mAbs agonistas de PD-1 sobre células T patogênicas *in vivo*, um modelo xenogênico de doença de enxerto contra hospedeiro (Xeno-GvHD) foi desenvolvido mediante transferência adotiva de células mononucleares do sangue periférico

(PBMCs) humanas em camundongos imunocomprometidos NOD-scid IL-2RyN^{ull} (NSG). Camundongos NSG fêmeas (7 a 9 semanas de idade) foram obtidos junto à Jackson Labs. Os camundongos foram colocados em quarentena nas gaiolas durante uma semana antes do uso. As PBMCs humanas congeladas isoladas do creme leucocitário foram obtidas junto à AllCells, Alameda, CA, EUA. Antes da injeção, as células congeladas foram rapidamente descongeladas a 37°C em banho de água e lavadas 3 vezes em solução salina tamponada com dosfato estéril (PBS) por centrifugação a 500 g durante 5 min à temperatura ambiente. As células foram suspensas em PBS frio para obter uma concentração celular final de $50 \times 10^6/\text{mL}$.

[0553] Os Animais foram randomizados por peso corporal e divididos em vários grupos de tratamento (N=10/grupo). Após a randomização, os camundongos conscientes e com movimento livre receberam corporal total de irradiação 100 Rad (1 Gy) com o uso de Gammacell® 3000 Elan Irradiator (9,72 Gy/minuto). Os camundongos foram colocados de volta em suas gaiolas.

[0554] Cada camundongo recebeu 25×10^6 PBMCs humanas em um volume de 500 µl intraperitoneal. Os escores clínicos e o peso corporal de cada animal foram registrados diariamente de acordo com a **Tabela 31**. Os camundongos que perderam $\geq 20\%$ do seu peso corporal foram sacrificados e seus escores clínicos no ponto final foram anotados, de acordo com as diretrizes institucionais do IACUC. Todos os animais foram sacrificados no dia 21. Os baços foram coletados para análise de FACS. O tecido da pele e do cólon foi coletado para análises histológicas.

Tabela 31.

Descrição	Escore clínico
Alerta normal e reativo	0
Pelos arrepiados, atividade diminuída, descarga ocular	1

Postura reclinada, hipotermia ou hipertermia moderada, respiração ofegante durante a punção	2
Respiração ofegante durante o repouso, ataxia, tremor, hipotermia ou hipertermia	3
Perda de capacidade de transitar com punção suave, inconsciente	4
Morte	5

[0555] Os camundongos foram injetados intraperitoneal com 10 mg/kg de mAbs de PD1B505, PD1B506, PD1B849 e PD1B878 que foram clonados como anticorpos quiméricos de mIgG2a, e também como mAb antagonista de PD-1 (PD1B786 em Fc silente de atuador de camundongo), em regime de Q4d/Q3d (dosagem nos dias 0, 4, 7, 11, 14 e 18). CTLA 4-Ig, usada como um controle, foi dosada em um regime de dosagem de Q3d (dia 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18) de 10 mg/kg intraperitoneal.

[0556] No término do estudo, os baços foram removidos ao meio RPMI1640 frio. Após esmagamento dos baços através de um filtro de 70 μ M e peletização das células por centrifugação a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, os eritrócitos foram lisados em tampão de lise ACK (Lonza) em gelo durante 5 minutos, e lavados múltiplas vezes em tampão FACS (PBS/0,5% BSA/2 mM EDTA). A viabilidade dos esplenócitos foi avaliada por coloração de células com o corante de viabilidade ef506 (eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Os esplenócitos foram incubados com bloco Fc humano e camundongo (BD Biosciences) durante 15 minutos em gelo e então corados com concentrações ótimas de mAbs conjugados com fluorocromo 1×10^6 células em 100 μ l em placas de microtitulação com formato de U a 4°C durante 30 minutos, e fixados com tampão de fixação (BD Biosciences). A contagem de microesferas de Brite (Thermofisher) foi adicionada a cada amostra. Controles de QBO (fluorescência de menos um)

foram preparados como controles negativos para cada fluorocromo. As amostras foram analisadas em um instrumento LSRII (BD Biosciences). Os seguintes mAbs foram usados para a análise de células T regulatórias, anti-hCD45 peridínina-clorofila-alfa-proteína (PCP, clone 2D1), anti-FoxP3 alofocianina (APC, clone pCH101), anti-hCD3 alofocianina-cianina 7 (APC-Cy7, clone HIT3a), anti-hCD4 violeta brilhante 605 (BV605, clone OKT4), e anti-hCD25 violeta brilhante 650 (BV650, clone M-A251). As células T regulatórias foram definidas como hCD45⁺ hCD3⁺ hCD4⁺, Foxp3⁺ CD25⁺.

[0557] A Figura **13A** mostra que o tratamento com PD1B505-mIgG2a e PD1B506-mIgG2a impediu o desenvolvimento da doença no modelo de camundongo de GvHD. A Figura **13B** mostra que o tratamento com PD1B849-mIgG2a e PD1B878-mIgG2a impediu a perda de peso no modelo de camundongo de GvHD. A Figura **14B** mostra que o tratamento com PD1B849-mIgG2a e PD1B878-mIgG2a impediu o desenvolvimento da doença no modelo de camundongo de GvHD. A Figura **14B** mostra que o tratamento com PD1B849-mIgG2a e PD1B878-mIgG2a impediu a perda de peso no modelo de camundongo de GvHD. A inibição da perda de peso e o escore clínico foram associados com um aumento em células T regulatórias no baço. A Figura **15** mostra a frequência de Treg no baço dos animais tratados com PD1B849-mIgG2a ou PD1B878-mIgG2a.

Exemplo 14. Anticorpos agonísticos de PD-1 esgotaram as células T auxiliares foliculares (T_{FH}) e células T auxiliares periféricas (T_{PH})

[0558] PBMCs humanas foram recuperadas de cryostorage de nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente em banho de água a 37°C até estarem descongeladas. Os conteúdos do frasco foram transferidos para um tubo cônico de 50 mL estéril (tubos separados para cada doador usado) e meio RPMI completo (10% FBS, 1x penicilina/estreptomicina, 1x piruvato de sódio) foi adicionado a cada tubo por

gotejamento a um volume total de 15 mL. As células foram centrifugadas a 250 xg durante 10 minutos à temperatura ambiente, a seguir o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5 a 10 mL de meio completo e contadas com o uso de exclusão com azul de tripiano. As células foram ressuspensas a $2,5 \times 10^6$ células/mL e plaqueadas a $2,5 \times 10^5$ células/poço (=100 µL/poço) em triplicate em uma placa de poliesterino estéril de fundo em U de 96 poços. Os mAbs de PD-1 ou controle de isótipo de IgG1 humana foram diluídos para concentrações finais 4x e 50 µL/poço foram adicionados aos poços adequados. Após a adição dos anticorpos, soro humano normal foi adicionado a uma concentração final de 5%. O volume total em cada poço foi de 200 µL e as células foram incubadas durante 96 horas a 37°C, 5% de CO₂. Em adição às amostras, vários poços de células extra foram colocadas em placas, receberam 5% de soro humano, e foram incubados juntamente com as amostras tratadas para serem usados como controles de coloração por citometria de fluxo.

[0559] Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 350xg e os sobrenadantes foram evacuados. As células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e poços réplicas foram agrupados então transferidos para uma nova placa de fundo em U de 96 poços para coloração por citometria de fluxo. As células foram centrifugadas a 350xg acumulada durante 5 minutos, os sobrenadantes evacuado e um coquetel de anticorpos fluorescente foi adicionado a cada poço de amostra (a tabela abaixo para mostra os anticorpos usados). Células adicionais salvas para controles foram coradas com coquetéis FMO para marcadores críticos, como PD-1, CXCR5, ICOS, entre outros, a serem usados na análise para definir as portas. As células foram coradas por 25 min no escuro à temperatura ambiente e então centrifugadas a 350xg durante 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes em 200 µL de PBS, então 100 µL de 4% de paraformaldeído foi adicionado a cada poço

para fixar as células. As células foram fixadas durante 10 minutos no escuro a 4°C então lavadas uma vez com PBS+1% de BSA antes de serem ressuspensas em 200 µL de PBS+1% de BSA. A contagem de microesferas (Invitrogen) foi adicionada a 5 µL/poço/(5.000 esferas) para cada amostra antes da aquisição de amostras no citômetro de fluxo BD LSR II. Os dados de citometria de fluxo foram analisados com o uso do software FlowJo. As contagens das amostras foram normalizadas às contagens das esferas da seguinte maneira: $\# \text{ células na amostra} = (\# \text{ células contadas} \times 5.000 \text{ microesferas adicionadas}) / (\# \text{ microesferas contadas})$. As amostras foram normalizadas para o controle de isótipo hulgG1 como: $(\text{contagens de células normalizadas por microesfera "amostra"} / \text{contagem de células normalizadas por microesfera "isótipo"}) \times 100$ e representadas como uma porcentagem (%). Os dados foram analisados com o uso de GraphPad Prism v7.

[0560] Durante a análise, as seguintes populações de células foram descritas:

Auxiliares foliculares T (Tfh): vivas, CD19-CD56-/CD4+CD45RO+/HLADR+/CXCR5+/ICOS+PD1+;

Auxiliares periféricas (Tph): vivas, CD19-CD56-/CD4+CD45RO+/HLADR+/CXCR5-/ICOS+PD1+;

Combinação da população Tfh/Tph: vivas, CD19-CD56-/CD4+CD45RO+/HLADR+/ICOS+PD1+.

[0561] A Figura 16 mostra a curva de resposta à dosagem de depleção mediada por anticorpos da população de T_{HF}/T_{PH} combinada por PD1B878, PD1B878-FL (fucose baixa), PD1B1090 e PD1B1094. Os dados foram representados como a média de alteração % no número de células T_{FH}/T_{PH} do controle de isótipo com o uso de doadores humanos saudáveis $n=8$ ($n=7$ para PD1B1090). Os PD1B878-FL foram mais eficazes em esgotar a população de T_{FH}/T_{PH} .

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e uma LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 165, 4, 166, 6 e 7, respectivamente.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ter uma, duas, três, quatro ou cinco das seguintes propriedades:

a) não bloqueia a ligação de PD-L1 a PD-1; sendo que a falta de bloqueio é medida pela incapacidade do anticorpo de inibir o agrupamento de células que expressam PD-L1 e que expressam PD-1 como descrito no Exemplo 1;

b) se liga a PD-1 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de cerca de 5×10^{-8} M ou menos, sendo que a K_D é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a +25°C;

c) se liga a PD-1 com uma associação constante (k_a) de cerca de 3×10^4 1/Ms ou mais, sendo que a k_a é medida com o uso de um sistema de ProteOn XPR36 C a +25°C;

d) se liga PD-1 com uma constante de dissociação (k_d) de cerca de 3×10^{-3} 1/s ou menos, sendo que a k_d é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a +25°C; ou

e) inibe a proliferação de células T específicas de antígeno; sendo que a proliferação é avaliada em um ensaio de CMV-PBMC como descrito no Exemplo 1.

3. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mes-

mo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de compreender:

- a) um framework da região variável de cadeia pesada (VH) derivado de IGHV7-4-1*1 (SEQ ID N^o: 125);
- b) um framework da região variável de cadeia leve (VL) derivado de IGKV3D-20*1 (SEQ ID N^o: 126); ou
- c) o framework da VH derivado de IGHV7-4-1*1 (SEQ ID N^o: 125) e o framework da VL derivado de IGKV3D-20*1 (SEQ ID N^o: 126).

4. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de compreender a HCDR2 das SEQ ID N^{os}: 3, 145, 146 ou 147 e/ou a LCDR1 das SEQ ID N^{os}: 5, 148 ou 149.

5. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de compreender a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das

- a) SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;
- b) SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;
- c) SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;
- d) SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;
- e) SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;
- f) SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 149, 6 e 7, respectivamente;
- g) SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;
- h) SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;
- i) SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;
- j) SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 149, 6 e 7, respectivamente;
- k) SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 149, 6 e 7, respectivamente; ou
- l) SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 149, 6 e 7, respectivamente.

6. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mes-

mo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de compreender:

- a) uma região variável de cadeia pesada (VH) da SEQ ID N°: 118;
- b) uma região variável de cadeia leve (VL) da SEQ ID N°: 119; ou
- c) a VH e a VL das SEQ ID N°s: 118 e 119, respectivamente.

7. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de compreender:

- a) a VH das SEQ ID N°s: 8, 9, 10, 140, 141 ou 142;
- b) a VL das SEQ ID N°s: 14, 15, 16, 143 ou 144;
- c) a VH da SEQ ID N°: 8 e a VL da SEQ ID N°: 14;
- d) a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 15;
- e) a VH da SEQ ID N°: 9 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- f) a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- g) a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- h) a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- i) a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 16;
- j) a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- k) a VH da SEQ ID N°: 10 e a VL da SEQ ID N°: 144;
- l) a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- m) a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- n) a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 143;
- o) a VH da SEQ ID N°: 140 e a VL da SEQ ID N°: 144;
- p) a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 144; ou
- q) a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 144.

8. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato

de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo competir pela ligação a PD-1 com o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 7.

9. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;

b) a VL das SEQ ID N^{os}: 8, 9 ou 10 e a VL das SEQ ID N^{os}: 14, 15 ou 16; e/ou

c) uma cadeia pesada (HC) da SEQ ID N^o: 20, 21 ou 22 e uma cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 26, 27 ou 28.

10. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 16; e/ou

c) a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 28.

11. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 16; e/ou

c) a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 28.

12. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo

fato de compreender

- a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 5, 6 e 7, respectivamente;
- b) a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 16; e/ou
- c) a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 28.

13. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

- a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;
- b) a VH da SEQ ID N^o: 10 e a VL da SEQ ID N^o: 143; e/ou
- c) a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

14. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

- a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 3, 4, 149, 6 e 7, respectivamente;
- b) a VH da SEQ ID N^o: 10 e a VL da SEQ ID N^o: 144; e/ou
- c) a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 154.

15. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

- a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;
- b) a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 143; e/ou
- c) a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

16. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1

ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N^o: 141 e a VL da SEQ ID N^o: 143;
e/ou

c) a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

17. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 147, 4, 148, 6 e 7, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N^o: 142 e a VL da SEQ ID N^o: 143;
e/ou

c) a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 153.

18. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 145, 4, 149, 6 e 7, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N^o: 140 e a VL da SEQ ID N^o: 144;
e/ou

c) a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 154.

19. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 2, 146, 4, 149, 6 e 7, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 141 e a VL da SEQ ID N°: 144;
e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 151 e a LC da SEQ ID N°: 154.

20. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 2, 147, 4, 149, 6 e 7, respectivamente.

b) a VH da SEQ ID N°: 142 e a VL da SEQ ID N°: 144;
e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 152 e a LC da SEQ ID N°: 154.

21. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser um agonista de PD-1 ou por mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam PD-1, ou ambos.

22. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de as células que expressam PD-1 serem células T de memória ativada, células T auxiliares foliculares (T_{FH}) ou células auxiliares periféricas (T_{PH}), ou qualquer combinação das mesmas.

23. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser um isotipo IgG1, um isotipo IgG2, e um isotipo IgG3 ou um isotipo IgG4.

24. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antí-

geno do mesmo compreender ao menos uma mutação no anticorpo Fc que modula a ligação do anticorpo a um receptor Fc (FcR).

25. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de a ao menos uma mutação ser:

- a) uma mutação S267E;
- b) uma mutação S267D;
- c) uma mutação S267E/I332E;
- d) uma mutação S267E/L328F;
- e) uma mutação G236D/S267E;
- f) uma mutação P238D; ou
- g) uma mutação P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R.

26. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de o anticorpo compreender:

- a) uma cadeia pesada (HC) das SEQ ID N^{os}: 20, 21, 22, 150, 151 ou 152;
- b) uma cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 26, 27, 28, 153 ou 154;
- c) a HC das SEQ ID N^{os}: 20, 21, 22, 150, 151 ou 152 e a LC das SEQ ID N^{os}: 26, 27, 28, 153 ou 154;
- d) a HC da SEQ ID N^o: 20 e a LC da SEQ ID N^o: 26;
- e) a HC da SEQ ID N^o: 21 e a LC da SEQ ID N^o: 27;
- f) a HC da SEQ ID N^o: 21 e a LC da SEQ ID N^o: 28;
- g) a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 28;
- h) a HC da SEQ ID N^o: 150 e a LC da SEQ ID N^o: 28;
- i) a HC da SEQ ID N^o: 151 e a LC da SEQ ID N^o: 28;
- j) a HC da SEQ ID N^o: 152 e a LC da SEQ ID N^o: 28;
- k) a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 153;
- l) a HC da SEQ ID N^o: 22 e a LC da SEQ ID N^o: 154;

- m) a HC da SEQ ID N°: 150 e a LC da SEQ ID N°: 153;
- n) o HC da SEQ ID N°: 151 e a LC da SEQ ID N°: 153;
- o) a HC da SEQ ID N°: 152 e a LC da SEQ ID N°: 153;
- p) a HC da SEQ ID N°: 150 e a LC da SEQ ID N°: 154;
- q) s HC da SEQ ID N°: 151 e a LC da SEQ ID N°: 154; ou
- r) a HC da SEQ ID N°: 152 e a LC da SEQ ID N°: 154.

27. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de a VH do anticorpo e a VL do anticorpo ou a HC do anticorpo e a LC do anticorpo serem codificadas por um polinucleotídeo que compreende a sequência de polinucleotídeo de:

- a) SEQ ID N°s: 11 e 17, respectivamente;
- b) SEQ ID N°s: 12 e 18, respectivamente;
- c) SEQ ID N°s: 12 e 19, respectivamente;
- d) SEQ ID N°s: 13 e 19, respectivamente;
- e) SEQ ID N°s: 23 e 29, respectivamente;
- f) SEQ ID N°s: 24 e 30, respectivamente;
- g) SEQ ID N°s: 24 e 31, respectivamente;
- h) SEQ ID N°s: 25 e 31, respectivamente;
- i) SEQ ID N°s: 132 e 133, respectivamente;
- j) SEQ ID N°s: 134 e 135, respectivamente;
- k) SEQ ID N°s: 155 e 19, respectivamente;
- l) SEQ ID N°s: 156 e 19, respectivamente;
- m) SEQ ID N°s: 157 e 19, respectivamente;
- n) SEQ ID N°s: 13 e 158, respectivamente;
- o) SEQ ID N°s: 13 e 159, respectivamente;
- p) SEQ ID N°s: 155 e 158, respectivamente;
- q) SEQ ID N°s: 156 e 158, respectivamente;
- r) SEQ ID N°s: 157 e 158, respectivamente;
- s) SEQ ID N°s: 155 e 159, respectivamente;

- t) SEQ ID N^{os}: 156 e 159, respectivamente;
- u) SEQ ID N^{os}: 157 e 159, respectivamente;
- v) SEQ ID N^{os}: 160 e 31, respectivamente;
- w) SEQ ID N^{os}: 161 e 31, respectivamente;
- x) SEQ ID N^{os}: 162 e 31, respectivamente;
- y) SEQ ID N^{os}: 25 e 163, respectivamente;
- z) SEQ ID N^{os}: 25 e 164, respectivamente;
- aa) SEQ ID N^{os}: 160 e 163, respectivamente;
- bb) SEQ ID N^{os}: 161 e 163, respectivamente;
- cc) SEQ ID N^{os}: 162 e 163, respectivamente;
- dd) SEQ ID N^{os}: 160 e 164, respectivamente;
- ee) SEQ ID N^{os}: 161 e 164, respectivamente; ou
- ff) SEQ ID N^{os}: 162 e 164, respectivamente.

28. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ter uma estrutura de glicano biantenária com um teor de fucose de cerca de entre 1% e cerca de 15%.

29. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de

- a) codificar a VH das SEQ ID N^{os}: 118, 8, 9, 10, 140, 141 ou 142;
- b) codificar a VL das SEQ ID N^{os}: 119, 14, 15, 16, 143 ou 144;
- c) codificar a VH das SEQ ID N^{os}: 118, 8, 9, 10, 140, 141 ou 142, e a VL das SEQ ID N^{os}: 119, 14, 15, 16, 143 ou 144;
- d) codificar a HC das SEQ ID N^{os}: 20, 21, 22, 150, 151 ou 152;
- e) codificar a LC das SEQ ID N^{os}: 26, 27, 28, 153 ou 154;
- f) codificar a HC das SEQ ID N^{os}: 20, 21, 22, 150, 151 ou 152 e a LC das SEQ ID N^{os}: 26, 27, 28, 153 ou 154; ou

g) compreender a sequência de polinucleotídeo das SEQ ID N^{os}: 11, 12, 13, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 132, 133, 134, 135, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163 ou 164.

30. Vetor caracterizado pelo fato de compreender ao menos um polinucleotídeo como definido na reivindicação 29.

31. Célula hospedeira caracterizada pelo fato de compreender o vetor como definido na reivindicação 30.

32. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de a célula hospedeira ser uma célula eucariótica, uma célula procariótica, uma célula CHO, uma célula HEK293 ou um hibridoma.

33. Método de produção do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula hospedeira, como definida na reivindicação 31, em condições nas quais o anticorpo é expresso, e isolar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

34. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28.

35. Kit, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28.

36. Método de supressão da ativação de uma célula T que expressa PD-1 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, por um tempo suficiente para suprimir a ativação da célula T que expressa PD-1.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracteriza-

do pelo fato de a célula T que expressa PD-1 ser uma célula T CD4⁺ específica de antígeno e/ou uma célula T CD8⁺ específica de antígeno.

38. Método de modulação negativa de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, para modular negativamente a resposta imunológica.

39. Método de tratamento de um distúrbio imunológico, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, para tratar o distúrbio imunológico.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de o distúrbio imunológico ser lúpus, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, artrite, artrite reumatoide, asma, DPOC, doença inflamatória pélvica, doença de Alzheimer, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença de Peyronie, doença celíaca, doença da vesícula biliar, doença pilonidal, peritonite, psoríase, artrite psoriática, vasculite, adesões cirúrgicas, acidente vascular cerebral, diabetes tipo I, doença de Lyme, meningoencefalite, uveíte autoimune, esclerose múltipla, síndrome de Guillain de Barré, dermatite atópica, hepatite autoimune, fibrose alveolar, doença de Grave, nefropatia IgA, púrpura trombocitopênica idiopática, doença de Ménière, pênfigo, cirrose biliar primária, sarcoidose, esclerodermia, granulomatose de Wegener, outras doenças autoimunes, pancreatite, traumas (cirurgia), doença de enxerto versus hospedeiro, rejeição de transplante, doença cardíaca incluindo doenças isquêmicas como enfarte do miocárdio bem como aterosclerose, coagulação

intravascular, reabsorção óssea, osteoporose, osteoartrite, periodontite e hipocloridria, infertilidade relacionada com a falta de tolerância materna ao feto, síndrome de Sjogren, vitiligo, miastenia gravis ou esclerose sistêmica.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 40, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser administrado em combinação com um segundo agente terapêutico.

42. Anticorpo anti-idiotípico, caracterizado pelo fato de se ligar especificamente ao anticorpo ou ao fragmento de ligação ao antígeno como definido na reivindicação 7.

43. Imunoconjugado caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 28, conjugado a uma molécula heteróloga.

44. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e uma LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 32, 124, 40, 41, 42 e 43, respectivamente.

45. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ter uma, duas, três, quatro ou cinco das seguintes propriedades:

a) bloqueia a ligação de PD-L1 ao PD-1, sendo que a falta de bloqueio é medida pela incapacidade do anticorpo de inibir o agrupamento de células que expressam PD-L1 e que expressam PD-1 como descrito no Exemplo 1;

b) se liga a PD-1 com uma constante de dissociação de

equilíbrio (K_D) de cerca de 5×10^{-8} M ou menos, sendo que a K_D é medida com o uso de um sistema ProteOn XPR36 a $+25^\circ\text{C}$;

c) se liga a PD-1 com uma associação constante (k_a) de cerca de 4×10^5 1/Ms ou mais, sendo que a k_a é medida com o uso de um sistema de ProteOn XPR36 C a $+25^\circ\text{C}$;

d) se liga a PD-1 com uma constante de dissociação de cerca de 1×10 (seringa k_d) $^{-2}$ 1/s ou menos, sendo que a seringa k_d é medida usando um sistema de ProteOn XPR36 C a $+25^\circ\text{C}$; ou

e) inibe a proliferação de células T específicas de antígeno; sendo que a proliferação é avaliada em um ensaio de CMV-PBMC como descrito no Exemplo 1.

46. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 44 ou 45, caracterizado pelo fato de:

a) um framework da região variável de cadeia pesada (VH) derivado de IGHV1-2*02 (SEQ ID N°: 127);

b) um framework da região variável de cadeia leve (VL) derivado de IGKV1D-16*1 (SEQ ID N°: 128); ou

c) e o framework da VL derivado de IGHV1-2*02 (SEQ ID N°: 127) e o framework da VL derivado de IGKV1D-16*1 (SEQ ID N°: 128).

47. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 46, caracterizado pelo fato de compreender a HCDR2 das SEQ ID N°s: 33, 34, 35, 36, 37, 38 ou 39.

48. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 47, caracterizado pelo fato de compreender a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das

a) SEQ ID N°s: 32, 33, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

- b) SEQ ID N^{os}: 32, 34, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;
- c) SEQ ID N^{os}: 32, 35, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;
- d) SEQ ID N^{os}: 32, 36, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;
- e) SEQ ID N^{os}: 32, 37, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;
- f) SEQ ID N^{os}: 32, 38, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

ou

- g) SEQ ID N^{os}: 32, 39, 40, 41, 42 e 43, respectivamente.

49. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 48, caracterizado pelo fato de compreender

- a) uma região variável de cadeia pesada (VH) da SEQ ID N^o: 120;
- b) uma região variável de cadeia leve (VL) da SEQ ID N^o: 121; ou
- c) a VH e a VL das SEQ ID N^{os}: 120 e 121, respectivamente.

50. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 49, caracterizado pelo fato de compreender:

- a) a VH das SEQ ID N^{os}: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51;
- b) a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62;
- c) a VH das SEQ ID N^{os}: 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51 e a VL das SEQ ID N^{os}: 60, 61 ou 62;
- d) a VH da SEQ ID N^o: 44 e a VL da SEQ ID N^o: 60;
- e) a VH da SEQ ID N^o: 45 e a VL da SEQ ID N^o: 61;
- f) a VH da SEQ ID N^o: 45 e a VL da SEQ ID N^o: 62;
- g) a VH da SEQ ID N^o: 46 e a VL da SEQ ID N^o: 61;
- h) a VH da SEQ ID N^o: 47 e a VL da SEQ ID N^o: 61;
- i) a VH da SEQ ID N^o: 48 e a VL da SEQ ID N^o: 61;
- j) a VH da SEQ ID N^o: 49 e a VL da SEQ ID N^o: 61;

k) a VH da SEQ ID N°: 50 e a VL da SEQ ID N°: 61; ou

l) a VH da SEQ ID N°: 51 e a VL da SEQ ID N°: 61.

51. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo competir pela ligação a PD-1 com o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido na reivindicação 50.

52. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: SEQ ID N°s: 32, 33, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VL das SEQ ID N°s: 44 ou 45 e a VL das SEQ ID N°s: 60, 61 ou 62; e/ou

c) a HC das SEQ ID N°s: 66 ou 67 e a LC das SEQ ID N°s: 82, 83 ou 84.

53. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 32, 34, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 46 e a VL da SEQ ID N°: 61; e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 68 e a LC da SEQ ID N°: 83.

54. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 32, 35, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 47 e a VL da SEQ ID N°: 61; e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 69 e a LC da SEQ ID N°: 83.

55. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 32, 36, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 48 e a VL da SEQ ID N°: 61; e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 70 e a LC da SEQ ID N°: 83.

56. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 32, 37, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 49 e a VL da SEQ ID N°: 61; e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 71 e a LC da SEQ ID N°: 83.

57. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 32, 38, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 50 e a VL da SEQ ID N°: 61; e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 72 e a LC da SEQ ID N°: 83.

58. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender

a) a HCDR1, a HCDR2, a HCDR3, a LCDR1, a LCDR2 e a LCDR3 das SEQ ID N°s: 32, 39, 40, 41, 42 e 43, respectivamente;

b) a VH da SEQ ID N°: 51 e a VL da SEQ ID N°: 61; e/ou

c) a HC da SEQ ID N°: 73 e a LC da SEQ ID N°: 83.

59. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do

mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 58, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser um agonista de PD-1 ou por mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam PD-1, ou ambos.

60. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de as células que expressam PD-1 serem células T de memória ativada, células T auxiliares foliculares (T_{FH}) ou células auxiliares periféricas (T_{PH}), ou qualquer combinação das mesmas.

61. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 60, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser um isotipo IgG1, um isotipo IgG2, e um isotipo IgG3 ou um isotipo IgG4.

62. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende ao menos uma mutação no anticorpo Fc que modula a ligação do anticorpo a um receptor Fc (FcR).

63. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de a ao menos uma mutação ser:

- a) uma mutação S267E;
- b) uma mutação S267D;
- c) uma mutação S267E/I332E;
- d) uma mutação S267E/L328F;
- e) uma mutação G236D/S267E;
- f) uma mutação P238D; ou
- g) uma mutação P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R.

64. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 50, caracterizado pelo fato de o anticorpo compreender:

- a) uma cadeia pesada (HC) das SEQ ID N^{os}: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73;
- b) uma cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84;
- c) a HC das SEQ ID N^{os}: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73 e a LC das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84;
- d) a HC da SEQ ID N^o: 66 e a LC da SEQ ID N^o: 82;
 - i) a HC da SEQ ID N^o: 67 e a LC da SEQ ID N^o: 83;
- e) a HC da SEQ ID N^o: 67 e a LC da SEQ ID N^o: 84;
- f) a HC da SEQ ID N^o: 68 e a LC da SEQ ID N^o: 83;
- g) a HC da SEQ ID N^o: 69 e a LC da SEQ ID N^o: 83;
- h) a HC da SEQ ID N^o: 70 e a LC da SEQ ID N^o: 83;
- i) a HC da SEQ ID N^o: 71 e a LC da SEQ ID N^o: 83;
- j) a HC da SEQ ID N^o: 72 e a LC da SEQ ID N^o: 83; ou
- k) a HC da SEQ ID N^o: 73 e a LC da SEQ ID N^o: 83.

65. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a PD-1, caracterizado pelo fato de a VH do anticorpo e a VL do anticorpo ou a HC do anticorpo e a LC do anticorpo serem codificadas por um polinucleotídeo que compreende a sequência de polinucleotídeo de:

- a) SEQ ID N^{os}: 52 e 63, respectivamente;
- b) SEQ ID N^{os}: 53 e 64, respectivamente;
- c) SEQ ID N^{os}: 53 e 65, respectivamente;
- d) SEQ ID N^{os}: 54 e 64, respectivamente;
- e) SEQ ID N^{os}: 55 e 64, respectivamente;
- f) SEQ ID N^{os}: 56 e 64, respectivamente;
- g) SEQ ID N^{os}: 57 e 64, respectivamente;

- h) SEQ ID N^{os}: 58 e 64, respectivamente;
- i) SEQ ID N^{os}: 59 e 64, respectivamente;
- j) SEQ ID N^{os}: 74 e 85, respectivamente;
- k) SEQ ID N^{os}: 75 e 86, respectivamente;
- l) SEQ ID N^{os}: 75 e 87, respectivamente;
- m) SEQ ID N^{os}: 76 e 86, respectivamente;
- n) SEQ ID N^{os}: 77 e 86, respectivamente;
- o) SEQ ID N^{os}: 78 e 86, respectivamente;
- p) SEQ ID N^{os}: 79 e 86, respectivamente;
- q) SEQ ID N^{os}: 80 e 86, respectivamente;
- r) SEQ ID N^{os}: 81 e 86, respectivamente;
- s) SEQ ID N^{os}: 136 e 137, respectivamente; ou
- t) SEQ ID N^{os}: 138 e 139, respectivamente.

66. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 65, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ter uma estrutura de glicano biantenária com um teor de fucose de cerca de entre 1% e cerca de 15%.

67. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de

- a) codificar a VH das SEQ ID N^{os}: 120, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51;
- b) codificar a VL das SEQ ID N^{os}: 121, 60, 61 ou 62;
- c) codificar a VH das SEQ ID N^{os}: 120, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 ou 51, e a VL das SEQ ID N^{os}: 121, 60, 61 ou 62;
- d) codificar a HC das SEQ ID N^{os}: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73;
- e) codificar a LC das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84;
- f) codificar a HC das SEQ ID N^{os}: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73 e a LC das SEQ ID N^{os}: 82, 83 ou 84; ou
- g) compreender a sequência de polinucleotídeo das SEQ

ID N^{os}: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 85, 86, 87, 136, 137, 138 ou 139.

68. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender ao menos um polinucleotídeo como definido na reivindicação 67.

69. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender o vetor como definido na reivindicação 68.

70. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de a célula hospedeira ser uma célula eucariótica, uma célula procariótica, uma célula CHO, uma célula HEK293 ou um hibridoma.

71. Método de produção de um anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 44, caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula hospedeira, como definido na reivindicação 69, em condições nas quais o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é expresso, e isolar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

72. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 44 a 66.

73. Kit, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 44 a 66.

74. Método de supressão da ativação de uma célula T que expressa PD-1 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 44 a 46, por um tempo suficiente para suprimir a ativação da célula T que expressa PD-1.

75. Método, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de a célula T que expressa PD-1 ser uma célula T CD4⁺

específica de antígeno e/ou uma célula T CD8⁺ específica de antígeno.

76. Método de modulação negativa de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 44 a 66, para modular negativamente a resposta imunológica.

77. Método de tratamento de um distúrbio imunológico, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 44 a 66, para tratar o distúrbio imunológico.

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de o distúrbio imunológico ser lúpus, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, artrite, artrite reumatoide, asma, DPOC, doença inflamatória pélvica, doença de Alzheimer, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença de Peyronie, doença celíaca, doença da vesícula biliar, doença pilonidal, peritonite, psoríase, artrite psoriática, vasculite, adesões cirúrgicas, acidente vascular cerebral, diabetes tipo I, doença de Lyme, meningoencefalite, uveíte autoimune, esclerose múltipla, síndrome de Guillain de Barr, dermatite atópica, hepatite autoimune, fibrosante alveolite, doença de Grave, nefropatia IgA, púrpura trombocitopênica idiopática, doença de Ménière, pênfigo, cirrose biliar primária, sarcoidose, esclerodermia, granulomatose de Wegener, outras doenças autoimunes, pancreatite, traumas (cirurgia), doença de enxerto versus hospedeiro, rejeição de transplante, doença cardíaca incluindo doenças isquêmicas como enfarte do miocárdio bem como aterosclerose, coagulação intravascular, reabsorção óssea, osteoporose, osteoartrite, periodontite

e hipocloridria, infertilidade relacionada com a falta de tolerância materna ao feto, síndrome de Sjogren, vitiligo, miastenia gravis ou esclerose sistêmica.

79. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 78, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser administrado em combinação com um segundo agente terapêutico.

80. Anticorpo anti-idiotípico caracterizado pelo fato de se ligar ao anticorpo ou ao fragmento de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 52 a 58.

81. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 44 a 66, conjugado a um agente de imageamento ou a um agente citotóxico.

82. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento que se liga ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada 1 (HCDR1), uma HCDR2, uma HCDR3, uma região determinante de complementaridade de cadeia leve 1 (LCDR1), uma LCDR2 e uma LCDR3 das SEQ ID N^{os}: 88, 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente.

83. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 82, pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo caracterizada não bloquear a ligação de PD L1 a PD-1, sendo que a falta de bloqueio é medida pela incapacidade do anticorpo de inibir o agrupamento de células que expressam PD-L1 e que expressam PD-1, como descrito no Exemplo 1.

84. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de:

a) um framework da região variável de cadeia pesada

(VH) derivado de IGHV2-5*04 (SEQ ID N°: 129);

b) um framework da região variável de cadeia leve (VL) derivado de IGKV2-28*01 (SEQ ID N°: 130); ou

c) o framework da VH derivado de IGHV2-5*04 (SEQ ID N°: 129 e o framework da VL derivado de IGKV2-28*01 (SEQ ID N°: 130).

85. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 84, caracterizado pelo fato de compreender

a) uma região variável de cadeia pesada (VH) da SEQ ID N°: 122;

b) uma região variável de cadeia leve (VL) da SEQ ID N°: 123; ou

c) a VH e a VL das SEQ ID N°s: 122 e 123, respectivamente.

86. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 85, caracterizado pelo fato de compreender

a) a VH das SEQ ID N°s: 94 ou 95;

b) a VL das SEQ ID N°s: 98, 99 ou 100;

c) a VH das SEQ ID N°s: 94 ou 95 e a VL das SEQ ID N°s: 98, 99 ou 100;

d) a VH da SEQ ID N°: 94 e a VL da SEQ ID N°: 98;

e) a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 99; ou

f) a VH da SEQ ID N°: 95 e a VL da SEQ ID N°: 100.

87. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de o anticorpo competir pela ligação a PD-1 com o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido na reivindicação 86.

88. Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 82 a 87, caracterizado pelo fato de o anticorpo ser um anticorpo agonístico ou por mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam PD-1, ou ambos.

89. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de as células que expressam PD-1 serem células T de memória ativada, células T auxiliares foliculares (T_{FH}) ou células auxiliares periféricas (T_{PH}), ou qualquer combinação das mesmas.

90. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 89, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser um isotipo IgG1, um isotipo IgG2, e um isotipo IgG3 ou um isotipo IgG4.

91. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 90, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreender ao menos uma mutação no anticorpo Fc que modula a ligação do anticorpo a um receptor Fc.

92. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de a ao menos uma mutação ser:

- a) uma mutação S267E;
- b) uma mutação S267D;
- c) uma mutação S267E/I332E;
- d) uma mutação S267E/L328F;
- e) uma mutação G236D/S267E;
- f) uma mutação P238D; ou
- g) uma mutação P238D/E233D/G237D/H268D/P271G/A330R.

93. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 92, caracterizado pelo fato de compreender

- a) uma cadeia pesada (HC) das SEQ ID N^{os}: 104 ou 105;
- b) uma cadeia leve (LC) das SEQ ID N^{os}: 108, 109 ou 110;
- c) a HC das SEQ ID N^{os}: 104 ou 105 e a LC das SEQ ID N^{os}: 108, 109 ou 110;
- d) a HC da SEQ ID N^o: 104 e a LC da SEQ ID N^o: 108;
- e) a HC da SEQ ID N^o: 105 e a LC da SEQ ID N^o: 109; ou
- f) a HC da SEQ ID N^o: 105 e a LC da SEQ ID N^o: 110.

94. Anticorpo isolado que se liga especificamente a PD-1 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de a VH do anticorpo e a VL do anticorpo ou a HC do anticorpo e a LC do anticorpo serem codificadas por um polinucleotídeo que compreende a sequência de polinucleotídeo de:

- a) SEQ ID N^{os}: 96 e 101, respectivamente;
- b) SEQ ID N^{os}: 97 e 102, respectivamente;
- c) SEQ ID N^{os}: 97 e 103, respectivamente;
- d) SEQ ID N^{os}: 106 e 111, respectivamente;
- e) SEQ ID N^{os}: 107 e 112, respectivamente; ou
- f) SEQ ID N^{os}: 107 e 113, respectivamente.

95. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82 a 94, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ter uma estrutura de glicano biantenária com um teor de fucose de cerca de entre 1% e cerca de 15%.

96. Polinucleotídeo caracterizado pelo fato de

- a) codificar a VH das SEQ ID N^{os}: 122, 94 ou 95;
- b) codificar a VL das SEQ ID N^{os}: 123, 98, 99 ou 100;

c) codificar a VH das SEQ ID N^{os}: 122, 94 ou 95 e a VL das SEQ ID N^{os}: 123, 98, 99 ou 100;

d) codificar a HC das SEQ ID N^{os}: 104 ou 105;

e) codificar a LC das SEQ ID N^{os}: 108, 109 ou 110;

f) codificar a HC das SEQ ID N^{os}: 104 ou 105 e a LC das SEQ ID N^{os}: 108, 109 ou 110; ou

g) compreender a sequência de polinucleotídeo das SEQ ID N^{os}: 96, 97, 101, 102, 103, 106, 107, 111, 112 ou 113.

97. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender ao menos um polinucleotídeo como definido na reivindicação 96.

98. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de compreender o vetor como definido na reivindicação 97.

99. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 98, caracterizada pelo fato de a célula hospedeira ser uma célula eucariótica, uma célula procariótica, uma célula CHO, uma célula HEK293 ou um hibridoma.

100. Método de produção do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com as reivindicações 82 a 95, caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula hospedeira, como definido na reivindicação 98, em condições nas quais o anticorpo é expresso, e isolar o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

101. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 95.

102. Kit, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 95.

103. Método de supressão da ativação de uma célula T que expressa PD-1 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreen-

der administrar ao indivíduo o anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 95, por um tempo suficiente para suprimir a ativação da célula T que expressa PD-1.

104. Método, de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de a célula T que expressa PD-1 ser uma célula T CD4⁺ específica de antígeno e/ou uma célula T CD8⁺ específica de antígeno.

105. Método de modulação negativa de uma resposta imunológica, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 95, para modular negativamente a resposta imunológica.

106. Método de tratamento de um distúrbio imunológico, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um indivíduo que precisa do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo isolado ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 95, para tratar o distúrbio imunológico.

107. Método, de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de o distúrbio imunológico ser lúpus, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjogren, artrite, artrite reumatoide, asma, DPOC, doença inflamatória pélvica, doença de Alzheimer, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, colite ulcerativa, doença de Peyronie, doença celíaca, doença da vesícula biliar, doença pilonidal, peritonite, psoríase, artrite psoriática, vasculite, adesões cirúrgicas, acidente vascular cerebral, diabetes tipo I, doença de Lyme, meningoencefalite, uveíte autoimune, esclerose múltipla, síndrome de Guillain de Barr, dermatite atópica, hepatite autoimune, fibrosante alveolite, doença de Grave, nefropatia IgA, púrpura trombocitopênica idiopática,

doença de Ménière, pênfigo, cirrose biliar primária, sarcoidose, esclerodermia, granulomatose de Wegener, outras doenças autoimunes, pancreatite, traumas (cirurgia), doença de enxerto versus hospedeiro, rejeição de transplante, doença cardíaca incluindo doenças isquêmicas como enfarte do miocárdio bem como aterosclerose, coagulação intravascular, reabsorção óssea, osteoporose, osteoartrite, periodontite e hipocloridria, infertilidade relacionada com a falta de tolerância materna ao feto, síndrome de Sjogren, vitiligo, miastenia gravis ou esclerose sistêmica.

108. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 103 a 177, caracterizado pelo fato de o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo ser administrado em combinação com um segundo agente terapêutico.

109. Anticorpo anti-idiotípico, caracterizado pelo fato de se ligar especificamente ao anticorpo ou ao fragmento de ligação ao antígeno como definido na reivindicação 64.

110. Imunoconjugado, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 82 a 96, conjugado a um agente de imageamento ou a um agente citotóxico.

Figura 1A.

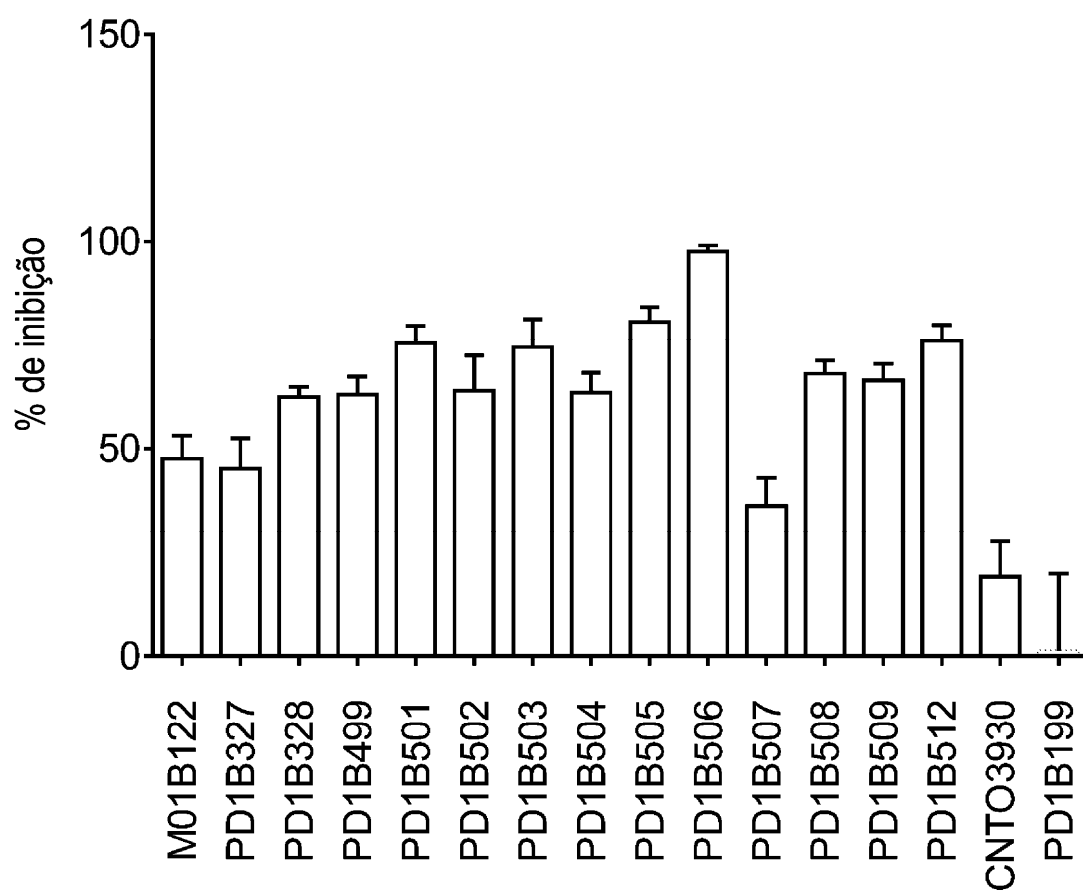


Figura 1B.

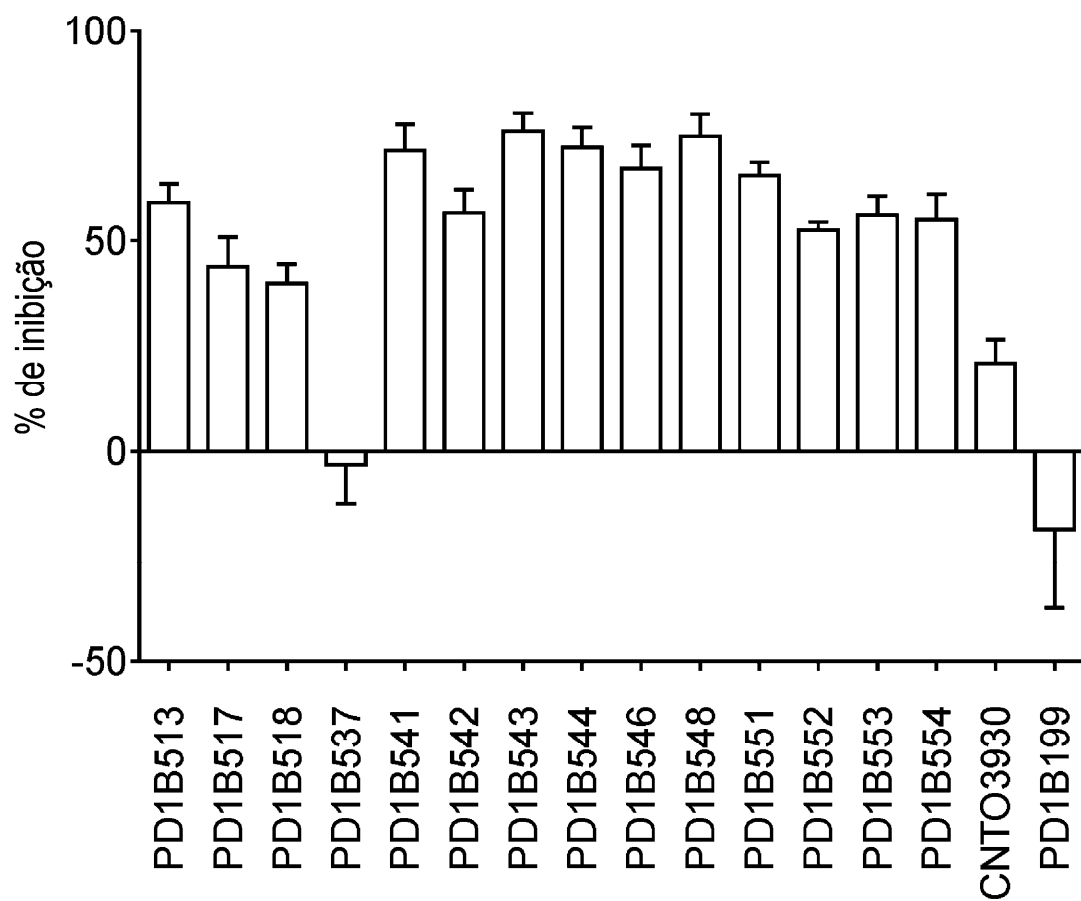


Figura 2A.

	1
PD1H93_8	DVQLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFT
PD1H384_9	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCCKASGYTFT
PD1H405_10	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCCKASGYTFT
PD1H585_140	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCCKASGYTFT
PD1H586_141	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCCKASGYTFT
PD1H587_142	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCCKASGYTFT
	:*** :*.***** :*.*****
PD1H93_8	DYSMHVVKQAPGKGLKWMGWINIETGEPTY
PD1H384_9	DYSMHVVRQAPGQGLEWMGWINIETGEPTY
PD1H405_10	DYSMHVVRQAPGQGLEWMGWINIETGEPTY
PD1H585_140	DYSMHVVRQAPGQGLEWMGWINIETGYPTY
PD1H586_141	DYSMHVVRQAPGQGLEWMGWINIETGHPTY
PD1H587_142	DYSMHVVRQAPGQGLEWMGWINIETGWPTY
	*****:*****:*.*****
PD1H93_8	ADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNE
PD1H384_9	AQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAED
PD1H405_10	AQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED
PD1H585_140	AQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED
PD1H586_141	AQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED
PD1H587_142	AQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAED
	:.***.***:*.*****.***
	121
PD1H93_8	TATYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H384_9	TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H405_10	TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H585_140	TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H586_141	TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
PD1H587_142	TAVYFCARDYYGTYFYAMDYWGQGTTLTVSS
	.**:****

Figura 2B.

	1
PD1L30_14	<u>QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVS</u>
PD1L468_15	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVS</u>
PD1L469_16	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVS</u>
PD1L651_143	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSFS</u>
PD1L652_144	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVP</u>
	:***** :* * ***.*::*****..
PD1L30_14	<u>SSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVP</u>
PD1L468_15	<u>SSYLHWYQQKPG LAPRL LIYSTSNLASGIP</u>
PD1L469_16	<u>SSYLHWYQQKPG LAPRL LIYSTSNLASGIP</u>
PD1L651_143	<u>SSYLHWYQQKPG LAPRL LIYSTSNLASGIP</u>
PD1L652_144	<u>SSYLHWYQQKPG LAPRL LIYSTSNLASGIP</u>
	***** :*: *****:*
PD1L30_14	<u>ARFSGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCH</u>
PD1L468_15	<u>DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCH</u>
PD1L469_16	<u>DRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCH</u>
PD1L651_143	<u>DRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCH</u>
PD1L652_144	<u>DRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCH</u>
	*****.:*: ***** :*.** *.****
	108
PD1L30_14	<u>QYHRSPLTFGAGTKLELK</u>
PD1L468_15	<u>QYHRSPLTFGQGTKLEIK</u>
PD1L469_16	<u>QYHRSPLTFGQGTKLEIK</u>
PD1L651_143	<u>QYHRSPLTFGQGTKLEIK</u>
PD1L652_144	<u>QYHRSPLTFGQGTKLEIK</u>
	***** *****:*

Figura 3A.

1

PD1H90	<u>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT</u>
PD1H388	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
PD1H399	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
PD1H400	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
PD1H401	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
PD1H402	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
PD1H403	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
PD1H404	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT</u>
	***** * . *** : ***** : *****

PD1H90	<u>TYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPNNGGINY</u>
PD1H388	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNGGINY</u>
PD1H399	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNAGINY</u>
PD1H400	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNDAGINY</u>
PD1H401	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNQGGINY</u>
PD1H402	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNKGGINY</u>
PD1H403	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNEGGINY</u>
PD1H404	<u>TYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPNNIGINY</u>
	***** : * ***** : ***** . ****

PD1H90	NEKFKKKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSED
PD1H388	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
PD1H399	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
PD1H400	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
PD1H401	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
PD1H402	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
PD1H403	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
PD1H404	AQKFQGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDD
	: ** : : . ***** ***** : ** * * : *

117

PD1H90	<u>SAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H388	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H399	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H400	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H401	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H402	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H403	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
PD1H404	<u>TAVYYCTIDYYDYGGYWGQGTTLTVSS</u>
	: ***** : *****

Figura 3B.

	1
PD1L28	DIVMTQSQKFMSTSVRDRVSVTCKASQNVG
PD1L470	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG
PD1L471	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG
	** ***** . :*:** *****:*****
PD1L28	TNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSQVDP
PD1L470	TNVAWYQQKPEKAPKSLIYSASYRYSQVPS
PD1L471	TNVAWYQQKPEKAPKALIYSASYRYSQVPS
	***** :*:*****.
PD1L28	RFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQ
PD1L470	RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
PD1L471	RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQ
	** :*****:.*.*:* * :***
	107
PD1L28	YNIYPYTFGSGTKLEMK
PD1L470	YNIYPYTFGQGTKLEIK
PD1L471	YNIYPYTFGQGTKLEIK
	*****.******:*

Figura 4A.

	1
PD1H81	<u>QVTLKESGPGLLQPSQTL</u> SLTCSFSGFSL
PD1H389	<u>QITLKESGPTLVKPTQTL</u> TLTCTFSGFSL
	*:***** *:*:*:*:*:*:*:*****
PD1H81	<u>TSGMGVSWIRQPSGKLEWLAHIY</u> WDDDKR
PD1H389	<u>TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIY</u> WDDDKR
	*****.**.*****
PD1H81	YNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTA
PD1H389	YSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPV
	*.*****:****.***.*.:*.:*..
	122
PD1H81	DTGTYYCVRKGYDYGYVMDYWGQGT
PD1H389	DTGTYYCVRKGYDYGYVMDYWGQGT

Figura 4B.

	1
PD1L43	<u>DIVMTQAALSNPVTLGTSASISCRSSKSLL</u>
PD1L472	<u>DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLL</u>
PD1L473	<u>DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLL</u>
	*****:.* ** * .*****
PD1L43	<u>HSNGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA</u>
PD1L472	<u>HSNGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA</u>
PD1L473	<u>HSNGITYLNWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA</u>

PD1L43	<u>SGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV</u>
PD1L472	<u>SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV</u>
PD1L473	<u>SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV</u>
	*****.******:*****
	112
PD1L43	<u>YYCAQNLELPLTFGSGTKLEMK</u>
PD1L472	<u>YYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK</u>
PD1L473	<u>YYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK</u>
	*****.**:*:*

Figura 5A.

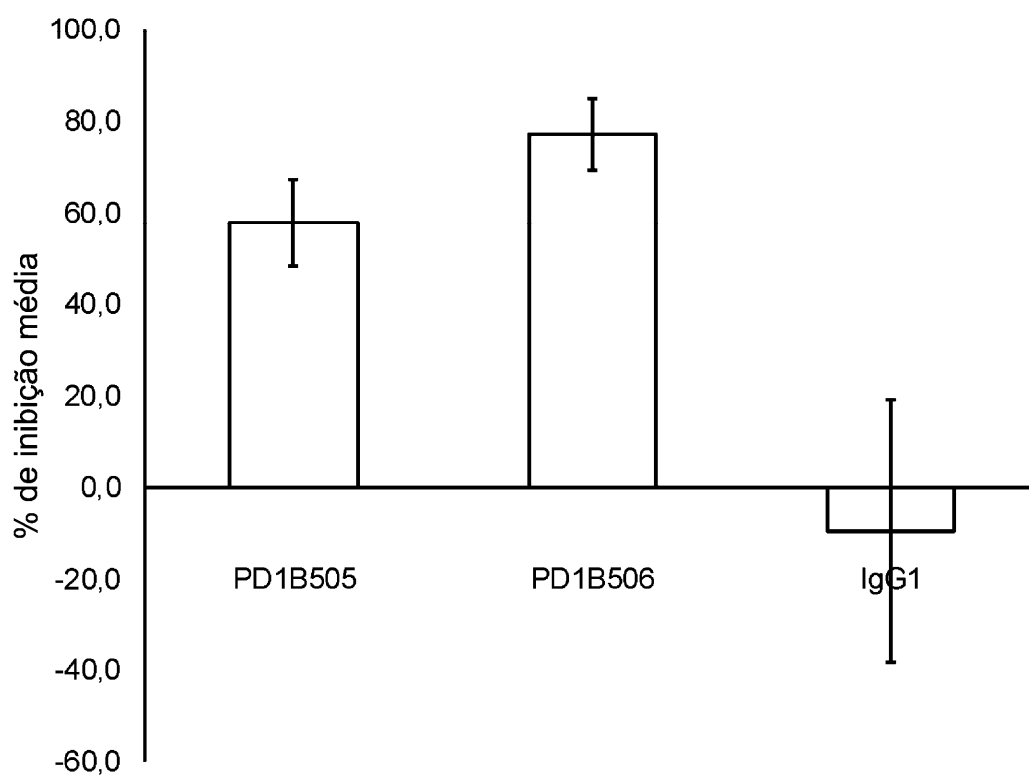


Figura 5B.

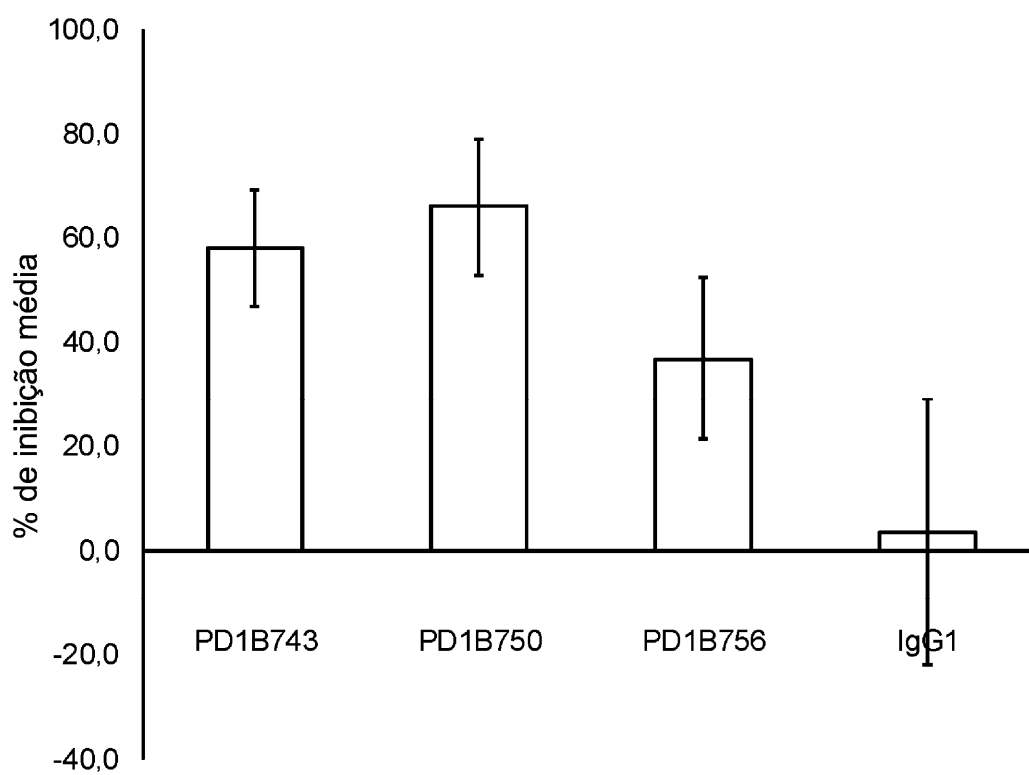


Figura 5C.

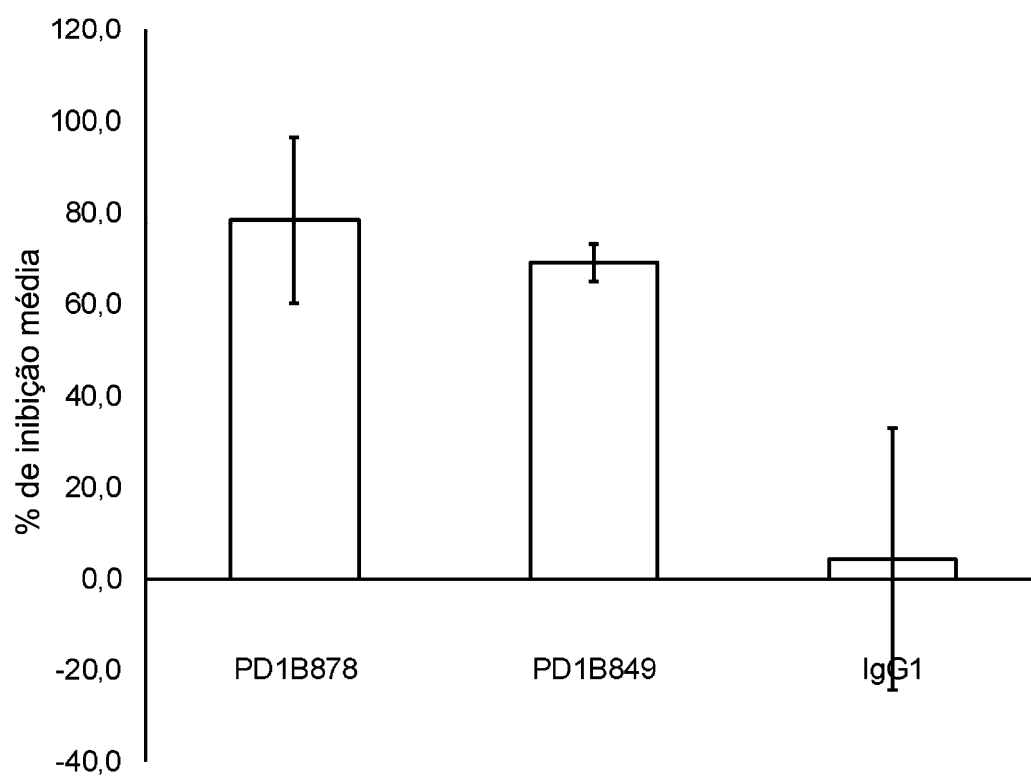


Figura 6A.

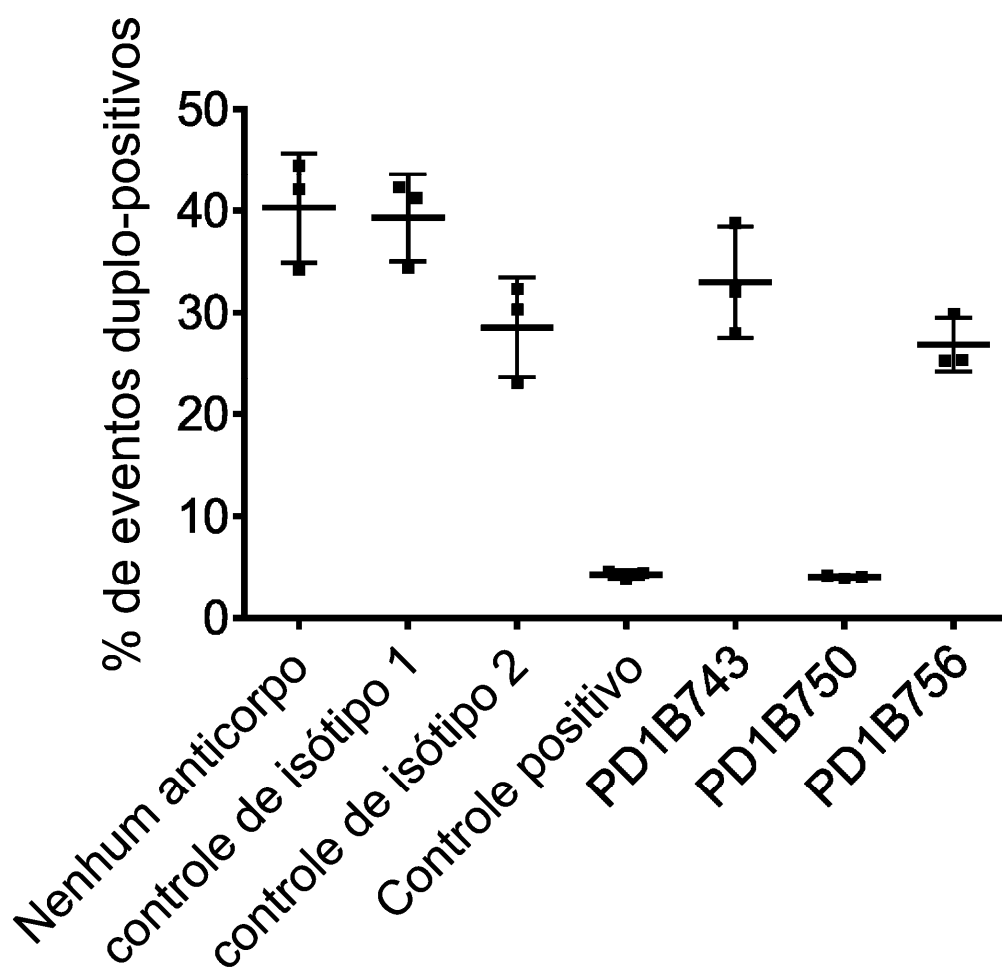


Figura 6B.

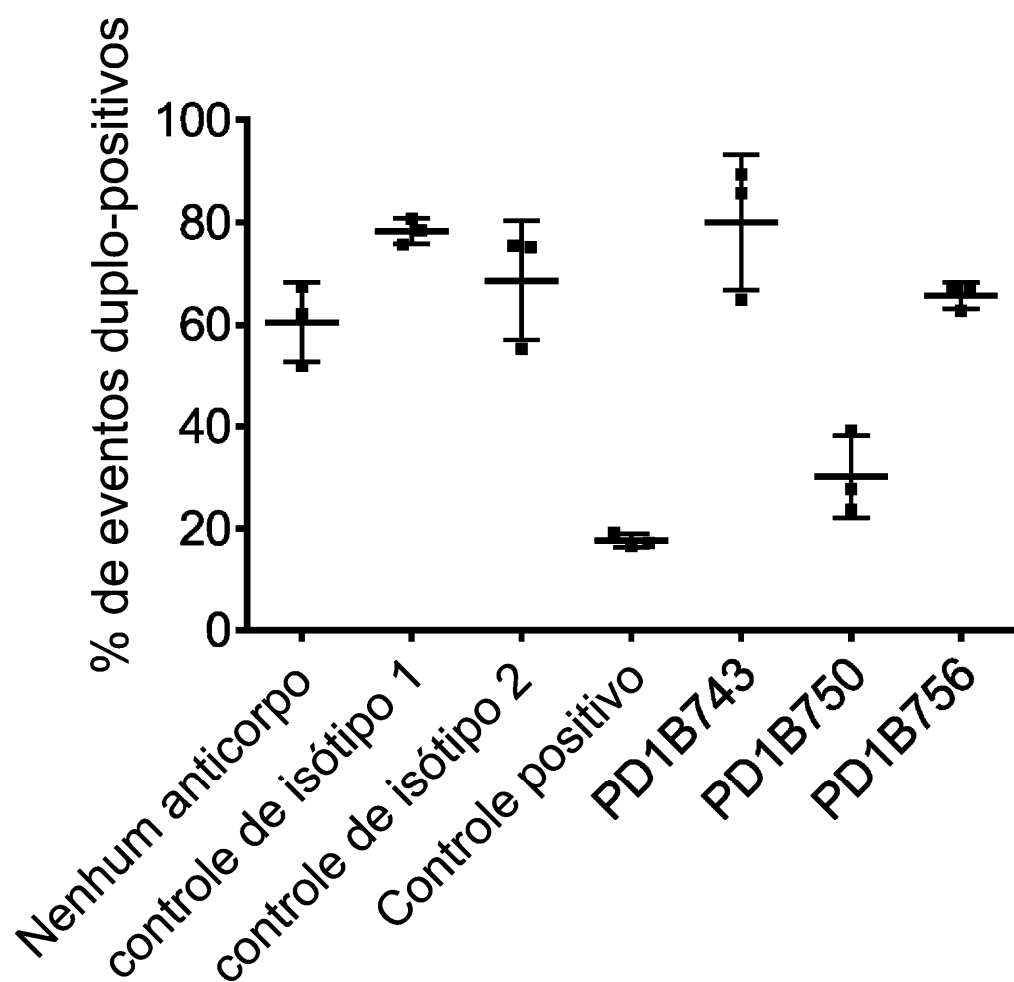


Figura 7.

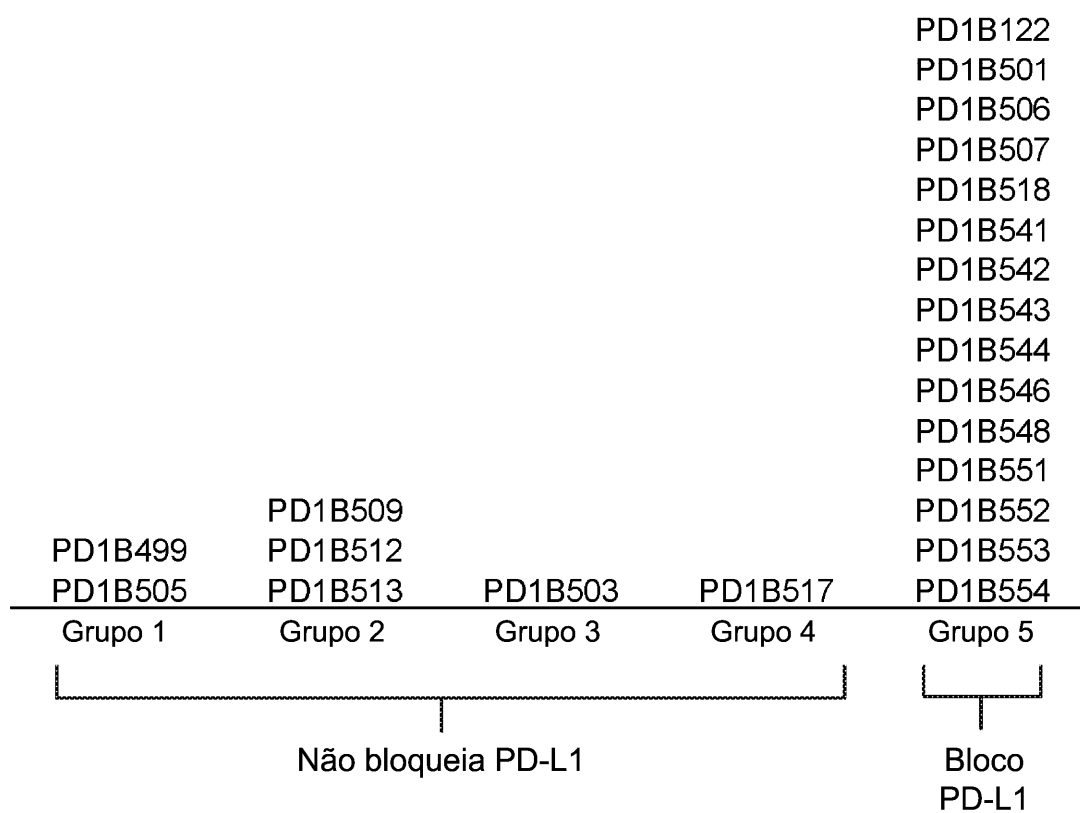


Figura 8A.

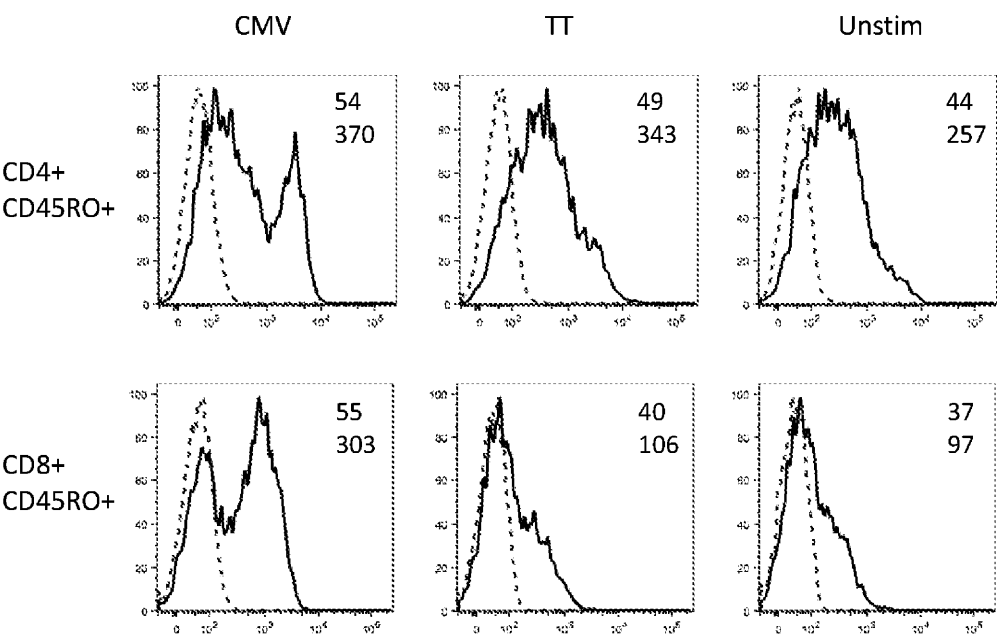


Figura 8B.

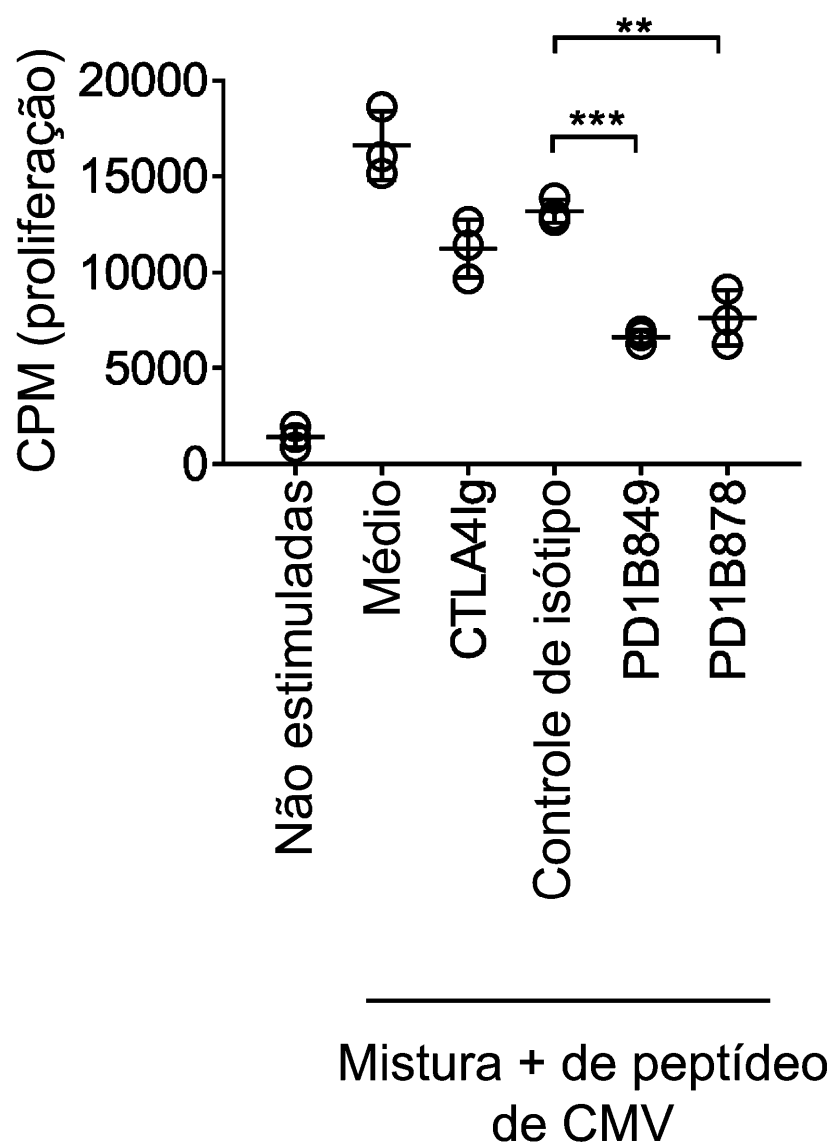


Figura 9A.

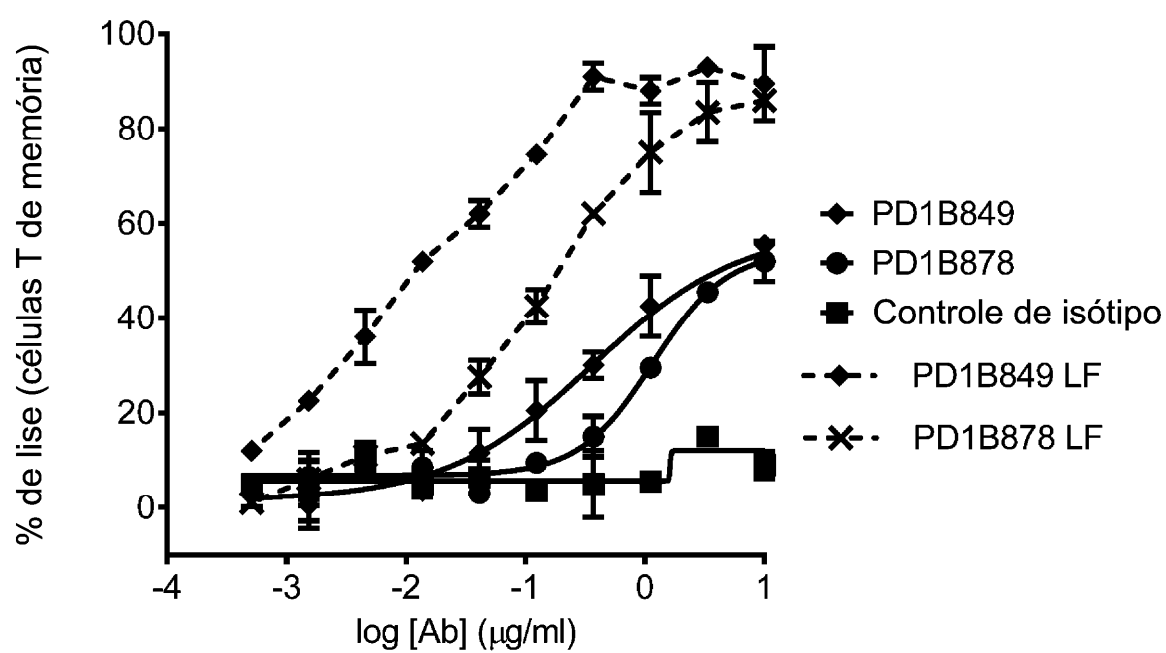


Figura 9B.

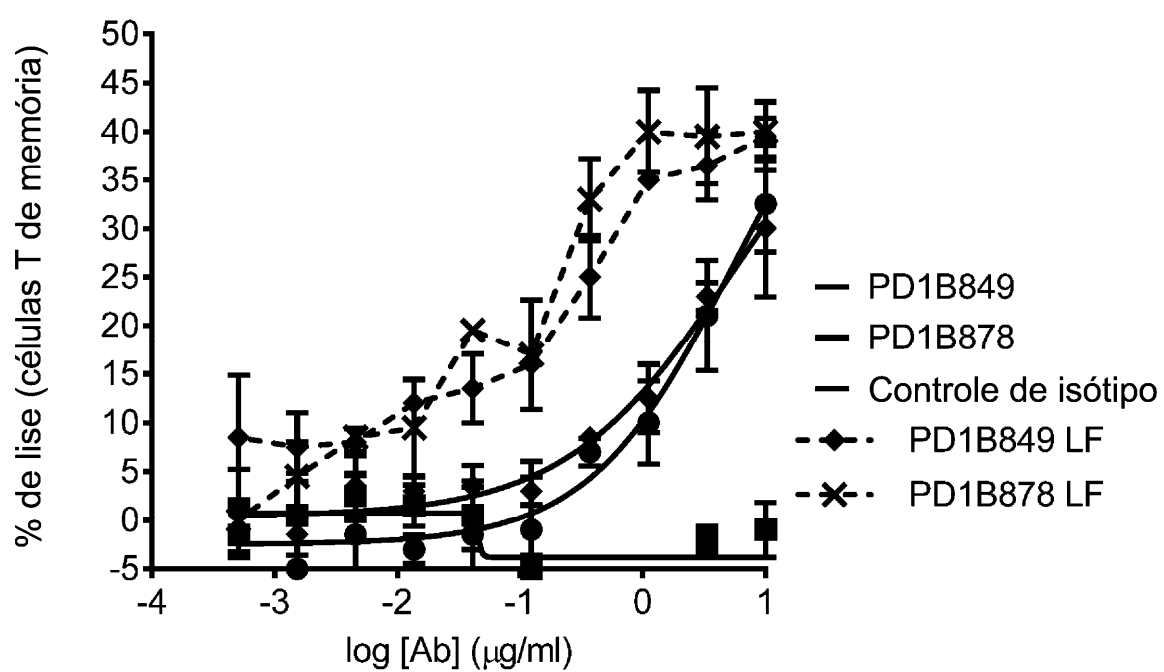


Figura 10A.

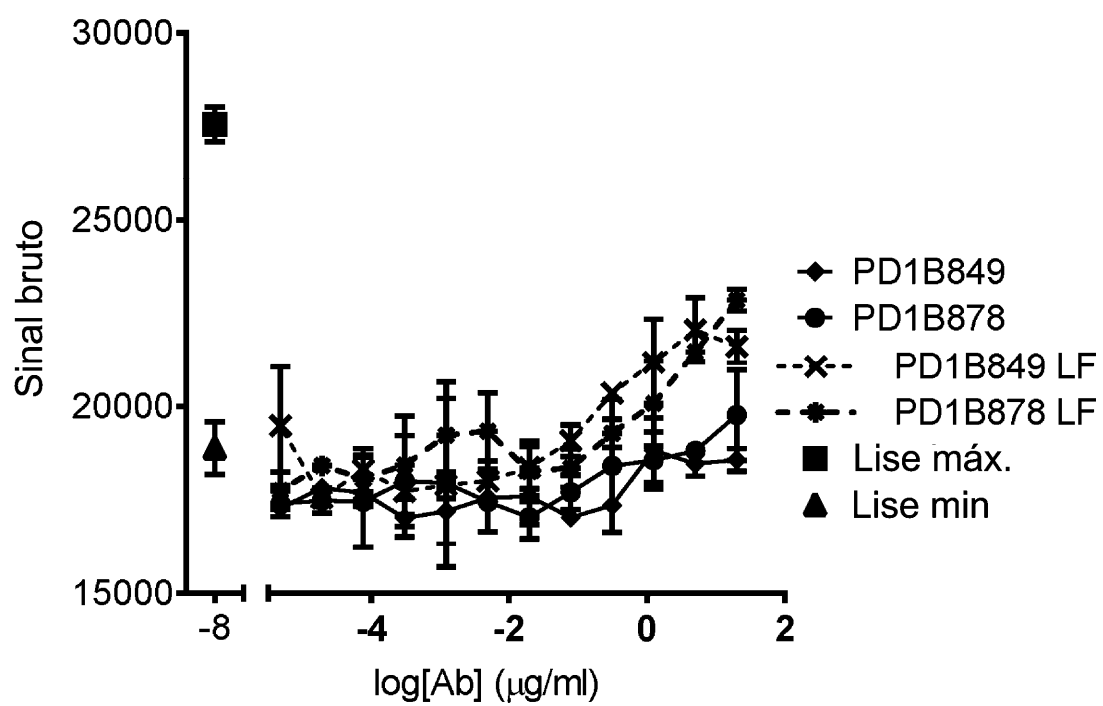


Figura 10B.

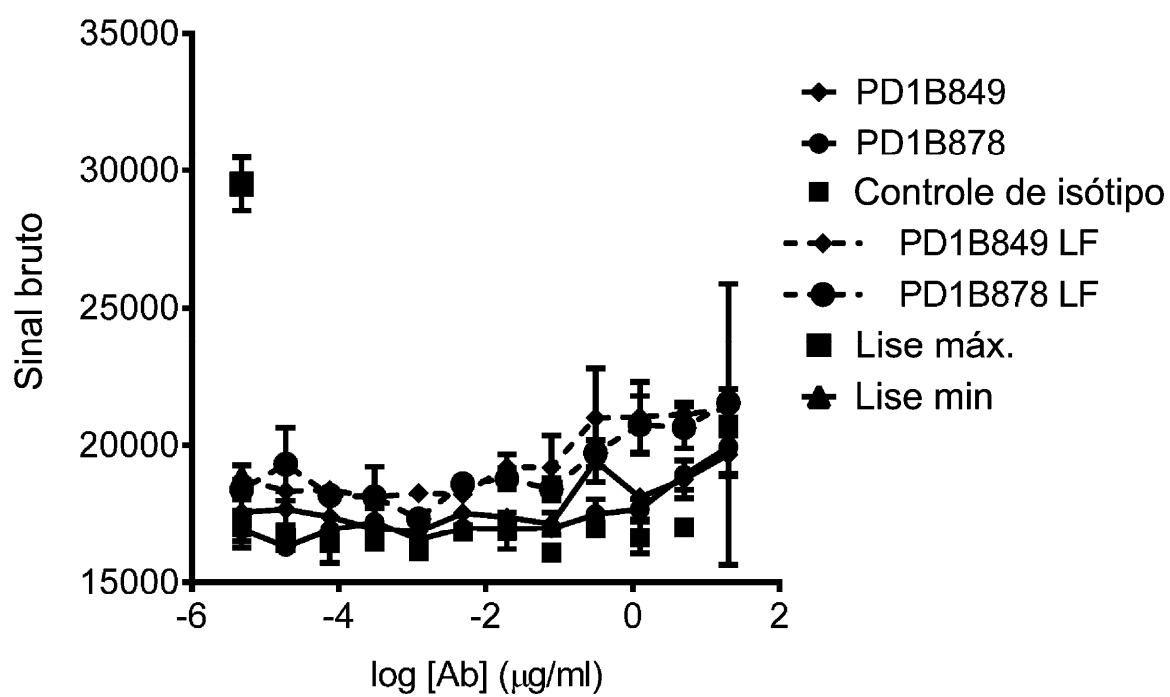


Figura 11.

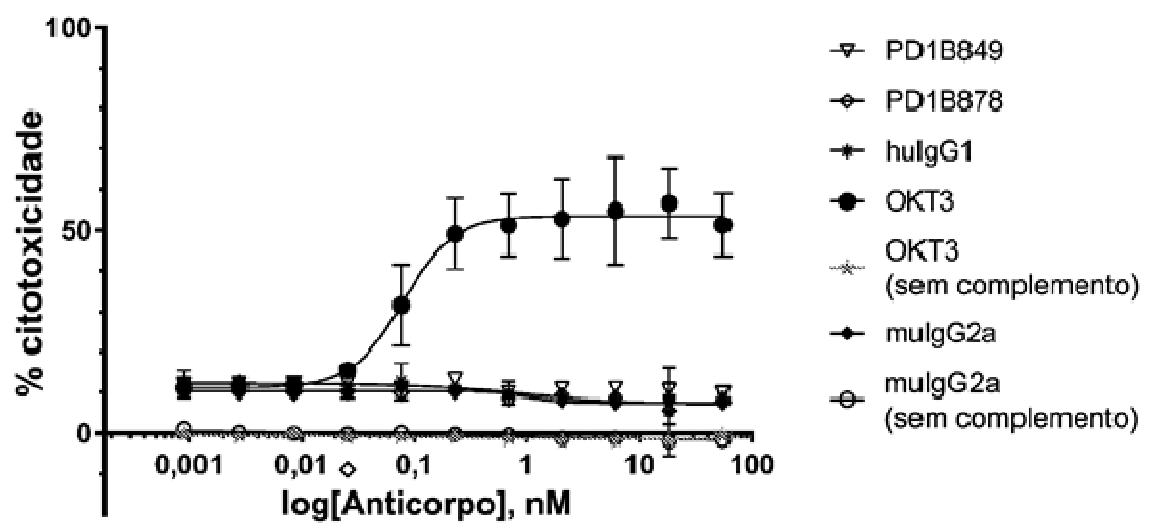


Figura 11.

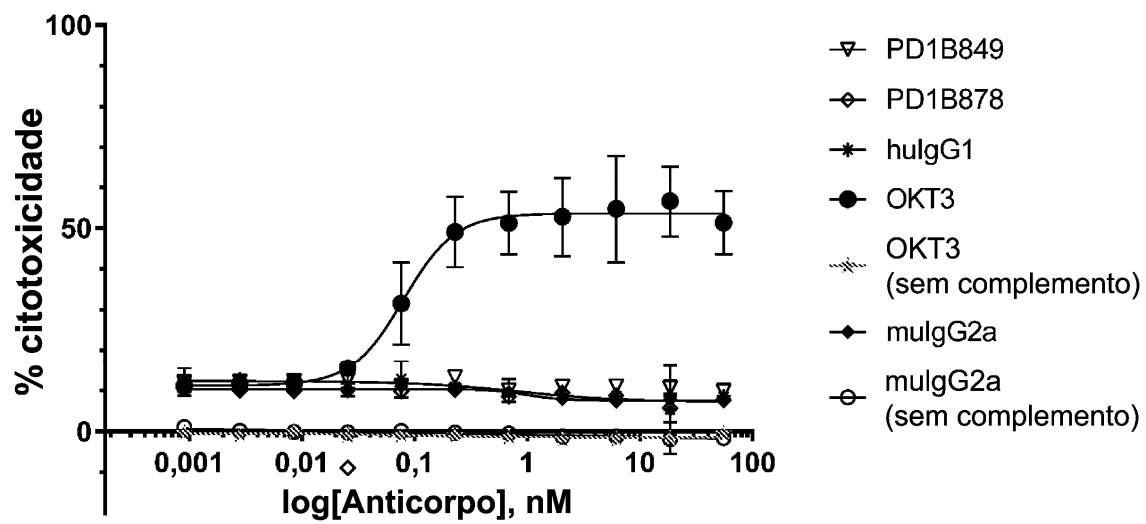


Figura 12.

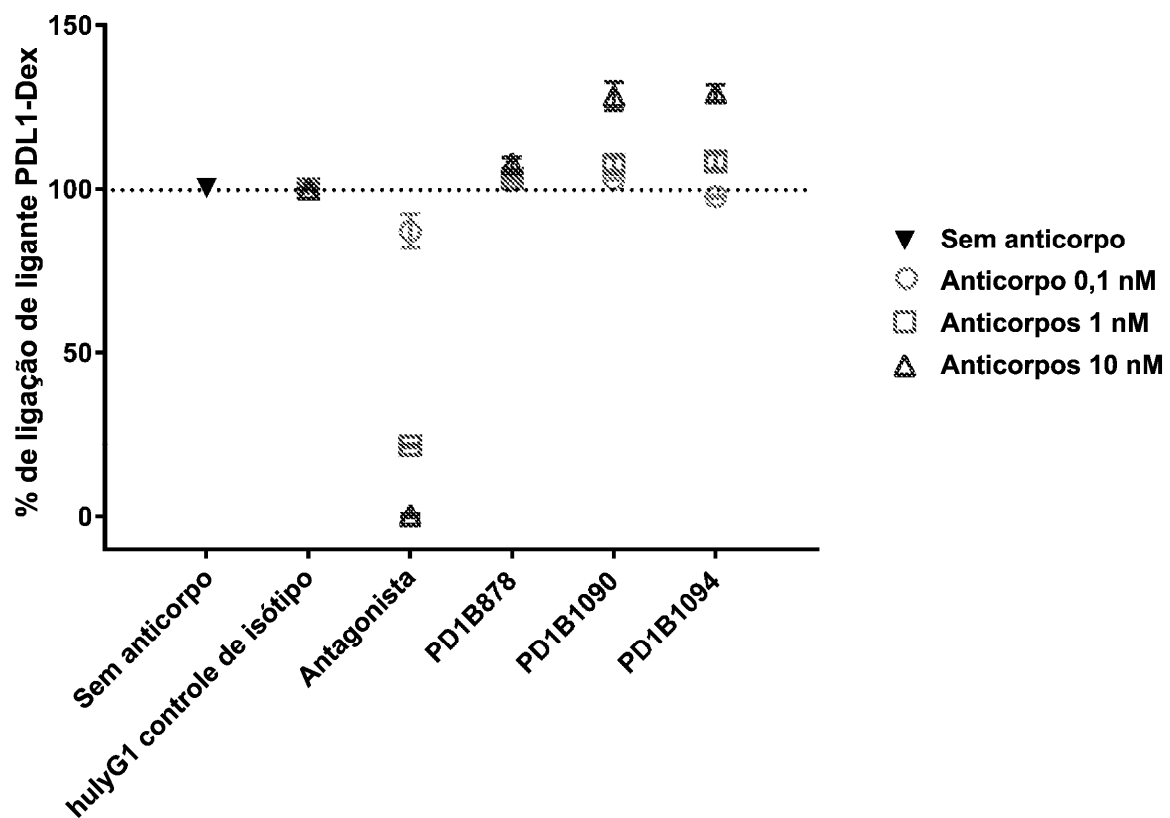


Figura 13A.

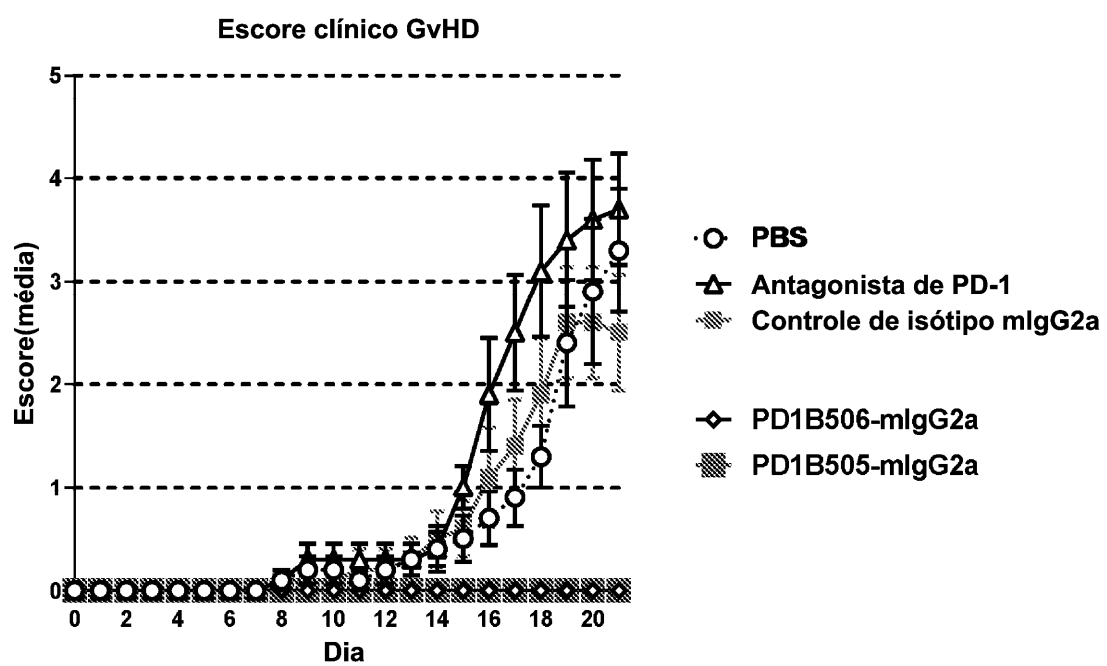


Figura 13B.

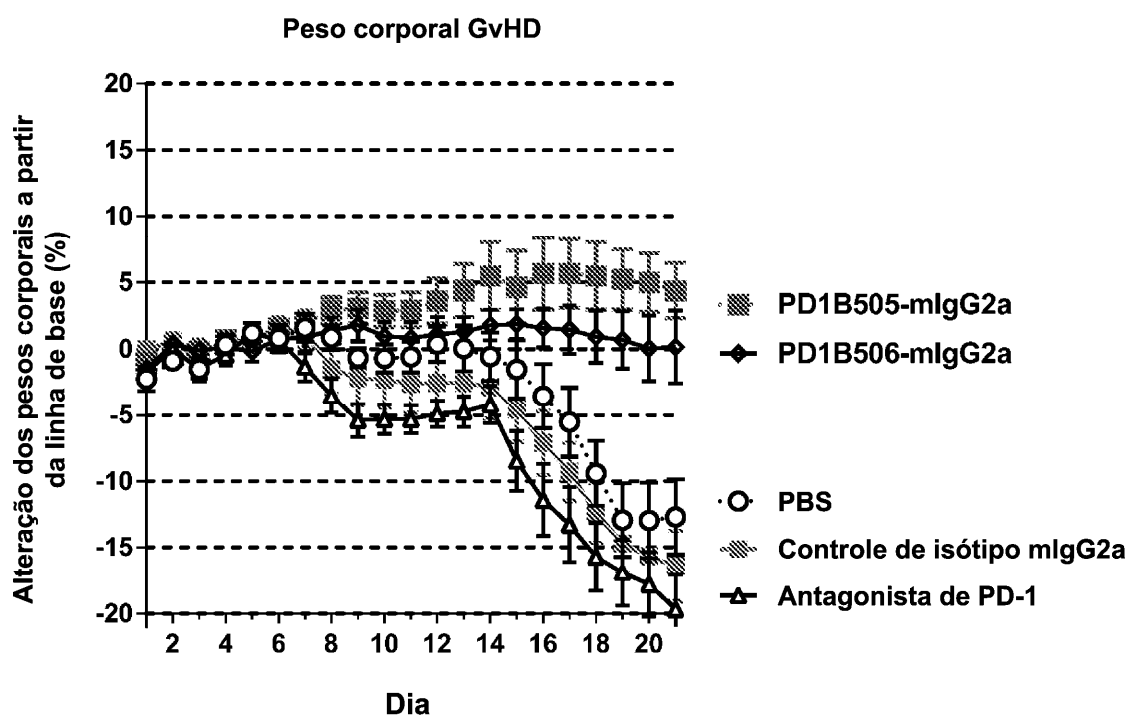


Figura 14A.

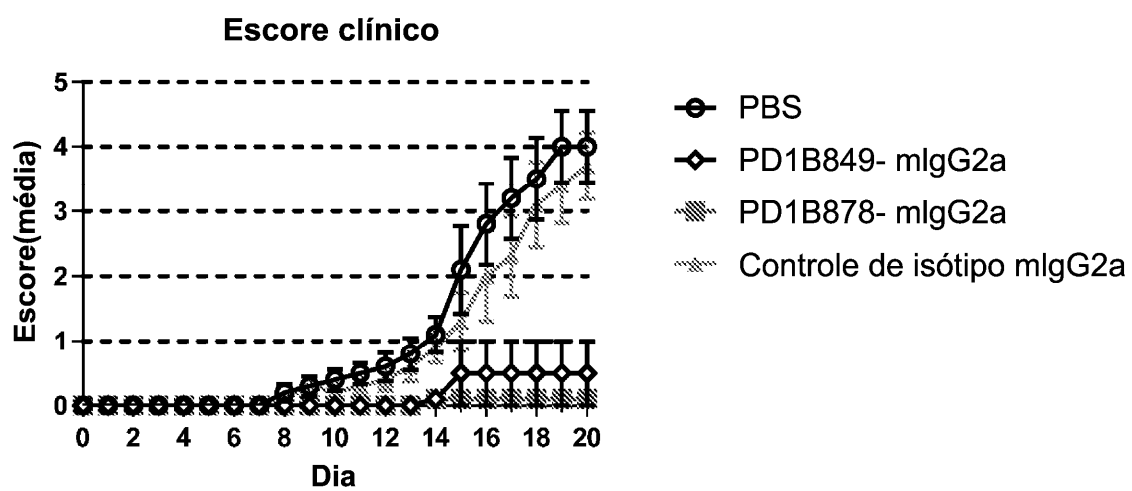


Figura 14B.

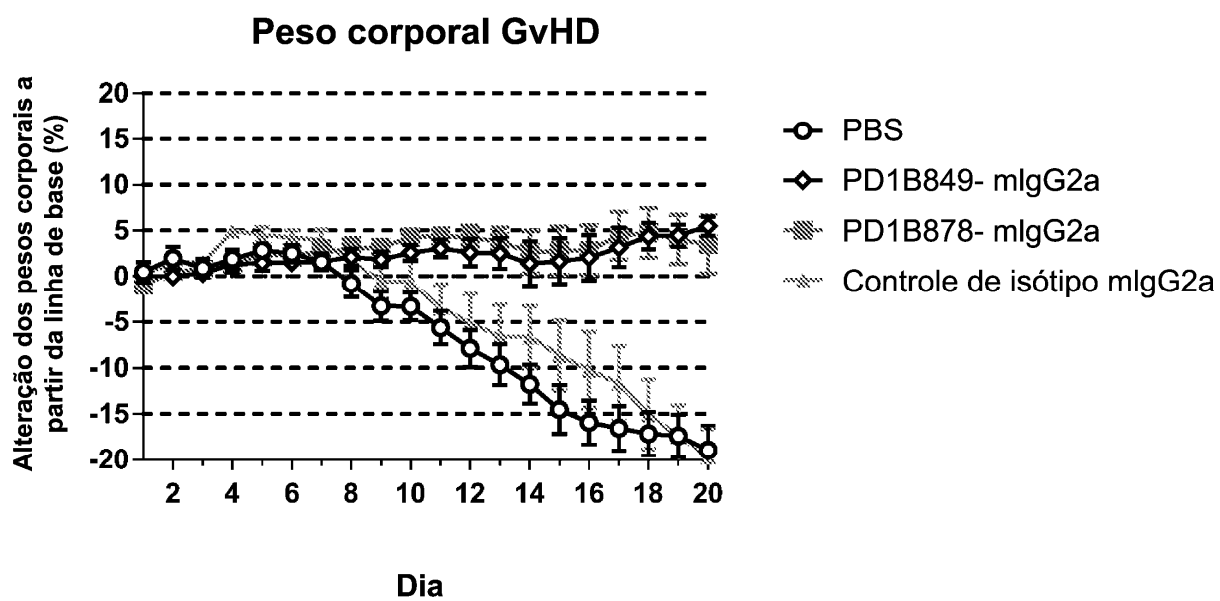


Figura 15.

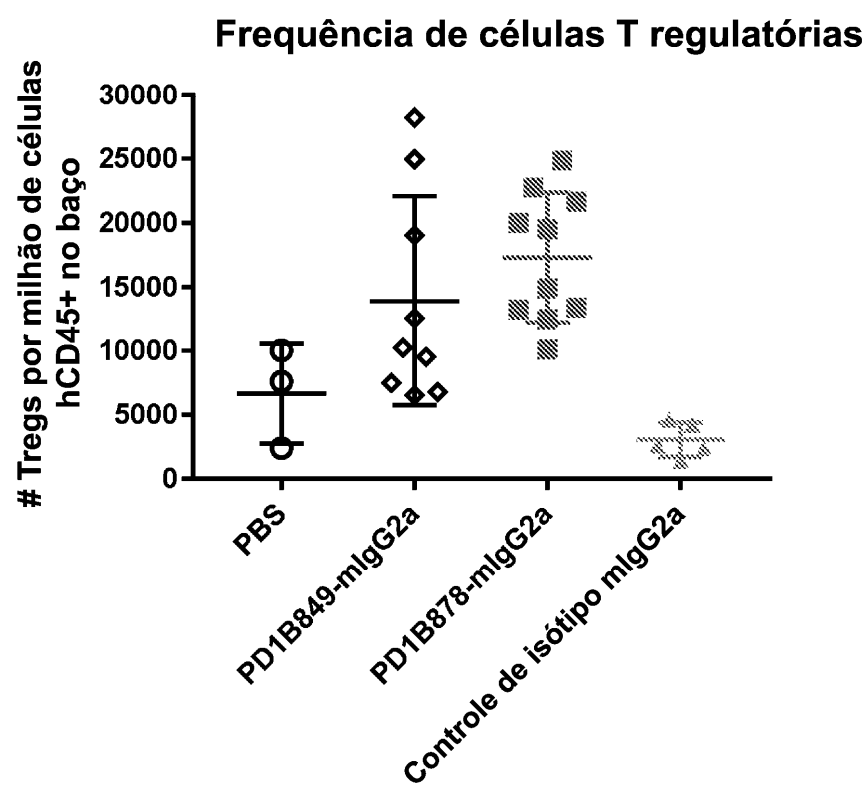
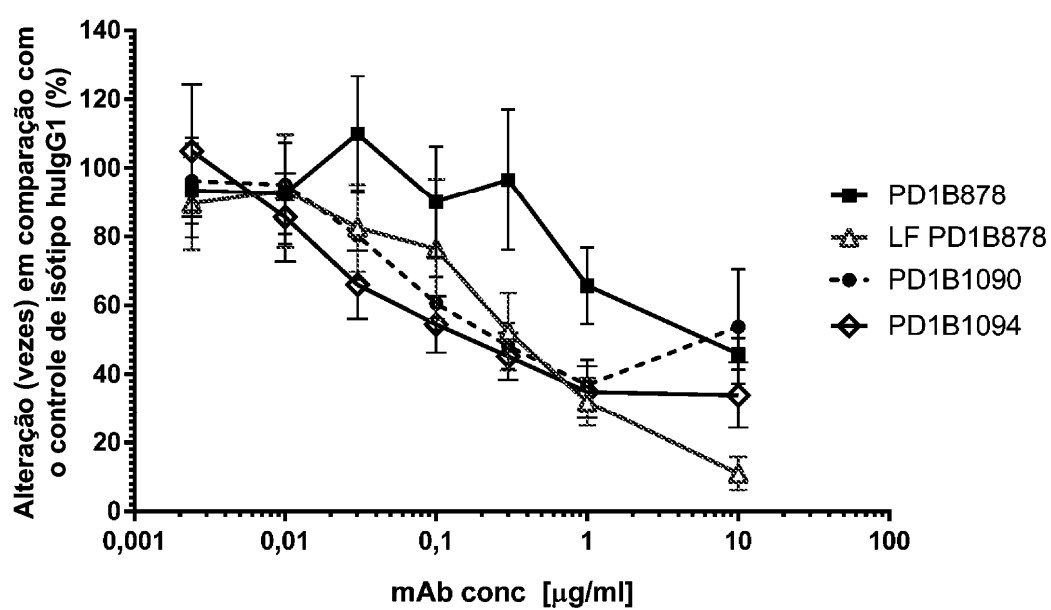


Figura 16.



RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A PD-1 E MÉTODOS DE USO"**.

A presente invenção refere-se a anticorpos que se ligam especificamente a PD-1 ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, polinucleotídeos que codificam os anticorpos ou os fragmentos, e métodos de produção e uso dos mesmos são úteis no tratamento de distúrbios inflamatórios ou imunes.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA 30 OU 60 DIAS 10.01.20
- Data de Geração do Código: 28/01/2020
- Hora de Geração do Código: 17:03:19
- Código de Controle:
 - Campo 1: F593550FDD1954EF
 - Campo 2: 226F9D468DD2BC47