República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0812913-4 B1

(22) Data do Depósito: 13/06/2008

(45) Data de Concessão: 07/08/2018

(54) Título: ANTICORPOS MONOCLONAIS OU FRAGMENTO DE ANTICORPO PARA O RECEPTOR DE MORTE PROGRAMADA HUMANO PD-1, POLINUCLEOTIDEO, MÉTODO PARA PRODUZIR OS REFERIDOS ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, COMPOSIÇÃO QUE OS COMPREENDE E USO DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/00

(30) Prioridade Unionista: 18/06/2007 US 60/944,583

(73) Titular(es): MERCK SHARP & DOHME B.V.

(72) Inventor(es): GREGORY JOHN CARVEN; HANS VAN EENENNAAM; GRADUS JOHANNES DULOS

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/12/2009

"**ANTICORPOS MONOCLONAIS OU FRAGMENTO DE ANTICORPO PARA O RECEPTOR DE MORTE PROGRAMADA HUMANO PD-1, POLINUCLEOTÍDEO, MÉTODO PARA PRODUZIR OS REFERIDOS ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE ANTICORPOS, COMPOSIÇÃO QUE OS COMPREENDE E USO DOS MESMOS**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[001] O receptor 1 de morte programada (PD-1) é um receptor imunoinibitório que é primariamente expresso sobre células T e B ativadas. Foi mostrado que a interação com seus ligantes atenua respostas de células T *in vitro* e *in vivo*. Foi mostrado que bloqueio da interação entre PD-1 e um de seus ligantes, PD-L1, intensifica a imunidade de células T $CD8^+$ tumor-específicas e pode, portanto, ser útil em eliminação de células tumorais pelo sistema imune.

[002] PD-1 (codificado pelo gene *Pdcd1*) é um membro da superfamília de imunoglobulina relacionado à CD28 e CTLA-4. Foi mostrado que o PD-1 regula negativamente a sinalização ao receptor de antígeno quando de encaixe de seu ligante (PD-L1 e/ou PD-L2). A estrutura do PD-1 de murino foi esclarecida, bem como a estrutura de cocristal de PD-1 de camundongo com PD-L1 humano L1 (Zhang, X. et al., *Immunity* 20: 337-347 (2004); Lin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3011-6 (2008)). PD-1 e membros semelhantes da família são glicoproteínas transmembrana do tipo I contendo um domínio de Ig do tipo variável (tipo V) responsável pela ligação de ligante e uma cauda citoplásmica que é responsável pela ligação de moléculas de sinalização. A cauda citoplásmica do PD-1 contém dois motivos de sinalização baseados em tirosina, um ITIM (motivo de inibição baseado em tirosina de imuno-receptor) e um ITSM (motivo de troca baseado em tirosina de imuno-receptor).

[003] Após estimulação de células T, o PD-1 recruta a fosfatase de tirosina SHP-2 ao motivo ITSM de sua cauda citoplásmica, levando à desfosforilação de moléculas efetoras, tais como CD3 zeta, PKC teta e ZAP70, que estão envolvidas

na cascata de sinalização do CD3 de células T. O mecanismo pelo qual o PD-1 submodula as respostas de células T é similar a, mas distinto daquele de CTLA-4, uma vez que ambas as moléculas regulam um conjunto sobreposto de proteínas de sinalização (Parry et al., Mol. Cell Biol. 25: 9543-9553). Bennett et al. mostraram que a inibição PD-1-mediada de sinalização de células T é eficaz apenas quando ambos os sinais de ativação e inibitório estão sobre a mesma superfície, indicando que o mecanismo de sinalização do PD-1 é espacio-temporariamente determinado (Bennett F. et al., J Immunol. 170: 711-8 (2003)).

[004] Foi mostrado que o PD-1 é expresso sobre linfócitos ativados (células T CD4+ e CD8+ periféricas, células B e monócitos) e também foi mostrado que é expresso durante desenvolvimento tímico sobre células T CD4-CD8- (duplamente negativas), bem como células NK-T.

[005] Os ligantes para PD-1 (PD-L1 e PD-L2) são constitutivamente expressos ou podem ser induzidos em uma variedade de tipos de célula, incluindo tecidos não hematopoiéticos, bem como vários tipos de tumor. PD-L1 é expresso sobre células B, T, mieloides e dendríticas (DCs), mas também sobre células periféricas, tais como células endoteliais microvasculares e órgãos não linfoides, tais como coração, pulmão, etc. Em contraste, PD-L2 é encontrado apenas em macrófagos e DCs. O padrão de expressão de ligantes de PD-1 é sugestivo de um papel para PD-1 na manutenção de tolerância periférica e pode servir para regular respostas de células B e T autoreativas na periferia. Ambos os ligantes são receptores transmembrana do tipo I contendo domínios semelhantes à IgV e IgC na região extracelular. Ambos os ligantes contêm regiões citoplásmicas curtas sem nenhum motivo de sinalização conhecido.

[006] Até o momento, numerosos estudos mostraram que a interação de PD-1 com seus ligantes leva à inibição de proliferação de linfócitos in vitro e in vivo. Foi mostrado que ruptura da interação PD-1/PD-L1 aumenta a proliferação

de células T e a produção de citocina e bloqueia a progressão do ciclo celular. Análise inicial de camundongos Pdcd1-I- não identificou qualquer fenótipo imunológico drástico. Contudo, camundongos velhos desenvolveram doenças autoimunes espontâneas as quais diferem de acordo com o gênero sobre o qual a deficiência de Pdcd1 foi re-cruzada. Essas incluem artrite proliferativa semelhante a lupus C57BL/6) (Nishimura H. et al., Int. Immunol. 10: 1563-1572 (1998)), cardiomiopatia fatal (BALB/c) (Nishimu-ra H. et al., Science 291: 319-322 (2001)) e diabetes do tipo I (NOD) (Wang J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102: 11823-11828 (2005)). Em geral, análise dos animais com knockout levou ao entendimento de que o PD-1 funciona principalmente na indução e regulação de tolerância periférica. Assim, bloqueio terapêutico da via do PD-1 pode ser útil para superar a tolerância imune. Tal bloqueio seletivo pode ser de uso no tratamento de câncer ou infecção, bem como para reforçar a imunidade durante vacinação (seja profilática ou terapêutica).

[007] O papel do PD-1 em câncer é estabelecido na literatura. Sabe-se que o microambiente do tumor pode proteger as células tumorais contra destruição imune eficiente. Recentemente, foi mostrado que o PD-L1 é expresso em uma série de tumores de camundongo e humanos (e é induzível através do IFN gama na maioria das linhagens de células tumorais negativas para o PD-L1) e foi postulado que media a evasão imune (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002); Strome S.E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003).

[008] Em seres humanos, expressão de PD-1 (em linfócitos que se infiltram em tumores) e/ou PD-L1 (em células tumorais) foi encontrada em uma série de biópsias de tumor primário avaliadas através de imunohistoquímica. Tais tecidos incluem cânceres do pulmão, fígado, ovário, cérvix, pele, cólon, glioma, bexiga, mama, rim, esôfago, estômago, células escamosas orais, células uroteliais e pâncreas, bem como tumores da cabeça e pescoço (Brown J.A. et al.,

J. Immunol. 170: 1257-1266 (2003); Dong H. et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Wintterle et al., Cancer Res. 63: 7462-7467 (2003); Strome S.E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003); Thompson R.H. et al., Cancer Res. 66: 3381-5 (2006); Thompson et al., Clin. Cancer Res. 13: 1757-61 (2007); Nomi T. et al., Clin.Cancer Res. 13: 2151-7. (2007)). Mais impressionante, a expressão de PD-ligante sobre células tumorais foi correlacionada a um pobre prognóstico de pacientes com câncer através de múltiplos tipos de tumor (revisto em Okazaki e Honjo, Int. Immunol. 19: 813-824 (2007)).

[009] Bloqueio da interação PD-1/PD-L1 poderia levar à imunidade de células T tumor-específicas intensificada e, portanto, seria útil na eliminação de células tumorais pelo sistema imune. Para se dirigir a esse problema, uma série de estudos foram realizados. Em um modelo em murino de câncer pancreático agressivo, T. Nomi et al. (Clin. Cancer Res. 13: 2151-2157 (2007)) demonstraram a eficácia terapêutica de bloqueio de PD-1/PD-L1. A administração de PD-1 ou PD-L1 anticorpo-dirigida inibiu significativamente o crescimento do tumor. Bloqueio com anticorpo promoveu eficazmente a infiltração de células T CD8+ reativas no tumor, resultando na super-regulação de efetuadores antitumor, incluindo IFN gama, granzima B e perforina. Adicionalmente, os autores mostraram que bloqueio de PD-1 pode ser eficazmente combinado com quimioterapia para proporcionar um efeito sinergístico. Em outro estudo usando um modelo de carcinoma de células escamosas em camundongos, bloqueio com anticorpo de PD-1 ou PD-L1 inibiu significativamente o crescimento de tumor (Tsushima F. et al., Oral Oncol. 42: 268-274 (2006)).

[0010] Em outros estudos, transfecção de uma linhagem de mastocitoma de murino com PD-L1 levou à lise diminuída das células tumorais quando cocultivadas com um clone de CTL tumor-específico. Lise foi restaurada quando mAb anti-PD-L1 foi adicionado (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:

12293-12297 (2002)). In vivo, foi mostrado que bloqueio da inte-ração PD-1/PD-L aumenta a eficácia de terapia de transferência de células T adotivas em um modelo de tumor em camundongo (Strome S.E. et al., Cancer Res. 63: 6501-6505 (2003)). Evidência adicional para o papel de PD-1 no tratamento de câncer se origina de experimentos realizados com camundongos com knockout de PD-1. Células de mieloma expressando PD-L1 crescem apenas em animais do tipo silvestre (resultando em crescimento de tumor e morte associada do animal), mas não em camundongos deficientes para PD-1 (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)).

[0011] Em estudos com seres humanos, R.M. Wong et al. (Int. Immunol. 19: 1223-1234 (2007)) mostraram que bloqueio de PD-1 usando um anticorpo anti-PD-1 totalmente humano aumentou os números absolutos de células T CD8+ tumor-específicas (CTLs) em ensaios de estimulação ex vivo usando antígenos de vacina e células de indivíduos vacinados. Em um estudo similar, bloqueio com anticorpo de PD-L1 resultou em atividade citolítica intensificada de células T citotóxicas antígeno-específicas tumor-associadas e aumentou a produção de citocina por células TH tumor-específicas (Blank C. et al., Int. J. Cancer 119: 317-327 (2006)). Os mesmos autores mostraram que bloqueio de PD-L1 aumenta as respostas de células T tumor-específicas in vitro quando usado em combinação com bloqueio anti-CTLA-4.

[0012] Em geral, a via de PD-1/PD-L1 é um alvo bem validado para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos de anticorpo para o tratamento de câncer. Anticorpos anti-PD-1 também podem ser úteis em infecção viral crônica. Células T CD8+ de memória geradas após uma infecção viral aguda são altamente funcionais e constituem um componente importante de imunidade protetora. Em contraste, infecções crônicas são, frequentemente, caracterizadas por graus variados de deficiência funcional (exaustão) de respostas de células T vírus-

específicas e esse defeito é uma razão principal para a incapacidade do hospedeiro de eliminar o patógeno persistente. Embora células T efetoras funcionais sejam inicialmente geradas durante os estágios iniciais de infecção, elas gradualmente perdem a função durante o curso de uma infecção crônica. Barber et al. (Barber et al., Nature 439: 682-687 (2006)) mostraram que camundongos infectados com uma cepa de laboratório de LCMV desenvolveram infecção crônica, resultando em altos níveis de vírus no sangue e outros tecidos. Esses camundongos desenvolveram inicialmente uma resposta de células T robusta, mas eventualmente sucumbiram à infecção com a exaustão de células T. Os autores descobriram que o declínio no número e função das células T efetoras em camundongo cronicamente infectados poderia ser revertido através de injeção de um anticorpo que bloqueava a interação entre o PD-1 e PD-L1.

[0013] Recentemente, foi mostrado que o PD-1 é altamente expresso sobre células T de indivíduos infectados pelo HIV e que a expressão do receptor se correlaciona à função deficiente de células T e progressão da doença (Day et al., Nature 443: 350-4 (2006); Trautmann L. et al., Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)). Em ambos os estudos, bloqueio do ligante PD-L1 aumentou significativamente a expansão de células que produzem IFN-gama HIV-específicas in vitro.

[0014] Outros estudos também implicam a importância da via do PD-1 no controle de infecção viral. Camundongos com knockout de PD-1 exibem melhor controle de infecção por adenovírus do que camundongos do tipo silvestre (Iwai et al., J. Exp. Med. 198: 39-50 (2003)). Também, a transferência adotiva de células T HBV-específicas em animais transgênicos para o HBV iniciou hepatite (Isogawa M. et al., Immunity 23: 53-63 (2005)). O estado doentio desses animais oscila como uma consequência de reconhecimento de antígeno no fígado e super-regulação de PD-1 por células hepáticas.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0015] A invenção proporciona anticorpos isolados e fragmentos de anticorpo que se ligam ao PD-1 humano e cyno. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo bloqueia a ligação de PD-L1 humano e PD-L2 humano ao PD-1 humano. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo ao PD-1 da invenção inclui uma ou mais CDRs (regiões de determinação de complementaridade de anticorpo) selecionadas de SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; e, em outras modalidades, inclui uma ou mais CDRs de cadeia pesada de SEQ ID NOs: 12, 13, 14, 18, 19 e 20 e/ou as CDRs de cadeia leve de SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 15, 16 e 17. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é um anticorpo quimérico, anticorpo humano, anticorpo humanizado ou um fragmento dos mesmos.

[0016] Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreen-endo: uma cadeia leve compreendendo CDRs SEQ ID NOs: 9, 10 e 11 ou variantes de qualquer uma das referidas sequências; e/ou uma cadeia pesada compreendendo CDRs SEQ ID NOs: 12, 13 e 14 ou variantes de qualquer uma das referidas sequências.

[0017] Em outra modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreendendo: uma cadeia leve compreendendo CDRs SEQ ID NOs: 15, 16 e 17 ou variantes de qualquer uma das referidas sequências; e/ou uma cadeia pesada compreendendo CDRs SEQ ID NOs: 18, 19 e 20 ou variantes de qualquer uma das referidas sequências.

[0018] Em uma modalidade, a invenção compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada SEQ ID NO: 5 ou uma variante da mesma; e/ou uma região variável de

cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 6 ou uma variante da mesma.

[0019] Em uma modalidade, a invenção compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada SEQ ID NO: 7 ou uma variante da mesma e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 8 ou uma variante da mesma.

[0020] Em uma modalidade, a invenção compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 139 de SEQ ID NO: 30 ou uma variante da mesma; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 130 de SEQ ID NO: 32 ou uma variante da mesma.

[0021] Em uma modalidade, a invenção compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 139 de SEQ ID NO: 30 ou uma variante da mesma; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 130 de SEQ ID NO: 33 ou uma variante da mesma.

[0022] Em uma modalidade, a invenção compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 139 de SEQ ID NO: 30 ou uma variante da mesma; e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 130 de SEQ ID NO: 34 ou uma variante da mesma.

[0023] Em uma modalidade, a invenção compreende um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de homologia aos resíduos de aminoácido 20 a 139 de SEQ ID NO: 30; e/ou uma

região variável de cadeia leve compreendendo e uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 90% de homologia aos resíduos de aminoácido 20 a 130 de SEQ ID NO: 32, 33 ou 34.

[0024] Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreendendo: uma cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 466 de SEQ ID NO: 31 ou uma variante da mesma e/ou uma cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 237 de SEQ ID NO: 36 ou uma variante da mesma.Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreendendo: uma cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 466 de SEQ ID NO: 31 ou uma variante da mesma e/ou uma cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 237 de SEQ ID NO: 37 ou uma variante da mesma.

[0025] Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreendendo: uma cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 466 de SEQ ID NO: 31 ou uma variante da mesma e/ou uma cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 237 de SEQ ID NO: 38 ou uma variante da mesma.

[0026] Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreendendo: uma cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 469 de SEQ ID NO: 35 ou uma variante da mesma e/ou uma cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 237 de SEQ ID NO: 36 ou uma variante da mesma.

[0027] Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreen-dendo: uma cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 469 de SEQ ID NO: 35 ou uma variante da mesma e/ou uma cadeia leve compreendendo os

resíduos de aminoácido 20 a 237 de SEQ ID NO: 37 ou uma variante da mesma.

[0028] Em uma modalidade, a invenção proporciona um anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano compreendendo: uma cadeia pesada compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 469 de SEQ ID NO: 35 ou uma variante da mesma e/ou uma cadeia leve compreendendo os resíduos de aminoácido 20 a 237 de SEQ ID NO: 38 ou uma variante da mesma.

[0029] Em qualquer uma das modalidades acima, a variante do anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode compreender uma, duas ou três substituições de aminoácido conservativamente modificadas.

[0030] Em qualquer uma das modalidades acima, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode compreender uma região constante de cadeia pesada humana ou uma variante da mesma, em que a variante compreende até 20 substituições de aminoácido conservativamente modificadas; e/ou uma região constante de cadeia leve humana ou uma variante da mesma, em que a variante compreende até 20 substituições de aminoácido conservativamente modificadas. Em algumas modalidades, a variante pode compreender até 10 substituições de aminoácido conservativamente modificadas. Em algumas modalidades, a variante pode compreender até 5 substituições de aminoácido conservativamente modificadas. Em algumas modalidades, a variante pode compreender até 3 substituições de aminoácido conservativamente modificadas. Em qualquer uma das modalidades acima, a região constante de cadeia pesada humana ou variante da mesma pode ser do isotipo IgG1 ou IgG4.

[0031] Em qualquer uma das modalidades descritas acima, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode se ligar ao PD-1 humano com uma KD de cerca de 100 pM ou menor. Em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode se ligar ao PD-1 humano com uma KD de cerca de 30 pM ou menor. Em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de

anticorpo da invenção pode se ligar ao PD-1 humano com a mesma KD que um anticorpo tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 31 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 32. Em outra modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode se ligar ao PD-1 humano com a mesma KD que um anticorpo tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 31 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 33.

[0032] Em qualquer uma das modalidades descritas acima, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode se ligar ao PD-1 humano com uma kassoc de cerca de 7,5 x 105 1/M·s ou mais rápido. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode se ligar ao PD-1 humano com uma kassoc de cerca de 1 x 106 1/M·s ou mais rápido.

[0033] Em qualquer uma das modalidades descritas acima, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode se ligar ao PD-1 humano com uma kdissoc de cerca de 2 x 10-5 1/s ou mais lento. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode se ligar ao PD-1 humano com uma kdissoc de cerca de 2,7 x 10-5 1/s ou mais lento. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode se ligar ao PD-1 humano com uma kdissoc de cerca de 3 x 10-5 1/s ou mais lento.

[0034] Os valores de KD, kassoc e kdissoc podem ser medidos usando quaisquer métodos disponível. Em modalidades preferidas, a constante de dissociação é medida usando interferometria bio-luminosa (por exemplo, o método ForteBio Octet descrito no Exemplo 2). Em outras modalidades preferidas, a constante de dissociação pode ser medida usando ressonância de plasmônio em superfície (por exemplo, Biacore) ou Kinexa.

[0035] Ainda, em qualquer uma das modalidades descritas acima, o

anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode bloquear a ligação de PD-L1 humano ou PD-L2 humano com uma IC_{50} de cerca de 1 nM ou menor. O bloqueio de ligação a ligante pode ser medido e a IC_{50} calculada usando qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, os métodos FACS ou FMAT descritos nos Exemplos aqui.

[0036] A invenção também compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo o qual compete pelo epítopo de ligação sobre o PD-1 humano com qualquer um dos anticorpos descritos acima e o qual bloqueia a ligação de PD-L1 humano ou PD-L2 humano ao PD-1 humano com uma IC_{50} de cerca de 1 nM ou menor.

[0037] A invenção também compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo o qual compete por um epítopo de ligação sobre o PD-1 humano com qualquer um dos anticorpos descritos acima e o qual se liga ao PD-1 humano com uma KD de cerca de 100 pM ou menor. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma KD de cerca de 30 pM ou menor.

[0038] A invenção também compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo o qual compete por um epítopo de ligação sobre o PD-1 com qualquer um dos anticorpos descritos acima e o qual se liga ao PD-1 humano com cerca da mesma KD que um anticorpo tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 31 e uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 32.

[0039] A invenção também compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo o qual compete por um epítopo de ligação sobre o PD-1 com qualquer um dos anticorpos descritos acima e o qual se liga ao PD-1 humano com cerca da mesma KD que um anticorpo tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 31 e uma cadeia leve compreendendo

a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 33.

[0040] A invenção também compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo o qual compete por um epítopo de ligação sobre o PD-1 humano com qualquer um dos anticorpos descritos acima e o qual se ao PD-1 humano com uma kassoc de cerca de 7,5 x 105 1/M·s ou mais rápido. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode se ligar ao PD-1 humano com uma kassoc de cerca de 1 x 106 1/ M·s ou mais rápido.

[0041] A invenção também compreende um anticorpo ou fragmento de anticorpo o qual compete por um epítopo de ligação sobre o PD-1 humano com qualquer um dos anticorpos descritos acima e o qual se ao PD-1 humano com uma kdissoc de cerca de 2 x 10-5 1/s ou mais lenta. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode se ligar ao PD-1 humano com uma kdissoc de cerca de 2,7 x 10-5 1/s ou mais lenta. Em uma modalidade, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode se ligar ao PD-1 humano com uma kdissoc de cerca de 3 x 10-5 1/s ou mais lenta.

[0042] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpos da invenção são anticorpos quiméricos ou fragmentos de anticorpos quiméricos.

[0043] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpos da invenção são anticorpos humanos ou fragmentos de anticorpos humanos.

[0044] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de anticorpos da invenção são anticorpos humanizados ou fragmentos de anticorpos humanizados.

[0045] Em algumas modalidades, os fragmentos de anticorpo da invenção são fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv ou F(ab')2 de anticorpos.

[0046] Em algumas modalidades, os fragmentos de anticorpo da invenção são diacorpos.

[0047] A invenção também compreende anticorpos biespecíficos

compreendendo qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de anticorpo descritos acima que se ligam ao PD-1 humano.

[0048] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-PD-1 isolados e fragmentos de anticorpo da invenção aumentam a ativação de células T conforme medido por meios típicos conhecidos por aqueles habilitados na técnica (incluindo, sem limitação, proliferação aumentada de células imunes, secreção aumentada de citocina ou expressão de marcadores de ativação, tais como CD25 e/ou CD69).

[0049] Em qualquer uma das modalidades descritas acima, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção pode intensificar a resposta imune após estimulação com Enterotoxina B de Estafilococo ou Toxoide do tétano ex vivo ou in vivo. A ativação imune aumentada pode ser determinada usando métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, por exem-plo, quantificação de proliferação de células imunes (tais como células T) ou produção de citocina por células imunes (por exemplo, produção de IFNα ou IL-2 por células T).

[0050] A invenção também compreende ácidos nucleicos que codificam os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos de anticorpo da invenção. Incluídos na invenção são ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácido divulgadas em SEQ ID NOS: 5 a 20 e 30-38 (com ou sem as sequências líderes). Também incluídos dentro da invenção são ácidos nucleicos compreendendo SEQ ID NOS: 1 a 4 e 21 a 29 (com ou sem os ácidos nucleicos que codificam as sequências líderes).

[0051] A invenção também compreende células e vetores de expressão compreendendo ácidos nucleicos que codificam os anticorpos ou fragmentos de anticorpo da invenção. Ainda, a invenção compreende um método de produção de um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção compreendendo: (a) cultura da célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico que codifica um

anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção em meio de cultura sob condições em que a sequência de ácido nucleico é expressa, desse modo, produzindo polipeptídeos compreendendo as regiões variáveis de cadeias leve e pesada; e (b) recuperação dos polipeptídeos da célula hospedeira ou meio de cultura.

[0052] A invenção também compreende composições compreendendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção em combinação com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0053] A invenção também compreende um método de aumento da atividade de uma célula imune compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção. Em uma modalidade, o método pode também ser usado para tratar câncer. Em outra modalidade, o método pode ser usado para tratar uma infecção ou doença infecciosa. Em ainda outra modalidade, o método pode ser usado para tratar uma infecção ou doença infecciosa. Em ainda outra modalidade, o método pode ser usado como um adjuvante para vacina. Em algumas modalidades, o método compreende ainda administração de um segundo agente terapêutico ou modalidade de tratamento.

[0054] Em algumas modalidades, a invenção compreende um método de aumento da atividade de uma célula imune compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção e ainda compreendendo medição de ativação de células T ex vivo em uma amostra derivada do indivíduo, em que um aumento na atividade de células T indica que o tratamento deverá ser continuado. Em outras modalidades, a invenção compreende um método de aumento da atividade de uma célula imune

compreendendo administração, a um indivíduo que precisa do mesmo, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção e ainda compreendendo medição de ativação de células T ex vivo em uma amostra derivada do indivíduo, em que um aumento na atividade de células T preve a probabilidade de que o tratamento obterá sucesso. Em uma modalidade, o aumento na atividade de células T é determinado por: (i) medição de produção SEB-induzida de uma ou mais citocinas selecionadas do grupo consistindo em: IL-2, TNF α, IL-17, IFNγ, GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 e IL-13; ou (ii) medição da produção TT-induzida de uma citocina selecionada do grupo consistindo em: IL-2, TNFα, IL-17, IFNγ, GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 e IL-13.

[0055] A invenção também compreende o uso de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo da invenção para o preparo de um medicamento para aumentar a resposta imune.

[0056] A invenção também compreende o uso de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo da invenção para o preparo de um medicamento para tratar câncer.

[0057] A invenção também compreende o uso de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo da invenção como um adjuvante para vacina.

[0058] A invenção também compreende um imunoconjugado compreendendo um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo da invenção ligado a um agente terapêutico, tal como uma toxina bacteriana ou uma radiotoxina. Exemplos não limitativos de agentes citotóxicos incluem taxol, citocalasina B, mitomicina, etoposídeo e vincristina ou outros antimetabólitos, agentes de alquilação, antibióticos antimitóticos.

[0059] A invenção também compreende um método de aumento da atividade ou redução da submodulação de uma célula imune compreendendo contato da célula imune com qualquer um dos anticorpos ou fragmentos de

anticorpo da invenção. Esse método poderia ser usado para tratar câncer ou doenças infecciosas (tais como infecções virais crônicas) ou poderia ser usado como um adjuvante a uma vacina profilática ou terapêutica.

[0060] A invenção também compreende um método de aumento de uma resposta imune a um antígeno compreendendo contato de uma célula imune com um antígeno e um anticorpo anti-PD-1 ou um fragmento de anticorpo, de modo que uma resposta imune ao antígeno seja aumentada ou intensificada. Esse método poderia ser conduzido in vivo (em um indivíduo) ou ex vivo.

[0061] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo pode ser combinado com um segundo agente terapêutico ou modalidade de tratamento. Em uma modalidade, um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo pode ser combinado com tratamentos para o câncer envolvendo a aplicação de citocinas recombinantes ou fatores imunes secretados. Exemplos não limitativos de combinações incluem combinação do anticorpo anti-PD-1 com IL-2 recombinante ou IFNα2 recombinante para o tratamento de melanoma ou carcinoma de células renais. IL-2 recombinante intensifica o super-crescimento de células T em pacientes com câncer. IFNα2 recombinante inibe o crescimento de células cancerígenas, mas também aumenta a expressão dos ligantes inibitórios para PD-1 sobre células cancerígenas, células que apresentam antígeno e outras células somáticas nos pacientes tratados. Anti-PD-1 também pode ser combinado com outras citocinas que poderiam ser consideradas úteis para o tratamento de câncer ou doenças infecciosas.

[0062] Em algumas modalidades, anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de anticorpo podem ser combinados com uma vacina para prevenir ou tratar câncer ou uma doença infecciosa. Como um exemplo não limitativo, anti-PD-1 poderia ser combinado com uma proteína, peptídeo ou vacina de DNA contendo um ou

mais antígenos os quais são relevantes para o câncer ou infecção a ser tratada ou uma vacina compreendendo células dendríticas pulsadas com tal antígeno. Outra modalidade inclui o uso de anti-PD-1 com células cancerígenas ou vacinas de vírus inteiro (atenuado). Uma modalidade envolve uma combinação de terapia anti-PD-1 com uma vacina contra o câncer de células inteiras que são manipuladas para secretar GM-CSF.

[0063] Em algumas modalidades, anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de anticorpo podem ser combinados com tratamento que é considerado co-mo sendo padrão para cuidados com o câncer ou doença infecciosa. A ra-zão para tais combinações é que ativação imune concorrentemente aumen-tada pelo anti-PD-1 induzirá ou facilitará uma resposta clínica inicial ao tra-tamento assistencial padrão, induzindo a uma resposta clínica duravel e controle imune da doença a longo prazo.

[0064] Em uma modalidade, tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de anticorpo pode ser combinado com quimioterapia. Quimioterapia usando agentes citotóxicos resultará em morte de células cancerígenas, desse modo, aumentando a liberação de antígenos ao tumor. Tal disponibilidade aumentada de antígenos tumorais pode resultar em sinergia com o tratamento anti-PD-1. Um exemplo não limitativo é proporcionado pelo uso de decarbazina ou temozolomida para o tratamento de melanoma e gemcitabina para câncer pancreático.

[0065] Em uma modalidade, tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de anticorpo pode ser combinado com radioterapia. Radioterapia induz à morte de células cancerígenas e aumenta a disponibilidade dos antígenos tumorais para apresentação e ativação de células imunes.

[0066] Em outra modalidade, tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de anticorpo pode ser combinado com cirurgia para remover células

cancerígenas de um indivíduo.

[0067] Em outras modalidades, anticorpos anti-PD-1 ou fragmentos de anticorpo podem ser combinados com terapias as quais podem resultar em sinergia com bloqueio de PD-1, incluindo agentes alvejados usados para privação hormonal ou inibição de angiogênese ou alvejamento de proteínas ativas em células tumorais, todos resultando em morte de células tumorais intensificada e disponibilidade de estimulação imune de antígenos tumorais. Em combinação com um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo, ativação aumentada de células T pode resultar em controle imune durável de câncer.

[0068] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo pode ser combinado com outro anticorpo terapêutico útil para o tratamento de câncer ou doença infecciosa. Um exemplo não limitativo é proporcionado pela combinação de anti-PD-1 com um anticorpo cujo alvo é Her2/neu ou cujo alvo é o receptor de EGF. Em outro exemplo não limitativo, um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo é combinado com um tratamento que objetiva o VEGF ou seus receptores. Em outra modalidade, um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo é combinado com um anti-CTLA-4. Em ainda outro exemplo não limitativo, anti-PD-1 é combinado com um anticorpo cujo alvo é o RSV.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0069] As Figuras 1A e 1B mostram os resultados de experimentos demonstrando que anticorpos imobilizados a partir de sobrenadantes de hibridoma são capazes de reduzir a secreção de IL-2 por células Jurkat E6.2.11 estimuladas com anti-CD3 imobilizado e anti-CD28 solúvel.

[0070] A Figura 2 mostra os resultados de experimentos demonstrando que anticorpos contra PD-1 humano se ligam ao PD-1. A Figura 2A é um gráfico mostrando a ligação dose-dependente de anticorpos anti-PD-1 ao PD-1/Fc

purificado em um ELISA de proteína. A Figura 2B é um gráfico mostrando a ligação dose-dependente de anticorpos anti-PD-1 ao PD-1 expresso sobre a superfície de células CHO transfectadas com hPD-1 em um CELISA.

[0071] A Figura 3 mostra os resultados de um experimento FMAT demonstrando que os anticorpos contra PD-1 competem pela ligação de PD-L1 e PD-L2 a células CHO transfectadas com PD-1 humano. A Figura 3A é um gráfico mostrando a inibição dose-dependente de ligação de PD-L1 por hPD-1.08A e hPD-1.09A e, em um grau menor, por J116. A Figura 3B é um gráfico mostrando a inibição dose-dependente de PD-L2.

[0072] A Figura 4 é um gráfico de barras o qual mostra os resultados de experimentos demonstrando que a produção de IL-2 SEB-estimulada por células sanguíneas de doadores saudáveis é intensificada na presença de anticorpos anti-PD-1, anti PD-L1 ou anti-CTLA-4. As barras mostram as vezes de aumento médio na IL-2 através dos doadores (± SEM). Os números dentro de cada barra indicam o número de doadores representados. (m)IgG1 de camundongo é o controle de isotipo para anti-PD-1.08A (08A), anti-PD-1.09A (09A) e anti-PD-L1. (m)IgG2a de camundongo é o controle de isotipo para anti-CTLA-4. Cada valor de IL-2 é comparado com seu próprio controle para determinar as vezes de alteração (vezes de alteração em IL-2 de 4 significa aumento de 400% na produção de IL-2 quando comparado com SEB isoladamente). Nenhum = SEB apenas.

[0073] A Figura 5 mostra os resultados de experimentos demonstrando que anticorpos anti-PD-1 promovem a proliferação de células T e secreção de citocina (IL-2 e IFNγ) quando estimulados com o antígeno de "recall" toxoide do tétano. A Figura 5 mostra a secreção de IFNγ concentração-dependente.

[0074] A Figura 6 é um gráfico representando as taxas kassoc e kdissoc para anticorpos anti-PD-1, conforme medido através de interferometria bio-

luminosa. As linhas diagonais indicam os valores teóricos calculados de KD. Os anticorpos são listados à direita pela KD em ordem crescente.

[0075] A Figura 7 é um gráfico de barras o qual mostra os resultados de experimentos demonstrando que a produção de IL-2 SEB-estimulada por células sanguíneas de doadores saudáveis é aumentada na presença de 25 μg/ml de anticorpos anti-PD-1 de murino (09A) ou humanizados (h409A11, h409A16 e h409A17). As barras mostram as vezes de aumento médio na IL-2 através de três doadores (± SEM). (m)IgG1 de camundongo é o controle de isotipo para anti-PD-1.09A (09A). (h)IgG4 humana é o controle de isotipo para os anticorpos h409A11, h409A16 e h409A17. Cada valor de IL-2 é comparado com seu próprio controle a fim de determinar as vezes de alteração. Nenhum = SEB isoladamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Abreviações e Definições

[0076] Por toda a descrição detalhada e exemplos da invenção, as seguintes abreviações serão usadas:

hPD-1.08A Anticorpo anti-hPD-1 monoclonal de murino

hPD-1.09A Anticorpo anti-hPD-1 monoclonal de murino

08A-VH VH isolada do hibridoma hPD-1.08A

08A-VKVK isolada do hibridoma hPD-1.08A

09A-VH VH isolada do hibridoma hPD-1.09A

09A-VKVK isolada do hibridoma hPD-1.09A

c109A Versão de IgG1 quimérica do anticorpo hPD1.09A

c109A-VH Cadeia pesada quimérica, consistindo em 09A-VH de murino fundida à região constante de hIgG1

c109A-VK Cadeia leve quimérica, consistindo em 09A-VK de murino fundida à região constante kappa humana

109A-H Sequência de cadeia pesada de IgG1 09A humanizada com

zero mutações

409A-H Sequência de cadeia pesada de IgG4-09A humanizada com zero mutações FWR

K09A-L-11 Sequência kappa-09A humanizada com estrutura principal originalmente tendo um comprimento de CDR1 de 11 AAs

K09A-L-16 Sequência kappa-09A humanizada com estrutura principal originalmente tendo um comprimento de CDR1 de 16 AAs

K09A-L-17 Sequência kappa-09A humanizada com estrutura principal originalmente tendo um comprimento de CDR1 de 17 AAs

h409A11 Versão IgG4 humanizada do anticorpo 09A compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de 409A-H e uma cadeia leve compreendendo a sequência de K09A-L-11

h409A16 Versão IgG4 humanizada do anticorpo 09A compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de 409A-H e uma cadeia leve compreendendo a sequência de K09A-L-16

h409A17 Versão IgG4 humanizada do anticorpo 09A compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de 409A-H e uma cadeia leve compreendendo a sequência de K09A-L-17

hPD-1 Proteína de PD-1 humana

CDR Região de determinação de complementaridade nas regiões variáveis de imunoglobulina, definidas usando o sistema de numeração de Kabat

EC50 Concentração que resulta em eficácia ou ligação de 50%

ELISA Ensaio imunoabsorvente enzima-ligado

FW Região de estrutura principal de anticorpo: as regiões variáveis de imunoglobulina, excluindo as regiões de CDR

HRP Peroxidase de armorácia

IL-2 Interleucina-2

IFN Interferon

IC_{50} Concentração que resulta em inibição de 50%

IgG Imunoglobulina G

Kabat Um alinhamento de imunoglobulina e sistema de numeração criado por Elvin A. Kabat

mAb Anticorpo monoclonal

MES Ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfônico

NHS Soro humano normal

PCR Reação em cadeia de polimerase

SAM Anticorpo policlonal (IgG) anti-camundongo de ovelha

Região V O segmento de cadeias de IgG o qual é variável quanto à sequência entre diferentes anticorpos. Ela se estende até o resíduo 109 de Kabat na cadeia leve e 113 na cadeia pesada

VH Região variável de cadeia pesada de imunoglobulina

VK Região variável kappa de cadeia leve de imunoglobulina

[0077] "Anticorpo" refere-se a qualquer forma de anticorpo que exibe a atividade biológica desejada, tal como inibição de ligação de um ligante a seu receptor ou através de inibição de sinalização ligante-induzida de um receptor. Assim, "anticorpo" é usado no sentido mais amplo e abrange especificamente, mas não está limitado a, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais e anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos).

[0078] "Fragmento de anticorpo" e "fragmento de ligação de anticorpo" significam fragmentos de ligação a antígeno e análogos de um anticorpo, tipicamente incluindo pelo menos uma porção das regiões de ligação a antígeno ou variáveis (por exemplo, uma ou mais CDRs) do anticorpo precursor. Um fragmento de anticorpo retém pelo menos um pouco da especificidade de

ligação do anticorpo precursor. Tipicamente, um fragmento de anticorpo retém pelo menos 10% da atividade de ligação original quando essa atividade é expressa em uma base molar. De preferência, um fragmento de anticorpo retém pelo menos 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% ou mais da afinidade de ligação do anticorpo precursor pelo alvo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo com uma única cadeia, por exemplo, sc-Fv; unicorpos (tecnologia da Genmab); nanocorpos (tecnologia da Domantis); anticorpos com domínio (tecnologia da Ablynx); e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpo. Variantes de anticorpo manipuladas são revistas em Holliger e Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136.

[0079] Um "fragmento Fab" é compreendido de uma cadeia leve e o CH1 e regiões variáveis de uma cadeia pesada. A cadeia pesada de uma molécula Fab não pode formar uma ligação de dissulfeto com outra molécula de cadeia pesada.

[0080] Uma região "Fc" contém dois fragmentos de cadeia pesada compreendendo os domínios CH1 e CH2 de um anticorpo. Os dois fragmentos de cadeia pesada são mantidos juntos através de duas ou mais ligações de dissulfeto e através de interações hidrofóbicas dos domínios CH3.

[0081] Um "fragmento Fab'" contém uma cadeia leve e uma porção de uma cadeia pesada que contém o domínio VH e o domínio CH1 e também a região entre os domínios CH1 e CH2, de modo que uma ligação de dissulfeto intercadeia pode ser formada entres as duas cadeias pesadas dos dois fragmentos Fab1 para formar uma molécula de F(ab')2.

[0082] Um "fragmento F(ab')2" contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas contendo uma porção da região constante entre os domínios CH1 e CH2,

de modo que uma ligação de dissulfeto intercadeia é formada entre as duas cadeias pesadas. Um fragmento F(ab')2, assim, é composto de dois fragmentos Fab' que são mantidos juntos por uma ligação de dissulfeto entre as duas cadeias pesadas.

[0083] A "região Fv" compreende as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, mas carece das regiões constantes.

[0084] Um "anticorpo Fv com uma única cadeia" (ou "anticorpo scFv") se refere a fragmentos de anticorpo compreendendo os domínios VH e VL de um anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo de Fv ainda compreende um ligante polipeptídico entre os domínios VH e VL o qual permite que o scFv forme a estrutura desejada para ligação a antígeno. Para uma revisão de scFv vide Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenburg e Moore eds. Springer-Verlag, New York, páginas 269-315. Vide também Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 88/01649 e Pats. U.S. Nos. 4.946.778 e 5.260.203.

[0085] Um "diacorpo" é um pequeno fragmento de anticorpo com dois sítios de ligação a antígeno. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL ou VL-VH). Usando um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação a antígeno. diacorpos são descritos mais detalhadamente, por exemplo, no EP 404,097; WO 93/11161; e Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448.

[0086] Um "fragmento de anticorpo com domínio" é um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional contendo apenas a região variável

de uma cadeia pesada ou a região variável de uma cadeia leve. Em alguns casos, duas ou mais regiões VH são covalentemente unidas com uma ligação peptídica para criar um fragmento de anticorpo com domínio bivalente. As duas regiões VH de um fragmento de anticorpo com domínio bivalente podem alvejar os mesmos ou antígenos diferentes.

[0087] Um fragmento de anticorpo da invenção pode compreender uma porção suficiente da região constante para permitir dimerização (ou multimerização) de cadeias pesadas que têm capacidade de ligação de dissulfeto reduzida, por exemplo, onde pelo menos uma das cisteínas da dobradiça normalmente envolvida em ligação de dissulfeto intercadeia pesada é alterada, conforme descrito aqui. Em outra modalidade, um fragmento de anticorpo, por exemplo, um que compreende a região Fc, retém pelo menos uma das funções biológicas normalmente associadas à região Fc quando presente em um anticorpo intacto, tal como ligação a FcRn, modulação de meia-vida do anticorpo, função de ADCC e/ou ligação a complemento (por exemplo, onde o anticorpo tem um perfil de glicosilação necessário para função de ADCC ou ligação a complemento).

[0088] O termo anticorpo "quimérico" refere-se a anticorpos nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica a ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie em particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo em particular, enquanto que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico a ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo à outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, na medida em que eles exibam a atividade biológica desejada (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 4.816.567 e Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

[0089] Formas "humanizadas" de anticorpos não-humanos (por exemplo, murino) são anticorpos quiméricos que contêm a sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Em sua maioria, anticorpos hu-manizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) nas quais resíduos de uma região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato, coelho ou primata não-humano tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de estrutura principal (FR) de Fv da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todo de pelo menos um e, tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os loops hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para maiores detalhes, vide Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); e Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

[0090] O termo "região hipervariável", conforme usado aqui, se refere aos resíduos de aminoácido de um anticorpo os quais são responsáveis pela ligação a antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácido de uma "região de determinação de complementaridade" ou "CDR", definida através de

alinhamento de sequência, por exemplo, os resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; vide Kabat et al., 1991, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. e/ou aqueles resíduos de um "loop hipervariável" (HVL), conforme definido estruturalmente, por exemplo, os resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; vide Chothia e Leskl, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Resíduos de "estrutura principal" ou "FR" são aqueles outros resíduos de domínio variável que não os resíduos da região hipervariável, conforme definido aqui.

[0091] Um "anticorpo humano" é um anticorpo que possui uma sequência de aminoácido correspondendo àquela de um anticorpo produzido por um ser humano e/ou foi feito usando qualquer uma das técnicas para fazer anticorpos humanos divulgados aqui. Essas definições excluem especificamente um anticorpo humanizado que compreende resíduos de ligação a antígeno não-humanos.

[0092] Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interferirão com usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em algumas modalidades, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo, conforme determinado através do método de Lowry e, mais preferivelmente, mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido interna ou N-terminal através do uso de um sequenciador com copo giratório ou (3) até

homogeneidade, através de SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando azul Coomassie ou, de preferência, coloração com prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo in situ dentro de células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Comumente, contudo, o anticorpo isolado será preparado através de pelo menos uma etapa de purificação.

[0093] Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual ela está comumente associada na fonte natural do ácido nucleico do anticorpo. Uma molécula de ácido nucleico isolada está em outra que não na forma ou ambiente no qual ela é encontrada na natureza. Moléculas de ácido nucleico isoladas, portanto, se distinguem da molécula de ácido nucleico conforme ela existe em células naturais. Contudo, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que comumente expressam o anticorpo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está em uma localização cromossômica diferente daquela de células naturais.

[0094] O termo "anticorpo monoclonal", conforme usado aqui, se refere a um anticorpo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto quanto à possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em quantidades mínimas. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste com preparados de anticorpo convencionais (policlonais) que, tipicamente, incluem anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante sobre o antígeno. O modificador "monoclonal" indica o caráter do

anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos e não deve ser construído como requerendo a produção do anticorpo através de qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos através do método de hibridoma primeiro descrito por Kohler et al., 1975, Nature 256: 495 ou podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpo de fago usando as técnicas descritas em Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628 e Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597, for exemplo. Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos".

[0095] Conforme usado aqui, o termo "célula imune" inclui células que são de origem hematopoiética e que exercem um papel na resposta imune. Células hospedeiras incluem linfócitos, tais como células B e células T; células assassinas naturais; células mieloides, tais como monócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, basófilos e granulócitos.

[0096] Conforme usado aqui, um "imunoconjugado" refere-se a um anticorpo anti-PD-1 ou um fragmento do mesmo, conjugado a uma porção terapêutica, tal como uma toxina bacteriana, um fármaco citotóxico ou uma radiotoxina. Porções tóxicas podem ser conjugadas aos anticorpos da invenção usando métodos disponíveis na técnica.

[0097] Os seguintes códigos de ambiguidade de ácido nucleico são usados aqui: R = A ou G; Y = C ou T; M = A ou C; K = G ou T; S = G ou C; e W = A ou T.

[0098] Conforme usado aqui, uma "variante" de sequência refere-se a uma sequência que difere da sequência divulgada em um ou mais resíduos de aminoácido, mas a qual retém a atividade biológica da molécula resultante.

[0099] "Variantes conservativamente modificadas" ou "substituição

conservativa de aminoácido" refere-se a substituições de aminoácidos bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica e podem ser feitas geralmente sem alterar a atividade biológica da molécula resultante. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que, em geral, substituições de um único aminoácido em regiões não essenciais de um polipeptídeo não alteram substancialmente a atividade biológica (vide, por exemplo, Watson et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., página 224 (4ª Edição 1987)). Tais substituições exemplificativas são, de preferência, feitas de acordo com aquelas apresentadas abaixo, como segue:

Substituições conservativas exemplificativas de aminoácido

Resíduo original	Substituição conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala

Resíduo original	Substituição conservativa
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[00100] Conforme usado aqui, "identidade %" entre duas sequências se refere a uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % de homologia = No de posições idênticas/total No de posições x 100), levando-se em conta o número de gaps e a extensão de cada gap, as quais precisam ser introduzidas para alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação de sequências e determinação da identidade percentual entre duas sequências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático. Por exemplo, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)) o qual foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade por extensão de gap de 12 e uma penalidade por gap de 4. Além disso, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), o qual foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em www.gcg.com), usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso de gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso por extensão de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[00101] Conforme usado aqui, o termo "cerca de" se refere a um valor que está dentro de uma faixa de erro aceitável para o valor em particular, conforme determinado por aqueles habilitados na técnica, o qual dependerá,

em parte, de como o valor é medido ou determinado, isto é, as limitações do sistema de medição. Por exemplo, "cerca de" pode significar dentro de 1 ou mais de 1 desvio padrão conforme a prática na técnica. Alternativamente, "cerca de" ou "compreendendo essencialmente" pode significar uma faixa de até 20%. Além disso, particularmente com relação a sistemas ou processos biológicos, os termos podem significar até uma ordem de magnitude ou até 5 vezes um valor. Quando valores particulares são proporcionados no pedido e reivindicações, a menos que de outro modo estabelecido, o significado de "cerca de" ou "compreendendo essencialmente" deverá ser admitido como estando dentro de uma faixa de erro aceitável para esse valor em particular.

[00102] Se liga "especificamente", quando de referência a um ligante/receptor, anticorpo/antígeno ou outro par de ligação, indica uma reação de ligação a qual é determinativa da presença da proteína, por exemplo, PD-1, em uma população heterogênea de proteínas e/ou outros produtos biológicos. Assim, sob as condições designadas, um ligante/antígeno especificado se liga a um receptor/anticorpo em particular e não se liga, em uma quantidade significativa, à outras proteínas presentes na amostra.

[00103] "Administração" e "tratamento", quando se aplicam a um animal, ser humano, indivíduo experimental, célula, tecido, órgão ou fluido biológico, referem-se ao contato de uma composição ou agente farmacêutico, diagnóstico ou terapêutico exógeno com o animal, ser humano, indivíduo, célula, tecido, órgão ou fluido biológico. "Administração" e "tratamento" podem ser referir, por exemplo, a métodos terapêuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de pesquisa e experimentais. Tratamento de uma célula abrange contato de um reagente com a célula, bem como contato de um reagente com um fluido, onde o fluido está em contato com a célula. "Administração" e "tratamento" podem também significar tratamentos in vitro e in vivo, por exemplo, de uma célula, através de

uma composição reagente, diagnóstica, de ligação ou através de outra célula.

[00104] "Quantidade eficaz" abrange uma quantidade suficiente para aliviar ou prevenir um sintoma ou sinal da condição médica. Quantidade eficaz também significa uma quantidade suficiente para permitir ou facilitar o diagnóstico. Uma quantidade eficaz para um indivíduo em particular pode variar, dependendo de fatores tais como a condição que está sendo tratada, a saúde global do paciente, a via do método e a dose de administração e a gravidade dos efeitos colaterais. Uma quantidade eficaz pode ser a dose máxima ou protocolo de dosagem que evita efeitos colaterais ou efeitos tóxicos significativos. O efeito resultará em um aprimoramento de uma medida ou parâmetro diagnóstico em pelo menos 5%, usualmente em pelo menos 10%, mais usualmente pelo menos 20%, ainda mais usualmente pelo menos 30%, de preferência pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, ainda mais preferivelmente pelo menos 60%, idealmente pelo menos 70%, mais idealmente pelo menos 80% e, ainda mais idealmente, pelo menos 90%, onde 100% é definido com o parâmetro diagnóstico mostrado por um indivíduo normal (vide, por exemplo, Maynard et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

Anticorpos monoclonais

[00105] Anticorpos monoclonais ao PD-1 podem ser feitos de acordo com o conhecimento e capacidade na técnica de injeção de indivíduos de teste com antígeno PD-1 e, então, isolamento de hibridomas expressando anticorpos tendo as características funcionais ou sequência desejada.

[00106] DNA que codifica os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente

a genes que codificam as cadeias pesada e leve dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão os quais são, então, transfectados em células hospedeiras, tais como células de E. coli, células COS de símio, células de ovário de hâmster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outro modo, não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A produção recombinante de anticorpos será descrita em maiores detalhes abaixo.

[00107] Em uma outra modalidade, anticorpos ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo geradas usando as técnicas descritas em McCafferty et al., 1990, Nature, 348: 552-554. Clackson et al., 1991, Nature, 352: 624-628 e Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597 descrevem o isolamento de anticorpos de murino e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Subsequentes publicações descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) através de embaralhamento de cadeia (Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10: 779-783), bem como infecção combinatorial e recombinação in vivo como uma estratégia para construção de grandes bibliotecas de fago (Waterhouse et al., 1993, Nuc. Acids. Res. 21: 2265-2266). Assim, essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais com hibridoma de anticorpo para isolamento de anticorpos monoclonais.

Anticorpos quiméricos

[00108] O DNA de anticorpo pode também ser modificado, por exemplo, através de substituição da sequência de codificação dos domínios constantes de cadeias pesada e leve humanas no lugar das sequências homólogas de murino (Patente U.S. No. 4.816.567; Morrison et al., 1984, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851) ou através de união covalente, à sequência de codificação de

imunoglobulina, de toda ou parte da sequência de codificação para o material de não-imunoglobulina (por exemplo, domínios de proteína). Tipicamente, tal material de não-imunoglobulina é substituído pelos domínios constantes de um anticorpo ou é substituído pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno tendo especificidade por um antígeno diferente.

Anticorpos humanizados e humanos

[00109] Um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido de uma fonte que é não-humana. Os resíduos de aminoácido não-humano são, frequentemente, referidos como resíduos "importados" e são, tipicamente, tomados de um domínio variável "importado". Humanização pode ser realizada seguindo o método geral de Winter et al. (Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536), através de substituição de CDRs ou sequências de CDR de roedor pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. No. 4.816.567), em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, anticorpos humanizados são, tipicamente, anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos não-humanos, por exemplo, de roedor.

[00110] A escolha de domínios variáveis humanos, leve e pesado, a serem usados ao fazer anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade. De acordo com o assim denominado método de "melhor

adaptação", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada contra uma biblioteca toda de sequências de domínio variável humano conhecidas. A sequência humana a qual está mais próxima daquela do roedor é, então, aceita como a estrutura principal (FR) humana para o anticorpo humanizado (Sims et al., 1987, J. Immunol. 151: 2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol. 196: 901). Outro método usa uma estrutura principal em particular derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura principal pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285; Presta et al., 1993, J. Immnol. 151: 2623).

[00111] É ainda importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade pelo antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para obter essa meta, de acordo com um método preferido, anticorpos humanizados são preparados através de um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais estão comumente disponíveis e são familiares para aqueles habilitados na técnica. Programas de computador estão disponíveis os quais ilustram e mostram prováveis estruturas conformacionais tridimensionais de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. Inspeção dessas visualizações permite análise do provável papel dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar a seu antígeno. Dessa forma, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir do recipiente e sequências importadas, de modo que a característica desejada do anticorpo, tal como afinidade aumentada pelo(s)

antígeno(s) alvo, seja obtida. Em geral, os resíduos de CDR estão direta e mais substancialmente envolvidos em influenciar a ligação ao antígeno.

[00112] A humanização de anticorpos é uma tarefa de manipulação de proteína direta. Quase todos os anticorpos de murino podem ser humanizados através de enxertagem de CDR, resultando na retenção de ligação a antígeno. Vide Lo, Benny, K.C., editor, em Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004.

[00113] Alternativamente, é agora possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, quando de imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada (JH) do anticorpo em camundongos mutantes para a linhagem germinativa e quiméricos resulta em inibição completa da produção de anticorpo endógeno. A transferência do arranjo de gene de imunoglobulina de linhagem germinativa humana para tais camundongos mutantes para linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos quando de estimulação com antígeno. Vide, por exemplo, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551; Jakobovits et al., 1993, Nature 362: 255-258; Bruggermann et al., 1993, Year in Immunology 7: 33; e Duchosal et al., 1992, Nature 355: 258. Anticorpos humanos também podem ser derivados de bibliotecas de phage display (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-597; Vaughan et al., 1996, Nature Biotech 14: 309).

Purificação de anticorpo

[00114] Quando do uso de técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico ou diretamente secretado no meio. Se o anticorpo é produzido intracelularmente, como uma primeira

etapa, os resíduos em partícula, sejam de células hospedeiras ou fragmentos submetidos à lise, são removidos, por exemplo, através de centrifugação ou ultrafiltração. Carter et al., 1992, Bio/Technology 10: 163-167 descrevem um procedimento para isolamento de anticorpos os quais são secretados no espaço periplásmico de E. coli. Resumidamente, a pasta de células é descongelada na presença de acetato de sódio (pH de 3,5), EDTA e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) durante cerca de 30 min. Os resíduos de célula podem ser removidos através de centrifugação. Onde o anticorpo é secretado no meio, sobrenadantes de tais sistemas de expressão são, geralmente, primeiro concentrados usando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer uma das etapas precedentes para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

[00115] A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada, por exemplo, usando cromatografia em hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia por afinidade, com cromatografia por afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer região Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo. Proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas .gama.1, .gama.2 ou .gama.4 humanas (Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62: 1-13). Proteína G é recomendada para todos os isotipos de camundongo e para .gama.3 humana (Guss et al., 1986, EMBO J 5: 15671575). A matriz à qual o ligante de afinidade é preso é, mais frequentemente, agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro com poro controlado ou (poli)estirenodivinil benzeno, permitem taxas de fluxo

mais rápidas e tempos de processamento mais curtos do que pode ser obtido com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio CH3, a resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteína, tais como fracionamento sobre uma coluna de troca de íons, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia sobre sílica, cromatografia sobre heparina, cromatografia em SEPHAROSETM sobre uma resina de troca de ânions ou cátions (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocalização, SDS-PAGE e precipitação com sulfato de amônio, também estão disponíveis, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

[00116] Em uma modalidade, a glicoproteína pode ser purificada usando adsorção sobre um substrato de lectina (por exemplo, uma coluna de afini-dade por lectina) para remover glicoproteína contendo fucose do preparado e, desse modo, enriquecer por glicoproteína sem fucose.

Formulações farmacêuticas

[00117] A invenção compreende formulações farmacêuticas de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento de anticorpo da invenção. Para preparar composições farmacêuticas ou estéreis, o anticorpo ou fragmento do mesmo é misturado com um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável. Vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences e U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Formulações de agentes terapêuticos e diagnósticos podem ser preparadas através de mistura com veículo, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis na forma, por exemplo, de pós liofilizados, pastas fluidas, soluções ou suspensões aquosas (vide, por exemplo, Hardman et al. (2001) Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science e Practice de Pharmacy, Lippincott, Williams e

Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dek-ker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Do-sage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner e Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

[00118] A toxicidade e eficácia terapêutica das composições de anticorpo, administradas isoladamente ou em combinação com um agente imunossupressor, podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de célula ou animais experimentais, por exemplo, para determinação da LD50 (a dose letal para 50% da população) e da ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A proporção de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a proporção entre a LD50 e ED50. Os dados obtidos a partir desses ensaios de cultura de célula e estudos com animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dose para uso em seres humanos. A dosagem de tais compostos repousa, de preferência, dentro de uma faixa de concentrações em circulação que incluem a ED50, com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode várias dentro dessa faixa, dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada.

[00119] Vias adequadas de administração incluem administração parenteral, tal como administração intramuscular, intravenosa ou subcutânea e administração oral. A administração do anticorpo usado na composição farmacêutica ou prática do método da presente invenção pode ser realizada através de uma variedade de formas convencionais, tais como ingestão oral, inalação, aplicação tópica ou injeção cutânea, subcutânea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial ou intravenosa. Em uma modalidade, o composto de

ligação da invenção é administrado intravenosamente. Em outra modalidade, o composto de ligação da invenção é administrado subcutaneamente,

[00120] Alternativamente, pode-se administrar o anticorpo de uma m-neira local ao invés de sistêmica, por exemplo, via injeção do anticorpo diretamente no local de ação, frequentemente em uma formulação com liberação sustentada ou depósito. Além disso, pode-se administrar o anticorpo em um sistema de distribuição de fármaco alvejado.

[00121] Orientação quanto à seleção de doses apropriadas de anticorpos, citocinas e pequenas moléculas está disponível (vide, por exemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltda, Oxfords-hire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) New Engl. J. Med. 348: 601-608; Milgrom et al. (1999) New Engl. J. Med. 341: 1966-1973; Slamon et al. (2001) New Engl. J. Med. 344: 783-792; Beniaminovitz et al. (2000) New Engl. J. Med. 342: 613-619; Ghosh et al. (2003) New Engl. J. Med. 348: 24-32; Lipsky et al. (2000) New Engl. J. Med. 343: 1594-1602).

[00122] Determinação da dose apropriada é feita pelo médico, por exemplo, usando parâmetros ou fatores conhecidos ou suspeitos na técnica de afetar o tratamento ou previstos como afetando o tratamento. Geralmente, a dose começa com uma quantidade um pouco menor do que a dose ótima e é aumentada em pequenos incrementos após o que, até que o efeito desejado ou ótimo seja objetivo com relação a quaisquer efeitos colaterais negativos. Medidas diagnósticas importantes incluem aquelas dos sintomas, por exemplo, de inflamação ou nível de citocinas inflamatórias produzidas.

[00123] Anticorpos, fragmentos de anticorpo e citocinas podem ser

fornecidos através de infusão contínua ou em doses em intervalos, por exemplo, de um dia, uma semana ou 1-7 vezes por semana. As doses podem ser fornecidas intravenosamente, subcutaneamente, intraperitonealmente, cutaneamente, topicamente, oralmente, nasalmente, retalmente, intramuscularmente, intracerebralmente, intraespinhalmente ou através de inalação. Um protocolo de dose preferido é um envolvendo a dose máxima ou frequência de dose que evita efeitos colaterais indesejáveis significativos. Uma dose semanal total é, geralmente, pelo menos 0,05 μg/kg de peso corporal, mais geralmente pelo menos 0,2 μg/kg, ainda mais geralmente pelo menos 0,5 μg/kg, tipicamente pelo menos 1 μg/kg, mais tipicamente pelo menos 10 μg/kg, ainda mais tipicamente pelo menos 100 μg/kg, de preferência pelo menos 0,2 mg/kg, mais preferivelmente pelo menos 1,0 mg/kg, ainda mais preferivelmente pelo menos 2,0 mg/kg, otimamente pelo menos 10 mg/kg, mais otimamente pelo menos 25 mg/kg e, ainda mais otimamente, pelo menos 50 mg/kg (vide, por exemplo, Yang et al. (2003) New Engl. J. Med. 349: 427-434; Herold et al. (2002) New Engl. J. Med. 346: 1692-1698; Liu et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67: 451-456; Portielji et al. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 133-144). A dose desejada de um produto terapêutico de pequena molécula, por exemplo, um mimético peptídico, produto natural ou produto químico orgânico, é cerca da mesma conforme para um anticorpo ou polipeptídeo, em uma base de mol/kg.

[00124] Conforme usado aqui, "inibir" ou "tratar" ou "tratamento" inclui uma prorrogação do desenvolvimento dos sintomas associados a uma doença e/ou uma redução na gravidade de tais sintomas que se desenvolverão ou se espera que sejam desenvolvidos com a referida doença. Os termos ainda incluem alívio dos sintomas existentes, prevenção de sintomas adicionais e alívio ou prevenção das causas subjacentes de tais sintomas. Assim, os termos denotam que um resultado benéfico foi conferido a um vertebrado com uma

doença.

[00125] Conforme usado aqui, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de um anticorpo anti-PD-1 ou fragmento do mesmo que, quando administrada sozinha ou em combinação com um agente terapêutico adicional a uma célula, tecido ou indivíduo, é eficaz para prevenir ou aliviar a doença ou condição a ser tratada. Uma dose terapeuticamente eficaz ainda se refere àquela quantidade do composto suficiente para resultar em alívio de sintomas, por exemplo, tratamento, cura, prevenção ou alívio da condição médica relevante ou um aumento na taxa de tratamento, cura, prevenção ou alívio de tais condições. Quando aplicada a um ingrediente ativo individual administrado isoladamente, uma dose terapeuticamente eficaz refere-se a esse ingrediente apenas. Quando aplicada a uma combinação, uma dose terapeuticamente eficaz refere-se a quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, seja administradas em combinação, serial ou simultaneamente. Uma quantidade eficaz de produto terapêutico diminuirá os sintomas, tipicamente, em pelo menos 10%; usualmente em pelo menos 20%; de preferência em pelo menos cerca de 30%; mais preferivelmente em pelo menos 40% e, ainda mais preferivelmente, em pelo menos 50%.

[00126] Métodos para coadministração ou tratamento com um segundo agente terapêutico são bem conhecidos na técnica, vide, por exemplo, Hardman et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole e Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner e Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA.

[00127] A composição farmacêutica da invenção pode também conter

outro agente incluindo, mas não limitado a, um agente citotóxico, citostático, antiangiogênico ou antimetabólito, um agente tumor-alvejado, um agente de estimulação imune ou modulação imune ou um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, citostático ou de outro modo tóxico. A composição farmacêutica pode também ser empregada com outras modalidades terapêuticas, tais como cirurgia, quimioterapia e radiação.

[00128] Indivíduos veterinários, experimentais ou de pesquisa típicos incluem macacos, cães, gatos, ratos, camundongo, coelhos, porcos-da-índia, cavalos e seres humanos.

Usos terapêuticos para o anticorpo e fragmentos de anticorpo da invenção

[00129] O anticorpo ou fragmentos de ligação a antígeno da invenção, os quais se ligam especificamente ao PD-1 humano, podem ser usados para aumentar, intensificar, estimular ou super-regular uma resposta imune. Os anticorpos e fragmentos de anticorpo da invenção são particularmente adequados para tratamento de indivíduos tendo um distúrbio que pode ser tratado através de aumento da resposta imune mediada por células T. Indivíduos preferidos incluem pacientes humanos que precisam de intensificação de uma resposta imune.

Câncer

[00130] O anticorpo ou fragmentos de ligação a antígeno da invenção podem ser usados para tratar câncer (isto é, inibir o crescimento ou sobrevivência de células tumorais). Cânceres preferidos cujo crescimento pode ser inibido usando os anticorpos da invenção incluem cânceres tipicamente responsivos à imunoterapia, mas também cânceres que não foram, até o momento, associados à imunoterapia. Exemplos não limitativos de cânceres preferidos para tratamento incluem melanoma (por exemplo, melanoma maligno metastático), câncer renal (por exemplo, carcinoma de células renais),

câncer de próstata (por exemplo, adenocarcinoma de próstata resistente a hormônio), adenocarcinoma pancreático, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de células não pequenas), câncer esofageal, carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, câncer de fígado, câncer ovariano, câncer cervical, câncer da tiroide, glioblastoma, glioma, leucemia, linfoma e outras malignidades neoplásicas. Adicionalmente, a invenção inclui malignidades resistentes ou recorrentes cujo crescimento pode ser inibido usando os anticorpos da invenção.

[00131] O anticorpo ou fragmentos de anticorpo da invenção podem ser usados isoladamente ou em combinação com: outros agentes anti-neoplásicos ou agentes imunogênicos (por exemplo, células cancerígenas atenuadas, antígenos tumorais (incluindo proteínas recombinantes, peptídeos e moléculas de carboidrato), células que apresentam antígeno, tais como células dendríticas pulsadas com antígeno ou ácidos nucleicos derivados de tumor, citocinas de estimulação imune (por exemplo, IL-2, IFNa2, GM-CSF) e células transfectadas com genes que codificam citocinas de estimulação imune tais como, mas não limitado a, GM-CSF); tratamentos padrões para o câncer (por exemplo, quimioterapia, radioterapia ou cirurgia); ou outros anti-corpos (incluindo, mas não limitado a, anticorpos ao VEGF, EGFR, Her2/neu, receptores de VEGF, outros receptores de fator de crescimento, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4- IBB e ICOS).

Doenças infecciosas

[00132] O anticorpo ou fragmentos de anticorpo da invenção também podem ser usados para prevenir ou tratar infecções e doença infecciosa. O anticorpo ou fragmentos de anticorpo podem ser usados isoladamente ou em combinação com vacinas, para estimular a resposta imune a patógenos, toxinas e auto-antígenos. Os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos podem ser usados para estimular uma resposta imune a vírus

infecciosos em seres humanos tais como, mas não limitado a, vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite das classes A, B e C, vírus de Epstein Barr, citomegalovírus humano, papiloma vírus humano, vírus do herpes. Os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos podem ser usados para estimular uma resposta imune à infecção por parasitas bacterianos ou fúngicos e outros patógenos.

Adjuvante de vacinação

[00133] O anticorpo ou fragmentos de anticorpo da invenção podem ser usados em conjunto com outras proteínas recombinantes e/ou peptídeos (tais como antígeno tumorais ou células cancerígenas) de forma a aumentar uma resposta imune a essas proteínas (isto é, em um protocolo de vacinação).

[00134] Por exemplo, anticorpos anti-PD-1 e fragmentos de anticorpo dos mesmos podem ser usados para estimular respostas imune antígeno-específicas através de coadministração de um anticorpo anti-PD-1 com um antígeno de interesse (por exemplo, uma vacina). Consequentemente, em outro aspecto, a invenção proporciona um método de intensificação de uma resposta imune a um antígeno em um indivíduo compreendendo administração, ao indivíduo: (i) do antígeno; e (ii) um anticorpo anti-PD-1 da invenção ou porção de ligação a antígeno do mesmo, de modo que uma resposta imune ao antígeno no indivíduo seja intensificada. O antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno de um patógeno. Exemplos não limitativos de tais antígenos incluem, sem limitação, antígenos tumorais ou antígenos de vírus, bactérias ou outros patógenos.

Doenças mediadas por Th2

[00135] Os anticorpos anti-PD-1 e fragmentos de anticorpo da invenção podem também ser usados para tratar doenças mediadas por Th2, tais como asma e alergia. Isso é baseado na descoberta de que os anticorpos da invenção

podem ajudar a induzir a uma resposta de Th1. Assim, os anticorpos da invenção podem ser usados em doenças mediadas por Th2 para gerar uma resposta imune mais equilibrada.

Ativação ex vivo de células T

[00136] Os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da invenção também podem ser usados para a ativação e expansão *ex vivo* de células T antígeno-específicas e transferência adotiva dessas células em recipientes de forma a aumentar as células T antígeno-específicas contra tumor. Esses métodos podem também ser usados para ativar respostas de células T a agentes infecciosos, tal como CMV. Pode ser esperado que a ativação *ex vivo* na presença de anticorpos anti-PD-1 aumente a frequência e atividade das células T adotivamente transferidas.

Outras terapias combinadas

[00137] Conforme previamente descrito, os anticorpos anti-PD-1 da invenção podem ser coadministrados com um ou mais de outros agentes terapêuticos, por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressor. O anticorpo pode ser ligado ao agente (como um imunocomplexo) ou podem ser administrados separadamente do agente. No último caso (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, após ou concorrentemente com o agente ou pode ser coadministrado com outras terapias conhecidas.

[00138] Os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da invenção podem também ser usados para aumentar a eficácia de células T específicas a tumor enxertado.

Usos não-terapêuticos para o anticorpo e fragmentos de anticorpo da invenção

[00139] Um mercado para anticorpos anti-PD-1 para usos não terapêuticos já existe, conforme demonstrado pelas vendas comerciais de

anticorpos monoclonais anti-hPD-1 J116 e J105 vendidos pela eBioscience de San Diego, Califórnia, EUA, para uso em análise citométrica de fluxo, imunohistoquímica e ensaios funcionais in vitro; e o mab1086, um anticorpo monoclonal anti-hPD-1 vendido pela R&D Systems de Minneapolis, MN, EUA, para uso em citometria de fluxo, Western blots e ELISA. Os anticorpos da invenção podem ser usados para qualquer finalidade não terapêutica agora realizada pelo J116, J105 e/ou Mab1086.

[00140] O anticorpo da invenção pode ser usado como um agente de purificação por afinidade.

[00141] O anticorpo pode também ser útil em ensaios diagnósticos, por exemplo, para a detecção de expressão de PD-1 em células, tecidos ou soro específico. Para aplicações diagnósticas, o anticorpo será, tipicamente, rotulado (seja direta ou indiretamente) com uma porção detectável. Numerosos rótulos estão disponíveis, os quais podem ser geralmente agrupados nas seguintes categorias: rótulos de fluorocromo, radionuclídeos, enzimas, iodo e biossintéticos.

[00142] O anticorpo da presente invenção pode ser empregado em qualquer método de ensaio conhecido, tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche diretos e indiretos e ensaios de imunoprecipitação. Zola, Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques, páginas 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[00143] O anticorpo pode também ser usado para ensaios diagnósticos in vivo. Geralmente, o anticorpo é rotulado com um radionuclídeo (tal como 111In, 99Tc, 4C, 31I, 125I, 3H, 32P 35S ou 18F), de modo que o antígeno ou células expressando o mesmo podem ser localizadas usando imunocintiografia ou tomografia por emissão de pósitron.

Depósito de Materiais

[00144] Os constructos de DNA que codificam as regiões variáveis das cadeias pesada e leve dos anticorpos humanizados h409A11, h409A16 e h409A17 foram depositados com a American Type Culture Collection Patent Depository (10801 University Blvd., Manassas, VA). O plasmídeo contendo o DNA que codifica a cadeia pesada de h409A-11, h409A-16 e h409A-17 foi depositado em 9 de Junho de 2008 e identificado como 081469_SPD-H. O plasmídeo contendo o DNA que codifica a cadeia leve de h409A11 foi depositado em 9 de Junho de 2008 e identificado como 0801470_SPD-L-11. O plasmídeo contendo o DNA que codifica a cadeia leve de h409A16 foi depositado em 9 de Junho de 2008 e identificado como 0801471_SPD-L-16. O plasmídeo contendo o DNA que codifica a cadeia leve de h409A17 foi depositado em 9 de Junho de 2008 e foi designado 0801472_SPD-L-17. Os depósitos foram feitos sob as condições do Budapest Treaty under Internati-onal Recognition of the Deposit de Microorganisms for the Purpose de Patent Procedure e as Regulamentações sob o mesmo (Tratado de Budapeste).

[00145] A especificação por escrito precedente é considerada como sendo suficiente para permitir que aqueles habilitados na técnica pratiquem a invenção. A presente invenção não está limitada, quanto ao escopo, pela cultura depositada, uma vez que a modalidade depositada se destina a ser apenas uma ilustração de um aspecto da invenção e qualquer cultura que é funcionalmente equivalente está dentro do escopo da presente invenção. O depósito de material aqui não constitui uma admissão de que a descrição por escrito aqui contida é inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto da invenção, incluindo o melhor modo da mesma, nem deve ser construído como limitando o escopo das reivindicações à ilustração que ela representa. Na verdade, várias modificações da invenção, além daquelas mostradas e descritas aqui, se tornarão evidentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição

precedente e caem dentro do escopo das reivindicações em anexo.

[00146] A invenção se tornará mais completamente entendida através de referência aos exemplos a seguir. Contudo, eles não devem ser construídos como limitando o escopo da presente invenção. Todas as citações de literatura e patente mencionadas aqui são expressamente incorporadas por referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Imunização e seleção de anticorpos anti PD-1 Imunização de camundongos com DNA de hPD-1

[00147] Para gerar anticorpos contra o receptor PD-1 humano ('hPD-1'), um cDNA que codifica a fase de leitura aberta do receptor hPD-1 humano foi obtido através de PCR e subclonado no vetor pcDNA3.1 (Invitrogen, Car-lsbad, CA). Em seguida, células CHO-K1 foram estavelmente transfectadas com hPD-1 e a expressão foi monitorada usando citometria de fluxo. Clones de CHO-K1 foram isolados expressando PD-1 humano sobre suas membranas e denominados CHO-hPD1.

[00148] Os camundongos foram imunizados através de imunização com uma pistola de gene usando uma pistola de gene Helios (BioRad) e balas de ouro revestidas com DNA (BioRad) seguindo as instruções dos fabricantes. Resumidamente, 1 μm de partículas de ouro foi revestido com cDNA de hPD-1 (clonado no pcDNA3.1) e, onde indicado, vetores de expressão co-merciais para Flt3L de camundongo e GM-CSF de camundongo em uma proporção de 2:1:1 (ambos da Aldevron, Fargo ND). Um total de 1 μg de DNA de plasmídeo foi usado para revestir 500 μg de balas de ouro.

[00149] Especificamente, camundongos BALB/C fêmeas de 7-8 semanas de idade foram imunizados sobre a orelha através de uma pistola de gene, recebendo 2, 3 ou 4 ciclos de uma dose em ambas as orelhas (vide Tabela I). Um camundongo recebeu um reforço final com 5 x 106 células CHO-hPD1 na poço

peritoneal. Aproximadamente, uma titulação de anti-hPD-1 de 1:1000 foi detectável no soro do camundongo após duas imunizações com DNA através de ELISA de células usando células CHO-hPD-1 versus células parentais CHO-K1. Quatro dias após a imunização final, os camundongos foram sacrificados e populações de célula do baço desprovidas de eritrócitos foram preparadas conforme previamente descrito (Steen-bakkers et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134) e congeladas a -140°C.

Tabela I. Esquema de imunização usado para induzir titulações de anticorpo específico ao hPD-1 em camundongos Balb/c

	Semana 1	Semana 4	Semana 7
Camundongo 730	2 doses de hPD1 pCDNA3.1	2 doses de hPD1 pCDNA3.1	
Camundongo 731	2 doses de hPD1 pCDNA3.1	4 doses de hPD1 pCDNA3.1	
Camundongo 738	2 doses de hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)	2 doses de hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)	2 doses de hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)

Tabela I. –continuação-

	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11
Camundongo 730	2 doses de hPD1 pCDNA3.1	Coleta de células do baço		
Camundongo 731		5 milhões de CHO-hPD1	Coleta de células do baço	
Camundongo 738			2 doses de hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + mGM-CSF)	Coleta de células do baço

Seleção de células B que produzem anticorpo anti-PD-1

[00150] Para selecionar clones de células B que produzem anticorpos anti-PD-1 humano, 2 x 10^7 células de baço desprovidas de eritrócito de camundongos imunizados com DNA de hPD-1, isto é, camundongo 730, 731 e 738 (vide Tabela I), foram combinadas para uma cultura de células B. As células de baço foram incubadas em DMEM/HAM's F12/Soro de Cabra a 10% (Hyclone, Logan, UT, EUA) durante uma hora a 37°C em um frasco de cultura de plástico para remover os monócitos. As células não aderentes foram submetidas a um ciclo de *panning* negativo sobre células CHO-K1, seguido por *panning* positivo sobre células CHO-hPD1. Ambos os procedimentos de seleção foram realizados durante uma hora a 37°C sobre cultura em crescimento confluente em discos de Petri de 21 cm^2 ou frascos de cultura T25 (as culturas de célula foram irradiadas antes de uso, até uma dose total de 2000 RAD). Após o *panning* positivo, as células não ligadas foram removidas através de lavagem dez vezes com PBS suplementado com $CaCl_2.2H_2O$ a 0,132% e $MgCl_2.6H_2O$ a 0,1%. Finalmente, as células B ligadas foram coletadas através de tratamento com tripsina.

[00151] Células B selecionadas foram cultivadas e imortalizadas conforme

descrito em Steenbakkers et al., 1994, *Mol. Biol. Rep*. 19: 125-134. Resumidamente, células B selecionadas foram misturadas com sobrenadante de células T a 7,5% (v/v) e 50.000 células *nursing* EL-4 B5 irradiadas (2.500 RAD) em um volume final de 200 µL de DMEM/HAM's F12/Soro Bovino de Cabra a 10%, em lâminas de cultura tecidual com fundo redondo com 96 poços. No dia oito, os sobrenadantes foram selecionados com relação à sua reatividade anti-hPD-1 através de um ELISA de células CHO-hPD-1 usando o seguinte procedimento. Células CHO-K1 e CHO-hPD1 foram cultivadas através de confluência em lâminas com fundo plano com 96 poços em 50 µL de DMEM/HAM'S F12, FBS a 10%. Em seguida, 50 µL de sobrenadante contendo imunoglobulina foram adicionados durante 1 h a 37°C. Após três lavagens com PBS-Tween, 100 µL (diluído a 1:1000) de peroxidase de armorácia anti-camundongo de cabra (HRP, Southern, Birmingham, AL, EUA) em DMEM/HAM'S F12/FBS a 10% foram adicionados durante 1 hora a 37°C. Após três lavagens com PBS-Tween, as imunoglobulinas imobilizadas foram visualizadas com UPO/TMB (Biomerieux, Boxtel, Países Baixos).

[00152] A partir dessa cultura de células B, 13 sobrenadantes reativos ao hPD-1 foram identificados e mostrados inibir a ativação de células T de Jurkat quando imobilizados sobre plástico e clones de células B de poços positivas foram imortalizados através de minieletrofusão seguindo procedimentos publicados (Steenbakkers et al., 1992, *J. Immunol. Meth*. 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, *Mol. Biol. Rep*. 19: 125-134). Especificamente, células B foram misturadas com 10^6 células de mieloma NS-1 e soro foi removido através de lavagem com DMEM/HAM's F12. Em seguida, as células foram tratadas com solução Pronase durante três minutos e subsequentemente lavadas com meio de fusão. Eletrofusão foi realizada em uma câmara de fusão de 50 µL através de um campo elétrico alternado de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm, seguido por um pulso

de alto campo quadrado de 10 µs, 3 kV/cm e, novamente, um campo elétrico alternado de 30 s, 2 MHz, 400 V/cm. Finalmente, o conteúdo da câmara de fusão foi transferido para meio de seleção de hibridoma e colocado em uma lâmina com 96 poços sob condições de diluição limitativa. No dia 14 após fusão, as culturas foram examinadas com relação ao crescimento do hibridoma e selecionadas com relação à presença de reatividade de anticorpo ao hPD-1. Esse procedimento proporcionou cinco hibridomas anti-hPD-1 diferentes, denominados hPD-1.05A, hPD-1.06B, hPD-1.08A, hPD-1.09A e hPD-1.13A, que foram subclonados através de diluição limitativa para resguardar sua integridade e ainda cultivados para produzir anticorpo. Os sobrenadantes obtidos desses hibridomas inibiu fortemente a produção de IL-2 pelas células Jurkat E6.2.11 quando de estimulação com anti-CD3/anti-CD28 (vide Figura 1 e texto abaixo).

[00153] Células Jurkat E6.1 (American Type Culture Collection) foram subclonadas através de diluição limitativa usando metodologia padrão e subclones foram testados com relação à capacidade intensificada de produzir IL-2 quando de ligação cruzada de CD3 e CD28. Um subclone de alta produção de IL-2 foi obtido e subsequentemente denominado Jurkat E6.2.11 e usado em outros ensaios. Lâminas de ensaio com 96 poços Cos-tar 3370 foram revestidas durante a noite a 4°C com 5 µg/mL de anti-Ig de camundongo de ovelha (SAM). Excesso de SAM foi removido e as lâminas foram bloqueadas durante 1 h em temperatura ambiente com 200 µL/poço de PBS/Soro Bovino Fetal a 10%. Após três lavagens com PBS, as poços foram revestidas com 100 µL/poço de anti-CD3 (OKT3; 10 ou 60 ng/mL) durante 1 h a 37°C. Após três lavagens com PBS, 50 µL/poço de PBS/Soro Bovino Fetal a 10% e 50 µL/poço de sobrenadante de hibridoma ou células B foram adicionados durante 30 min a 37°C. Após três lavagens com PBS, 120 µL/poço de suspensão de células, células Jurkat E6.2.11 (2 x 105 células/poço + 0,5 µg/mL de anti-CD28 (Sanquin No M1650, Central

Laboratory for Bloodtransfusion, Amsterdam, NL) em DMEM/F12/Soro Bovino Fetal a 10%) foram adicionados. Após 6 h de cultura, o sobrenadante foi examina-do com relação à produção de IL-2 usando um ELISA em sanduíche padrão com pares de anticorpo de detecção biotinilado e de captura de anti-hIL-2 da Pharmingen e Peroxidase de Armorácia-Estreptavidina (Southern Biotech) como um reagente de detecção. Para determinar a potência desses anticor-pos quando comparado ao PD-L1, um pequeno grupo de mAbs foi produzido em uma escala maior. Os mAbs foram purificados usando cromatografia por afinidade de Proteína G (vide Exemplo 2). Os anticorpos purificados, hPD-L1/Fc (quimera de B7-H1/Fc humana recombinante, R&D systems) ou IgG1 kappa de camundongo (da Sigma) como um controle negativo foram revestidos em concentrações idênticas sobre lâminas com anti-CD3, conforme descrito acima. Células Jurkat E6.2.11 e anti-CD28 foram adicionados durante seis horas e a ativação de células T foi medida pela IL-2 produzida no sobrenadante. Dois dos anticorpos (hPD1.08A e hPD1.09A) mostraram uma inibição 8-10 vezes mais potente comparado com PD-L1/Fc imobilizado.

Exemplo 2: purificação e caracterização de anticorpos anti-PD-1 de murino

Estabilização de hibridomas que produzem anti-PD-1 e purificação de anti-corpos anti-PD-1

[00154] Populações de células clonais foram obtidas para cada um dos hibridomas submetendo os mesmos a múltiplos ciclos (>4) de diluição limitativa. Células de hibridoma estáveis foram, então, cultivadas sob condições isentas de soro usando bioreatores CELLine (Integra-biosciences) durante seis a oito dias. As células foram cultivadas na câmara interna em meio isento de soro em uma densidade de 3 x 10^6 c/mL em 15 mL e expandidas para aproximadamente 4 x 10^7 c/mL durante oito dias. A câmara externa foi enchida com meio suplementado com BCS a 10% (soro bovino de cabra). Nos dias seis a oito, a

cultura na câmara interna foi coletada, lavada com 15 mL de meio SF e reinoculadas com células de hibridoma. O sobrenadante no bioreator e a lavagem foram combinados e clarificados através de centrifugação. O sobrenadante resultante foi filtrado através de uma membrana com filtro de 0,22 µM. Para purificação de anticorpo, os sobrenadantes foram diluídos a 1:1 em tampão de ligação com alto teor de sal (Glicina a 1M/NaCl a 2M, pH de 9,0) e os mAbs foram purificados usando uma coluna Protein G HiTrap de 5 mL (GE healthcare). Após lavagem com PBS, os anticorpos ligados foram eluídos usando Glicina a 0,1 M, pH = 2,7, seguido por neutralização do pH usando Tris a 3 M. Finalmente, o tampão foi trocado para PBS usando colunas de filtração em gel PD-10 (GE healthcare) e os anticorpos foram concentrados usando aparelhos de concentração centrífuga Ultra-15 (Amicon) e quantificados usando espectrofotometria.

Anticorpos comerciais

[00155] Os seguintes anticorpos comerciais foram usados em vários estudos descritos aqui: anticorpo anti-PD-1 clone J116 (No 14-9989) foi adquirido da eBioscience. Anti-CTLA-4 clone 14D3 (mAb 16-1529) foi adquirido da eBioscience. Anti-PD-1 clone 192106 (mAb1086) foi adquirido da R&D systems (No mAb1086). Anticorpo de controle de isotipo mIgG1, kappa, clone MOPC21 foi adquirido da Sigma (No M9269). Controles de isotipo de mIgG1 kappa (mAb 16-4714) e IgG2a kappa (mAb 16-4724) foram adquiridos da eBioscience.

Análise de ligação

[00156] Experimentos ELISA proteína-baseados e célula-baseados (‘CELISA’) foram usados para determinar as afinidades de ligação evidentes (reportadas como valores de EC50). Em alguns casos, a ligação dos anticorpos anti-PD-1 foi comparada com aquela dos anticorpos comerciais anti-PD-1 J116

(eBiosciences) e Mab1086 (R&D systems).

[00157] Um ELISA de proteína foi usado para determinação da ligação relativa de anticorpos ao PD-1 humano/Fc. hPD-1/Fc (R & D Systems) foi imobilizado sobre placas com 96 poços Maxisorp (Nunc) através de incubação durante 4 h em temperatura ambiente (ou durante a noite a 4°C). Sítios de ligação não específica foram bloqueados através de incubação com BSA a 3% em PBST durante uma hora em temperatura ambiente. Após revestimento, as lâminas foram lavadas três vezes com PBST. Diluições de anticorpos anti-PD-1 foram preparadas em tampão de ligação (PBS contendo Tween 20 a 0,1% e BSA a 0,3%) e incubadas com a proteína de fusão imobilizada por uma hora a 25°C. Após ligação, as placas foram lavadas três vezes com PBST, incubadas durante uma hora a 25°C com anti-IgG de camundongo de cabra peroxidase-rotulado (Southern Biotech) diluído a 1/4.000 em tampão de ligação, lavadas novamente e reveladas usando TMB. Os resultados do ELISA são mostrados na Figura 2. A concentração da ligação meio-máxima é reportada como uma medida de afinidade de ligação relativa (Tabela II).

[00158] Ligação a células CHO-hPD-1 foi também avaliada através de CELISA. Para CELISA, células CHO-hPD-PD-1 foram cultivadas até 80 a 100 por cento de confluência em 50 µL de meio de cultura (DMEM/HAM'S F12, FBS a 10%). Em seguida, 50 µL de meio contendo várias concentrações de mAb purificado foram adicionados durante uma hora a 37°C. Após três lavagens com PBS-Tween, 100 µL de anticorpo de cabra anti-HRP de camundongo (Southern Biotech cat No 1030-05) (diluído a 1:1000 em meio de cultura) foram adicionados durante uma hora a 37°C. Após três lavagens adicionais com PBS-Tween, imunoglobulinas imobilizadas foram visualizadas com substrato de peroxidase colorimétrico TMB (BD Biosciences). O aumento de absorbância em virtude da atividade de peroxidase (450 nm) foi medido em um leitor de placa

de microtitulação. A Figura 2 mostra a relação de dose-resposta e ligação para os anticorpos hPD-1.08A e hPD-1.09A. Os resultados dos estudos de ligação de proteína e célula são resumidos na Tabela II.

Análise cinética através de interferometria bioluminosa (ForteBio)

[00159] Para caracterizar adicionalmente as características de ligação dos anticorpos, cada um teve o perfil caracterizado usando interferometria bioluminosa sobre o sistema Octet (ForteBio, Menlo Park, CA) para elucidar a cinética de ligação e calcular as constantes de ligação em equilíbrio. Esse ensaio foi realizado através de acoplamento da proteína de fusão PD-1-Fc (R&D Systems) a biosensores amina-reativos (Fortebio) usando química-padrão de amina. Ligação e dissociação do mAb anti-PD-1 dos biosensores foi, então, observada em várias concentrações de anticorpo. especificamente, biosensores amina-reativos foram pré-umedecidos através de imersão dos mesmos em poços contendo MES a 0,1M, pH = 5,5 durante 5 minutos. Os biosensores foram, então, ativados usando uma mistura de NHS a 0,1M / EDC a 0,4M durante 5 minutos. A proteína de fusão PD-1/Fc (R & D systems) foi acoplada através de imersão dos biosensores em uma solução de 12 ug/mL de PD-1/Fc em MES a 0,1M durante 7,5 minutos. A superfície do biosensor foi resfriada usando uma solução de etanolamina a 1M durante 5 minutos. Os biosensores foram equilibrados em PBS durante 5 minutos. A associação de mAbs anti-PD-1 foi observada colocando os biosensores em poços contendo várias concentrações de anticorpo (anticorpo purificado a 10-80 nM, >99% através de SDS-PAGE em PBS) e monitorando a interferometria durante 30 minutos. A dissociação foi medida após transferência dos biosensores para PBS e monitorando o sinal de interferometria durante 60 minutos. As taxas on e off observadas (kobs e kd) foram adaptadas usando um modelo de adaptação global de ligação a 1:1 compreendendo todas as concentrações testadas e a constante de ligação em

equilíbrio, KD, foi calculada. Os resultados do estudo de cinética são apresentados na Tabela II e Figura 6 abaixo.

Tabela II. Sumário de caracterização bioquímica de mAbs anti-PD-1 de murino

	Análise de ligação		Bloqueio de ligante			Análise cinética		
	ELISA	CELISA	FACS	FMAT		Fortebio Octet		
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	IC_{50} (pM)	IC_{50} (pM)		k_{assoc}	k_{dissoc}	K_D
mAb	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L1	PD-L2	1/s	1/Ms	M
05A	338		15			1,62E+05	1,11E-04	6,90E-10
06B	135		160			8,32E+04	9,74E-05	1,17E-09
08A	76	79	0,9	0,73	2,1	1,25E+06	3,03E-05	2,41E-11
09A	123	113	0,8	0,90	1,7	1,64E+06	3,60E-05	2,20E-11
13A	485		64			1,46E+05	4,16E-04	2,85E-09
J116	410	349	106	>100	44	8,24E+04	1,50E-04	1,82E-09
mAb1086	59	>10000	>10000	>10000	>10000	2,45E+05	1,68E-04	6,86E-10

[00160] Dois dos anticorpos monoclonais, hPD-1.08A e hPD-1.09A, se ligam consideravelmente mais fortemente do que qualquer outro mAb testado usando esse ensaio, com a K_D determinada como sendo de 24 e 22 pM para hPD-1.08A e hPD-1.09A, respectivamente. Comparado com outros anticorpos anti-PD-1 testados, a afinidade aumentada é em virtude de uma *off-rate* mais lenta e *on-rate* significativamente mais rápida para hPD-1.08A e hPD-1.09A.

Bloqueio de ligante

[00161] Bloqueio de ligação a ligante foi estudado usando citometria de fluxo. Células CHO expressando PD-1 humano foram dissociadas de frascos de cultura aderentes e misturadas com concentrações variadas de anticorpo anti-PD-1 e uma concentração constante (600 ng/mL) de proteína de fusão hPD-L1/Fc não rotulada ou PD-L2/Fc humana recombinante (ambas da R&D Systems) em uma placa com 96 poços. A mistura foi equilibrada durante 30 minutos sobre gelo, lavada três vezes com tampão de FACS (PBS contendo BCS a 1% e azida de sódio a 0,1%) e incubada com anticorpo de cabra anti-Fc humano FITC rotulado durante mais 15 minutos sobre gelo. As células foram lavadas novamente com tampão de FACS e analisadas através de citometria de fluxo. Os dados foram analisados com o Prism (Gra-phPad Software, San Diego, CA) usando regressão não linear e os valores de IC_{50} foram calculados.

[00162] Os dados de IC_{50} calculados são resumidos na Tabela II. Os anticorpos 05A, 06B e 13A foram determinados como demonstrando uma KD entre 600 pM e 3 nM para a ligação de hPD-1. A despeito da ligação forte, esses anticorpos demonstraram, cada um, uma IC50> 10 nM para o bloqueio de ligação de hPD-L1 ao hPD-1. O anticorpo anti-PD-1 comercialmente disponível J116 (eBiosciences) competiu fracamente com PD-L1 pela ligação, tendo uma IC_{50} calculada fora da faixa desse experimento (>100 nM). IgG1 de camundongo de controle não compete com o PD-L1 pela ligação ao PD-1. Em contraste, os anticorpos de alta afinidade hPD-1.08A e hPD-1.09A inibiram a ligação de PD-L1 com valores de IC_{50} abaixo de 1 nM, enquanto que a ligação de PD-L2 foi bloqueada com valores de IC_{50} em torno de 1-2 nM (Tabela II). Foi reportado que o PD-L2 se liga precocemente ao PD-1 com uma afinidade duas a seis vezes maior do que o PD-L1 (Youngnak P. et al., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 307, 672-677).

[00163] Bloqueio de ligante foi confirmado usando um ensaio de competição homogêneo e detecção usando a tecnologia de ensaio em microvolume fluorométrica (FMAT). Resumidamente, CHO.hPD-1 foram dissociadas de frascos de cultura aderentes, misturadas com concentrações variadas de anticorpo anti-PD-1 e uma concentração constante (600 ng/mL) de proteína de fusão hPD-L1/Fc ou hPD-L2/Fc (ambas da R&D Systems), rotuladas com um corante fluorescente (AlexaFluor 647, Invitrogen) em uma placa com 96 poços. A mistura foi equilibrada durante 90 minutos a 37°C e lida usando um AB8200 Cellular Detection Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados foram analisados com o Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) usando regressão não linear e os valores de IC_{50} foram calculados. A Figura 3 mostra os resultados de um experimento de dose-resposta, indicando que a magnitude de bloqueio de ligante é determinada pela concentração de anticorpo. Ligação de hPD-L1/Fc e hPD-L2/Fc a células CHO-hPD-1 pôde ser completamente inibida pelo hPD-1.08A, hPD-1.09A e (em um grau menor) pelo J116 de uma maneira dose-dependente. Os dados de IC_{50} calculados são resumidos na Tabela II. Confirmando os resultados obtidos usando citometria de fluxo, os anticorpos de alta afinidade hPD-1.08A e hPD-1.09A inibiram a ligação de PD-L1 com valores de IC_{50} abaixo de 1 nM.

Reatividade cruzada entre espécies

[00164] Para avaliar a reatividade cruzada entre espécies dos anticorpos, os receptores de PD-1 de camundongo e macaco cynomolgus foram clonados através de PCR e células CHO-K1 estavelmente transfectadas foram geradas. Os anticorpos foram testados com relação à ligação ao receptor de cynomolgus usando um CELISA. Descobriu-se que o anticorpo comercial J116, hPD-1.08A e hPD-1.09A se ligam com afinidade igual ao PD-1 humano e de cynomolgus e bloqueiam a ligação de hPD-L1/Fc e hPD-L2/Fc ao PD-1 de cynomolgous com

eficácia similar quando comparado com o PD-1 humano. Isso não é uma surpresa porque descobriu-se que a sequência de aminoácido da porção extracelular do PD-1 de cynomolgus é 97% idêntica àquela do PD-1 humano. Além do PD-1 de macacos cynomolgous, hPD-1.08A e hPD-1.09A também bloquearam funcionalmente o PD-1 de macacos rhesus em culturas de células de sangue íntegro estimuladas com SEB descritas no Exemplo 3. Nenhum dos anticorpos testados se ligou ao PD-1 de camundongo com afinidade detectável em qualquer um dos ensaios usados.

[00165] Em resumo, cinco anticorpos monoclonais anti-PD-1 foram purificados e caracterizados, os quais foram isolados baseado em sua capacidade de modular a função de Jurkat. Esses anticorpos se ligam fortemente ao PD-1 (com constantes de dissociação na faixa de 20 pM a 3 nM) e foram capazes de bloquear a interação com PD-L1 e PD-L2 com valores de IC_{50} variáveis. Quatro desses mAbs anti-hPD-1 eram consideravelmente melhores do que os melhores mAbs anti-PD-1 comercialmente disponíveis. Cada um dos anticorpos, quando adicionados em solução, atuou como antagonistas de receptor, por fim, intensificando respostas de células T (vide Exemplo 3).

Exemplo 3: Caracterização de perfil funcional de anticorpos anti-PD-1

Resposta de células T humanas ao SEB é intensificada pelo hPD-1.08A e hPD-1.09A

[00166] Anticorpos anti-PD-1 foram testados com relação à sua capacidade de intensificar a atividade de células T in vitro usando células sanguíneas de voluntários saudáveis. Um ensaio usado para caracterizar a consequência funcional de bloqueio do receptor de PD-1 humano utilizou enterotoxina B de Estafilococo (SEB) para estimular e ativar todas as células T expressando a cadeia do receptor de células T Vβ3 e Vβ8. Sangue de doador humano saudável foi obtido e diluído a 1:10 em meio de cultura. Sangue íntegro

diluído foi colocado em placas (150 µl por poço) com fundo redondo com 96 poços e pré-incubado durante 30-60 min com mAb em concentrações variadas. SEB foi, então, adicionada em várias concentrações, de 10 ng/mL a 10 µg/mL. Os sobrenadantes foram coletados após 2 a 4 dias de cultura e a quantidade de IL-2 produzida foi quantificada usando ELISA (descrito no Exemplo 1) ou usando a tecnologia multiplex padrão (kits de detecção de citocina Luminex Platform – Biosource). Titulação de SEB de 100 ng/mL até 10 µg/mL estimulou significativamente a produção de IL-2 por células totais de sangue. Usualmente, dependendo do doador, 100 a 1000 pg/mL de IL-2 eram detectáveis através de ELISA 2-4 dias após estimulação com 1 µg/mL de SEB. A adição de hPD-1.08A e hPD-1.09A intensificou a produção de IL-2 com relação à IgG1 de camundongo de controle, em média 2 a 4 vezes na maior concentração de anticorpo testada (25 µg/mL). A média do índice de estimulação foi calculada para experimentos realizados com um conjunto de voluntários saudáveis independentes (Figura 4). Esses experimentos demonstraram que hPD-1.08A e hPD-1.09A intensificaram a produção de IL-2 quando de estimulação com SEB de células totais de sangue diluídas. Os níveis de expressão de PD-1 e PD-L1 (mas não PD-L2) foram positivamente regulados (quantificado através de citometria de fluxo) com o tempo após estimulação com SEB de células de sangue íntegro. Os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 (clone MIH5, Ebiosciences No 16-5982) e anti-CTLA-4 (clone 14D3, eBiosciences No 16-1529) também induziram a um aumento na produção de IL-2 sob condições similares, uma descoberta que validou adicionalmente o ensaio de estimulação com SEB para quantificar a atividade de células T após manipulação de vias coestimulatórias (Figura 4). Descobriu-se que a produção intensificada de IL-2 pelos anticorpos anti-PD-1 era dose-dependente. Além de IL-2, através da tecnologia Luminex, descobriu-se que os níveis de TNFα, IL-17, IL-7, IL-6 e IFNγ também foram significativamente

modulados pelo hPD-1.08A e hPD-1.09A. Os resultados desses experimentos indicam que hPD-1.08A e hPD-1.09 podem ser usados para estimular respostas de células T humanas.

[00167] Anticorpo anti-PD-1, hPD-1.09A, foi ainda testado com relação à sua capacidade de intensificar a atividade de células T in vitro usando células sanguíneas derivadas de pacientes com câncer. Sangue de pacientes com melanoma não avançado (1 paciente) ou câncer de próstata (3 pacientes) foi testado seguindo o protocolo acima. Os resultados da quantificação de citocina são apresentados na Tabela III como vezes de aumento de citocina produzida quando as células são estimuladas na presença de 25 ug/mL de hPD-1.09A comparado com estimulação com SEB na ausência de anticorpo. Em resumo, descobriu-se que o hPD-1.09A aumenta a produção de IL-2 SEB-induzida 2 a 3,5 vezes para cada um dos 4 pacientes. Similarmente, a produção de TNFα, IL-17 e IFNγ foi intensificada e a produção de IL-5 e IL-13 foi diminuída. Esses experimentos indicam que o hPD-1.09A tem a capacidade de estimular respostas de células T em pacientes com câncer. Ainda, esses experimentos sugerem uma preferência por respostas Th1.

Tabela III. Produção de citocina SEB-estimulada na presença de hPD-1.09A

		Vezes de alteração no nível de citocina						
paciente	Tipo de câncer	IL-2	TNFα	IFNγ	IL-5	IL-6	IL-13	IL-17
A	Próstata	3,4	2,0	1,9	0,7	2,1	0,8	1,8
B	Próstata	2,1	1,5	1,2	0,4	2,2	0,6	2,6
C	Próstata	2,0	2,4	2	0,9	2,4	1,1	2,4
D	melanoma	2,0	1,9	1,5	0,4	1,9	0,5	2,0

Resposta de "recall" de células T humanas ao estímulo com TT é intensificada pelo hPD-1.08A e hPD-1.09A

[00168] Outro ensaio usado para caracterizar o perfil do efeito funcional de anticorpos anti-PD-1 humano que bloqueiam a interação do

receptor com seus ligantes naturais usou o antígeno toxoide do tétano (TT) para estimular células T de memória pré-existentes em sangue de doador saudável. Para essa finalidade, PBMCs recentemente preparadas (2 x 105 células) foram colocadas em placas com fundo redondo com 96 poços em meio RPMI 1640 completo (contendo soro humano termicamente inativado a 5%), pré-incubadas com anticorpos de teste em concentração variada e estimuladas com TT (Astarte Biologics) em uma concentração de 100 ng/mL. As células foram incubadas durante 3-7 dias a 37°C, 5% de CO2, após o que os sobrenadantes foram coletados. As concentrações de citocina foram determinadas através de ELISA (conjuntos de par de anticorpo de detecção de IL-2 e IFN-? por ELISA da eBioscience) e análise multiplex (kits de detecção de citocina Luminex Platform – Biosource). O bloqueio de PD-1 intensificou a proliferação e intensificou significativamente a produção de citocina (Figura 5), incluindo IFNγ e IL-2, comparado com o antígeno isoladamente. Análise Luminex revelou que a produção das citocinas GM-CSF, RANTES e IL-6 é aumentada quando PD-1 é bloqueado.

[00169] Coloração de PD-1 humano sobre células humanas incrustadas em parafina fixadas em formalina

[00170] Uma vez que células sanguíneas SEB-estimuladas demonstraram expressão intensificada de PD-1 através de citometria de fluxo, essas células foram usadas para determinar se hPD-1.09A poderia detectar o PD-1 em tecido incrustado em parafina fixado em formalina para uso histológico. Células mononucleares de sangue periférico de doadores humanos foram estimulados com 0,1 µg/mL de SEB durante 3 dias, após o que as células não aderentes (principalmente linfócitos) foram coletados, lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas (1100 rpm durante 5 min). As células foram fixadas durante 10 min em formaldeído a 4%, a pelota de células foi incrustada em agarose, desidratada

em etanol (subsequentemente 70%, 80%, 96% e 100%) e xileno e, após o que, incrustada em parafina. Seções (4 µm) foram montadas sobre lâminas de vidro e hidratadas (xileno, etanol a 100%, 96%, 80%, 70%, tampão de PBS), após o que recuperação de antígeno em tampão de citrato aquecido foi realizada usando metodologia-padrão. A atividade de peroxidase foi bloqueada usando metanol a 100% incluindo H2O2 a 0,3% e os cortes foram enxaguados em água e PBS, Tween a 0,1%. As seções foram incubadas com hPD-1.09A durante 1,5 horas em temperatura ambiente, enxaguadas com PBS-Tween, seguido por métodos de detecção padrões. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina durante 30 segundos em temperatura ambiente, desidratados com xileno e montados para exame microscópico. Esses experimentos mostraram que linfócitos derivados de culturas de PBMC estimuladas com SEB coraram fortemente (quan-o comparado com o controle de isotipo) com hPD-1.09A, em oposição às culturas de PBMC não estimuladas, indicando que hPD-1.09A é útil como um reagente diagnóstico.

[00171] Exemplo 4: sequências de anticorpos anti-PD-1 e subsequente humanização

[00172] Clonagem de cDNAs de imunoglobulina

[00173] Usando métodos baseados em PCR com iniciador degenerado, as sequências de DNA que codificam as regiões variáveis dos anticorpos de camundongo expressos pelos hibridomas hPD-1.08A e hPD-1.09A foram determinadas. Resumidamente, cDNAs gene-específicos para as cadeias pesada e leve foram gerados usando o kit de síntese de cDNA iScript Select (Biorad No 1708896) de acordo com as instruções do fabricante. Iniciadores de PCR usados foram baseados no conjunto de Ig-iniciador (Novagen No 69831-3). Reações de PCR degeneradas foram realizadas usando Taq polimerase de acordo com o protocolo do conjunto de iniciador da Novagen. Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. O tamanho esperado do

amplicon para as regiões variáveis de cadeias pesada e leve é cerca de 500 pares de base. Dois µl de produto de PCR Taq-amplificado de reações as quais proporcionaram uma banda apropriada foram clonados no vetor pCR4 TOPO (Invitrogen No K4595-40) e transformados em E. coli DH5-alfa, conforme orientado pelo fabricante. Os clones foram selecionados através de PCR de colônia usando os iniciadores universais M13 dianteiro e reverso e dois a três clones de cada reação foram escolhidos para análise de sequenciamento de DNA.

[00174] Clones foram sequenciados em ambas as direções usando os iniciadores universais M13 dianteiro, M13 reverso, T3 e T7. Os resultados de cada reação de sequenciamento para cada clone foram analisados usando Seqman. Sequências de consenso foram buscadas contra bancos de dados de linhagem germinativa e sequências de região variável de Ig reestruturadas usando o NCBI Ig-Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/). Resultados no Blast para hPD-1.08A identificaram uma cadeia pesada produtiva (em fase de leitura) rearranjada sem códons terminais introduzidos. Clones de cadeia leve foram identificados, os quais codificam duas sequências diferentes; uma é uma cadeia leve produtiva em fase rearranjada sem códons terminais introduzidos, a outra é uma sequência não produtiva, rearranjada para desvio de fase de leitura que leva a um códon terminal na região FR4. O transcrito estéril não produto observado provavelmente se origina do parceiro de fusão de mieloma (Carroll W. L. et al., Mol. Immunol. 25: 991-995 (1988) e foi excluído.

[00175] Os resultados no Blast para hPD-1.09A identificaram cadeias pesada e leve produtivas (em fase) rearranjadas sem códons terminais introduzidos. As sequências de aminoácido das proteínas expressas foram confirmadas através de espectrometria de massa. As sequências são divulgadas na Listagem de Sequência em anexo e listadas na Tabela IV.

Tabela IV: números de ID de sequência para anticorpos anti-PD-1 humano de murino da presente invenção

SEQ ID NO:	Descrição
1	hPD-1.08A Região variável de cadeia pesada (DNA)
2	hPD-1.08A Região variável de cadeia leve (DNA)
3	hPD-1.09A Região variável de cadeia pesada (DNA)
4	hPD-1.09A Região variável de cadeia leve (DNA)
5	hPD-1.08A Região variável de cadeia pesada (AA)
6	hPD-1.08A Região variável de cadeia leve (AA)
7	hPD-1.09A Região variável de cadeia pesada (AA)
8	hPD-1.09A Região variável de cadeia leve (AA)
9	hPD-1.08A CDR1 de cadeia leve (AA)
10	hPD-1.08A CDR2 de cadeia leve (AA)
11	hPD-1.08A CDR3 de cadeia leve (AA)
12	hPD-1.08A CDR1 de cadeia pesada (AA)
13	hPD-1.08A CDR2 de cadeia pesada (AA)
14	hPD-1.08A CDR3 de cadeia pesada (AA)
15	hPD-1.09A CDR1 de cadeia leve (AA)
16	hPD-1.09A CDR2 de cadeia leve (AA)
17	hPD-1.09A CDR3 de cadeia leve (AA)
18	hPD-1.09A CDR1 de cadeia pesada (AA)
19	hPD-1.09A CDR2 de cadeia pesada (AA)
20	hPD-1.09A CDR3 de cadeia pesada (AA)
21	109A-H Região variável de cadeia pesada (DNA)
22	109A-H Região variável de cadeia pesada (DNA) códon-otimizada
23	409A-H Cadeia pesada de comprimento total (DNA) códon-otimizada
24	K09A-L-11 Região variável de cadeia leve (DNA)
25	K09A-L-16 Região variável de cadeia leve (DNA)
26	K09A-L-17 Região variável de cadeia leve (DNA)
27	K09A-L-11 Região variável de cadeia leve (DNA) códon-otimizada

SEQ ID NO:	Descrição
28	K09A-L-16 Região variável de cadeia leve (DNA) códon-otimizada
29	K09A-L-17 Região variável de cadeia leve (DNA) códon-otimizada
30	109A-H Região variável de cadeia pesada (AA)
31	409A-H Cadeia pesada de comprimento total (AA)
32	K09A-L-11 Região variável de cadeia leve (AA)
33	K09A-L-16 Região variável de cadeia leve (AA)
34	K09A-L-17 Região variável de cadeia leve (AA)
35	109A-H Cadeia pesada de comprimento total (AA)
36	K09A-L-11 Cadeia leve de comprimento total (AA)
37	K09A-L-16 Cadeia leve de comprimento total (AA)
38	K09A-L-17 Cadeia leve de comprimento total (AA)

[00176] As regiões de CDR e estrutura principal são anotadas de acordo com Kabat E. A. et al., 1991, Sequences of proteins of Immunological inte-rest, Em: NIH Publication No. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.

Construção e expressão do anticorpo quimérico c109A

[00177] As cadeias leve e pesada quiméricas foram construídas através de ligação de cDNAs PCR-clonados das regiões VH e VL de hPD-1.09A de camundongo às regiões kappa e constante de IgG1, respectivamente. As extremidades 5’ e 3’ das sequências de cDNA de camundongo foram modificadas usando iniciadores de PCR criados para adicionar uma sequência líder adequada a cada cadeia e sítios de restrição para permitir clonagem em vetores de expressão de anticorpo recombinante existentes.

[00178] Células COS-7 (0,7 mL a 107/mL) foram eletroporadas com 10 µg de cada um dos plasmídeos de expressão de cadeias pesada e leve. Essas células foram, então, cultivadas em 8 mL de meio de crescimento durante três dias. Um ELISA em sanduíche foi usado para medir as concentrações de anticorpo nos sobrenadantes das transfecções de COS-7. Isso mostrou que as células COS-7

transfectadas secretavam cerca de 295 ng/mL do anticorpo IgG1-kappa quimérico em três transfecções distintas.

[00179] A ligação do anticorpo quimérico produzido pelas células COS-7 transfectadas foi medida usando um ELISA e CELISA de ligação ao PD-1 (vide Exemplo 2) e foi mostrado que se liga ao PD-1 com afinidade comparável àquela do anticorpo de murino.

Design de anticorpo humanizado

[00180] O anticorpo hPD-1.09A foi humanizado pela MRCT (Cambridge, Reino Unido) usando a tecnologia de enxertagem de CDR (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.225.539). Resumidamente, as sequências de cadeia variável do anticorpo de murino hPD-1.09A foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados de proteína Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Um modelo de homologia do hPD-1.09A foi gerado baseado nas estruturas de VH e VK mais próximas. Sequências humanas com maior identidade ao hPD-1.09A foram identificadas e analisadas (Foote e Winter, J. Mol. Biol. 224: 487-499 (1992); Morea V. et al., Methods 20: 267-279 (2000); Chothia C. et al., J. Mol. Biol. 186: 651-663 (1985)). As estruturas principais humanas mais apropriadas sobre as quais construir as cadeias pesada e leve enxertadas de CDR foram identificadas.

[00181] Para a cadeia pesada, a estrutura principal codificada pelo acesso ao genbank No AB063829 foi determinada como sendo a mais apropriada. Análise da sequência VK do hPD-1.09A mostra que seu comprimento de CDR1 (15 resíduos) não é encontrado em qualquer VK humana. Por essa razão, estruturas principais de três comprimentos diferentes de CDR1 (11, 16 e 17 resíduos) foram analisadas de forma a testar qual comprimento de CDR1 reproduziria o comportamento da VK de hPD-1.09A. As sequências de VK humana com maior identidade à VK de hPD-1.09A em resíduos selecionados

importantes na estrutura e com comprimentos de CDR1 de 11, 16 e 17 foram identificadas. A estrutura principal com acesso ao genbank No M29469 foi selecionada, sobre a qual basear o K109A-L-11. A estrutura principal com acesso ao genbank No AB064135 foi selecionada sobre a qual basear o K09A-L-16 e a estrutura principal com acesso ao genbank No X72431 foi escolhida sobre a qual basear o K09A-L-17.

[00182] Enxertos diretos foram realizados para gerar constructos de expressão para cada cadeia. As sequências de DNA proteína do 109A-H, K09A-L-11, K09A-L-16 e K09A-L-17 são divulgadas na Listagem de Sequência em anexo (Tabela IV).

[00183] Uma versão de IgG4 do anticorpo humanizado h109A foi produzida, com a mutação de estabilização de Adair (Angal S. et al., Mol. Immuol. 30: 105-108 (1993)), onde a serina 241 (numeração de Kabat) é convertida em prolina. Essa sequência é divulgada em SEQ ID NOS: 23 e 31.

Exemplo 5: características de ligação e propriedades funcionais de anticorpos anti-PD-1 humanizados

Produção e purificação

[00184] Anticorpos humanizados h409A11, h409A16 e h409A17 foram produzidos através de transfecção transitória de células CHO - S. As células foram crescidas em meios CD-CHO (Gibco) e C5467 (Sigma) durante 8 dias em frascos de agitação. Os anticorpos foram purificados dos sobrenadantes de célula através de cromatografia em Proteína A, lavados, eluídos usando ácido acético a 1 M e neutralizados usando Tris a 3 M. Finalmente, o tampão foi trocado para ácido acético a 100 M, o qual tinha sido ajustado para um pH de 5,5 com base de Tris a 1 M.

Análise de ligação e cinética

[00185] ELISAs com base em célula e proteína para determinar as

afinidades de ligação aparentes (reportadas como valores de EC50) foram realizados conforme descrito no Exemplo 2. Os anticorpos anti-PD-1 humanizados se ligam, cada um, ao PD-1/Fc e expressavam celularmente PD-1 com valores de EC50 comparáveis ao anticorpo parental de murino (Tabela V).

[00186] As características de ligação cinética foram também obtidas usando interferometria bio-luminosa, conforme descrito no Exemplo 2 (Figura 6). Dois dos anticorpos humanizados, h409A11 e h409A16, se ligaram consideravelmente mais fortemente do que qualquer outro mAb testado usando esse ensaio, com a KD determinada como sendo de 29 e 27 pM para h409A11 e h409A16, respectivamente (Tabela V). Comparado com os outros anticorpos anti-PD-1 testados, a afinidade aumentada é principalmente em virtude de uma off-rate mais lenta. Similar aos anticorpos parentais de murino, os anticorpos anti-PD-1 humanizados h409A11, h409A16 demonstraram ligação ao PD-1 de cynomolgous com a KD determinada como estando abaixo de 120 pM.

Bloqueio de ligante

[00187] A capacidade dos anticorpos humanizados de bloquear a ligação de PD-L1 e PD-L2 ao PD-1 foi medida usando um ensaio de competição homogêneo e detecção usando um ensaio de competição FMAT, conforme descrito no Exemplo 2.

[00188] A ligação de hPD-L1/Fc e hPD-L2/Fc à células CHO-hPD-1 pôde ser completamente inibida de uma maneira dose-dependente por qualquer um dos anticorpos humanizados testados. Os dados de IC_{50} calculados são resumidos na Tabela V. similarmente ao anticorpo parental de murino hPD-1.09A, cada um dos mAbs humanizados, h409A11, h409A16 e h409A17, inibiu a ligação de PD-L1 e PD-L2 com valores de IC_{50} abaixo de 1 nM. Similar aos anticorpos parentais de murino, os anticorpos anti-PD-1 humanizados, h409A11, h409A16 e h409A17, demonstraram inibição de ligação de ligante ao PD-1 de cynomolgous com

valores de IC_{50} calculados em torno de 1 nM.

Tabela V. Características de ligação de anticorpos anti-hPD-1 humanizados da invenção

	Análise de ligação		Bloqueio de ligação		Análise cinética		
	ELISA	CELISA	FMAT		Fortebio Octet		
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	IC_{50} (pM)		ka_{ssoc}	k_{dissoc}	K_D
mAb	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L2	1/s	1/Ms	M
h409A11	76	62	625	695	1,04E+06	3,05E-05	2,93E-11
h409A16	90	63	696	810	9,97E+05	2,72E-05	2,73E-11
h409A17	88	83	818	463	1,00E+06	1,91E-04	1,91E-10

Resposta de células T humanas ao SEB é intensificada por mAbs humanizados

[00189] Anticorpos anti-PD-1 humanizados foram testados com relação à sua capacidade de intensificar a atividade de células T in vitro usando células sanguíneas de voluntários saudáveis, conforme descrito no Exemplo 3. Os sobrenadantes foram coletados após 4 dias de cultura e a quantidade de IL-2 produzida foi quantificada usando ELISA. Os anticorpos anti-PD-1 humanizados demonstraram a capacidade de aumentar a produção de IL-2 estimulada por SEB (Figura 7). Adicionalmente, os anticorpos anti-PD-1 humanizados aumentaram a produção de IL-2 SEB-induzida no sangue de pacientes com câncer, similar àquela que é descrita no Exemplo 3.

[00190] Em resumo, os mAbs humanizados h409A11, h409A16 e h409A17 retiveram toda a atividade funcional durante o processo de humanização. Os mAbs h409A11 e h409A16 retiveram completamente a afinidade do anticorpo

parental de camundongo hPD109A quando de humanização.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo o qual se liga ao PD-1 humano, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a. CDRs de cadeia leve da SEQ ID NOs: 15, 16 e 17; e

b. CDRs de cadeia pesada da SEQ ID NOs: 18, 19 e 20;

em que dito anticorpo ou fragmento de anticorpo bloqueia a ligação de PD-L1 humano e PD-L2 humano ao PD-1 humano.

2. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a. uma região variável de cadeia leve compreendendo:

i. SEQ ID NO: 8;

ii. resíduos de aminoácidos 20 a 130 da SEQ ID NO: 32;

iii. resíduos de aminoácidos 20 a 130 da SEQ ID NO: 33; ou

iv. resíduos de aminoácidos 20 a 130 da SEQ ID NO: 34; e

b. uma região variável de cadeia pesada compreendendo:

i. SEQ ID NO: 7; ou

ii. resíduos de aminoácidos 20 a 139 da SEQ ID NO: 30.

3. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a. uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em:

i. resíduos de aminoácidos 20 a 466 da SEQ ID NO: 31; e

ii. resíduos de aminoácidos 20 a 469 da SEQ ID NO: 35; e

b. uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo em:

i. resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 36;

ii. resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 37; e

iii. resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 38.

4. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a. uma região variável de cadeia pesada compreendendo resíduos de aminoácidos 20 a 139 da SEQ ID NO: 30; e

b. uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em:

i. resíduos de aminoácidos 20 a 130 da SEQ ID NO: 32;

ii. resíduos de aminoácidos 20 a 130 da SEQ ID NO: 33; e

iii. resíduos de aminoácidos 20 a 130 da SEQ ID NO: 34.

5. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a. uma cadeia pesada compreendendo resíduos de aminoácidos 20 a 466 da SEQ ID NO: 31; e

b. uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em:

i. resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 36;

ii. resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 37; e

iii. resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 38.

6. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo resíduos de aminoácidos 20 a 466 da SEQ ID NO: 31, e uma cadeia leve compreendendo resíduos de aminoácidos 20 a 237 da SEQ ID NO: 36.

7. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a região constante de cadeia pesada humana compreende uma região constante de

cadeia pesada humana γ4 ou γ1.

8. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo:

a. se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 100 pM ou menor;

b. se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 30 pM ou menor;

c. se liga ao PD-1 humano com uma k_{assoc} de 7,5 x 10^5 1/M·s ou mais rápido;

d. se liga ao PD-1 humano com uma k_{assoc} de 1 x 10^6 1/M·s ou mais rápido;

e. se liga ao PD-1 humano com uma k_{dissoc} de 2 x 10^{-5} 1/s ou mais lento;

f. se liga ao PD-1 humano com uma k_{dissoc} de 2,7 x 10^{-5} 1/s ou mais lento;

g. se liga ao PD-1 humano com uma k_{dissoc} de cerca 3 x 10^{-5} 1/s ou mais lento; ou

h. bloqueia a ligação de PD-L1 humano ou PD-L2 humano ao PD-1 humano com uma IC_{50} de 1 nM ou menor.

9. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que o fragmento de anticorpo é um fragmento de anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, $F(ab')_2$ e um diacorpo.

10. Anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo aumenta a ativação de células T.

11. Polinucleotídeo, **caracterizado** pelo fato de que codifica o anticorpo ou fragmento de anticorpo definido na reivindicação 1, em que o polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO: 23 e a SEQ ID NO: 27, ou a SEQ ID NO: 22 e a SEQ ID NO: 27.

12. Método de produção de um anticorpo ou fragmento de anticorpo

definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

a. cultura de uma célula hospedeira em meio de cultura por até 8 dias em frascos de agitação, em que a sequência de ácido nucleico é expressa, desse modo, produzindo polipeptídeos compreendendo as regiões variáveis de cadeias leve e pesada; e

b. recuperação dos polipeptídeos da célula hospedeira ou meio de cultura por meio de cromatografia em Proteína A.

13. Composição, **caracterizada** pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento de anticorpo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em combinação com um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

14. Uso do anticorpo ou fragmento de anticorpo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratar câncer.

Fig 1

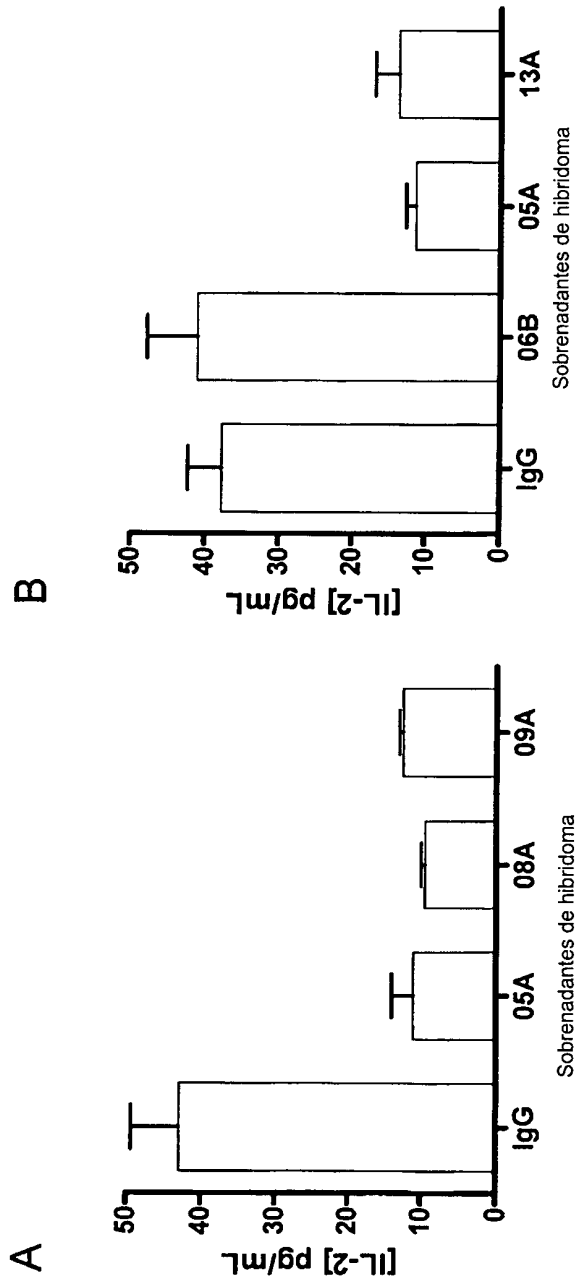
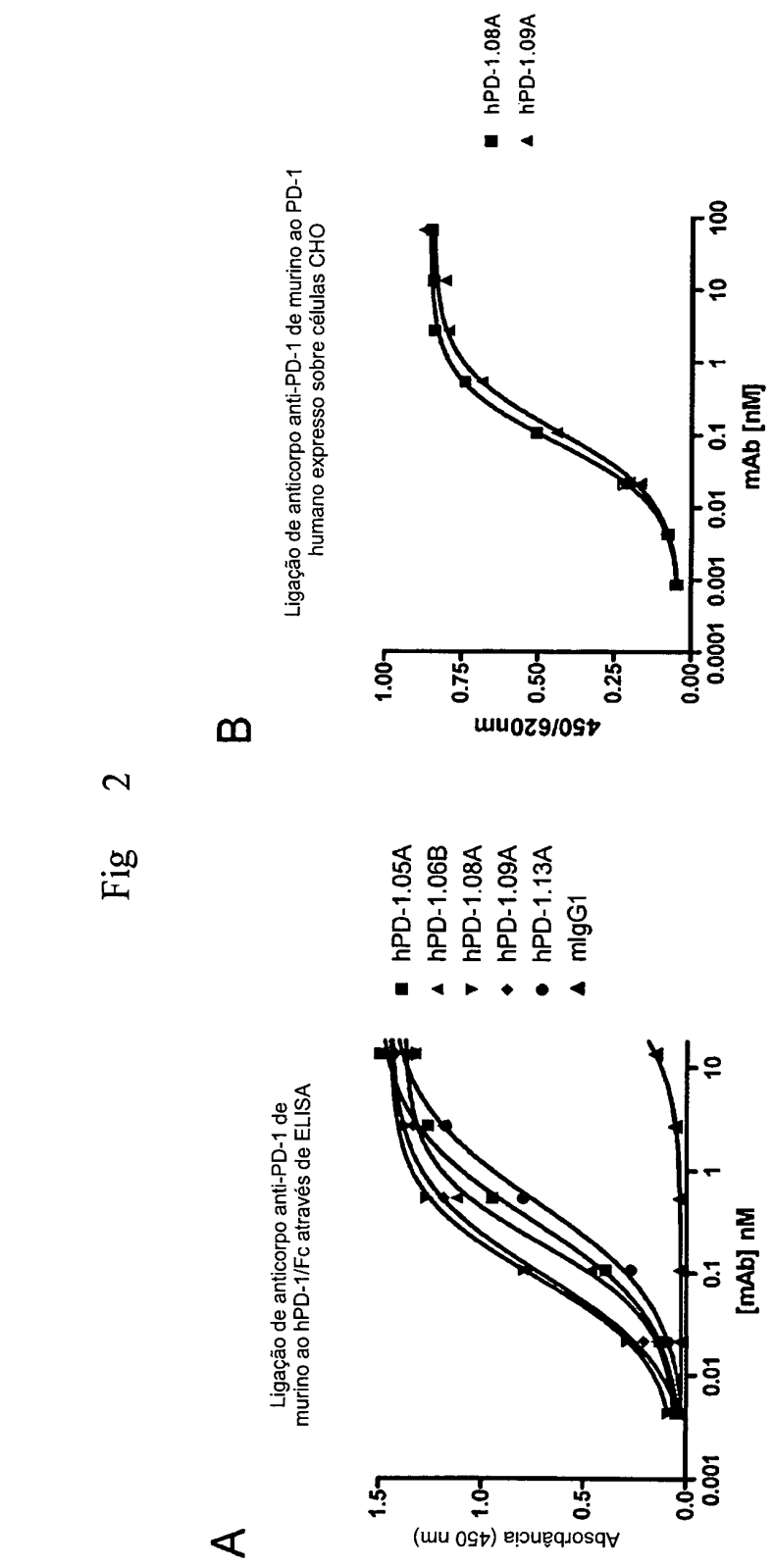

A
B
[IL-2] pg/mL
0
10
20
30
40
50
IgG
05A
08A
09A
06B
05A
13A
Sobrenadantes de hibridoma
Sobrenadantes de hibridoma

Fig 2


A
Ligação de anticorpo anti-PD-1 de murino ao hPD-1/Fc através de ELISA
Absorbância (450 nm)
[mAb] nM
hPD-1.05A
hPD-1.06B
hPD-1.08A
hPD-1.09A
hPD-1.13A
mIgG1
B
Ligação de anticorpo anti-PD-1 de murino ao PD-1 humano expresso sobre células CHO
450/620nm
mAb [nM]
hPD-1.08A
hPD-1.09A

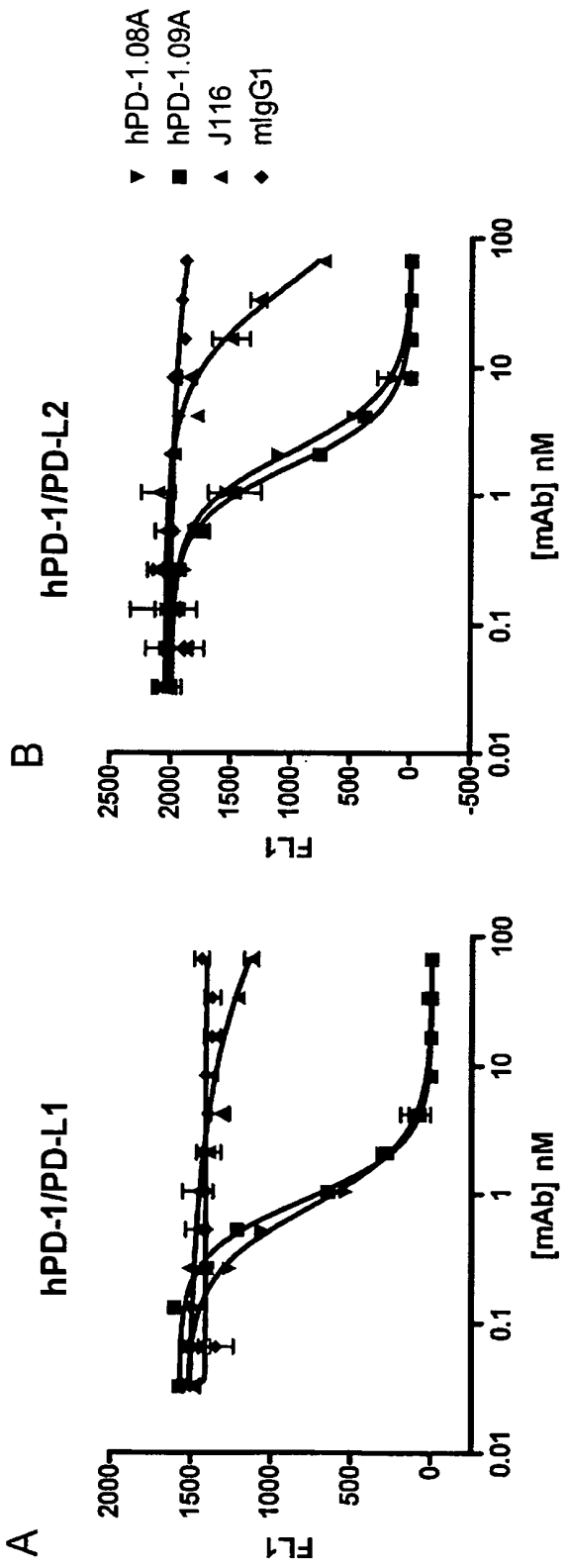

A
hPD-1/PD-L1
FL1
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
10
100
[mAb] nM
B
hPD-1/PD-L2
hPD-1.08A
hPD-1.09A
J116
mIgG1
FL1
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
0.01
0.1
1
10
100
[mAb] nM

Fig 3

Fig 4

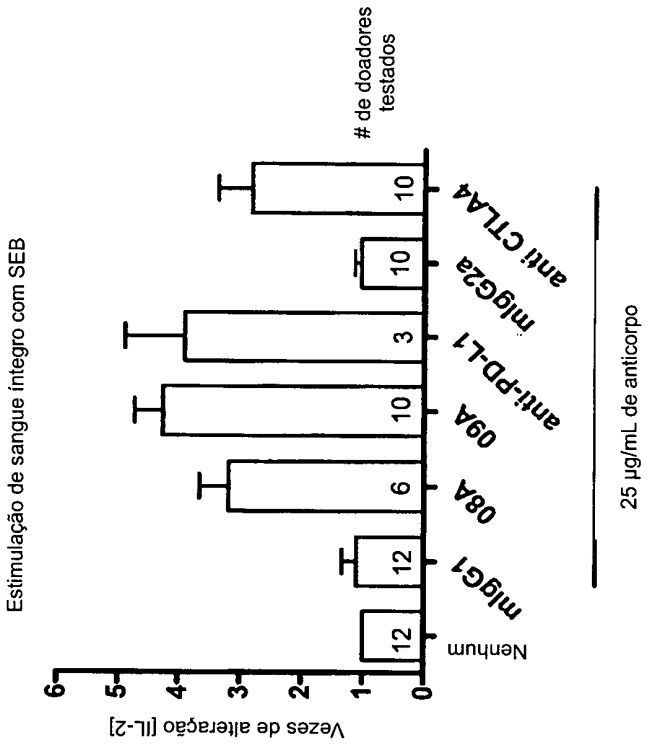

Estimulação de sangue íntegro com SEB
Vezes de alteração [IL-2]
0
1
2
3
4
5
6
de doadores testados
12
12
6
10
3
10
10
Nenhum
migG1
08A
09A
anti-PD-L1
migG2a
anti CTLA4
25 µg/mL de anticorpo

Fig 5

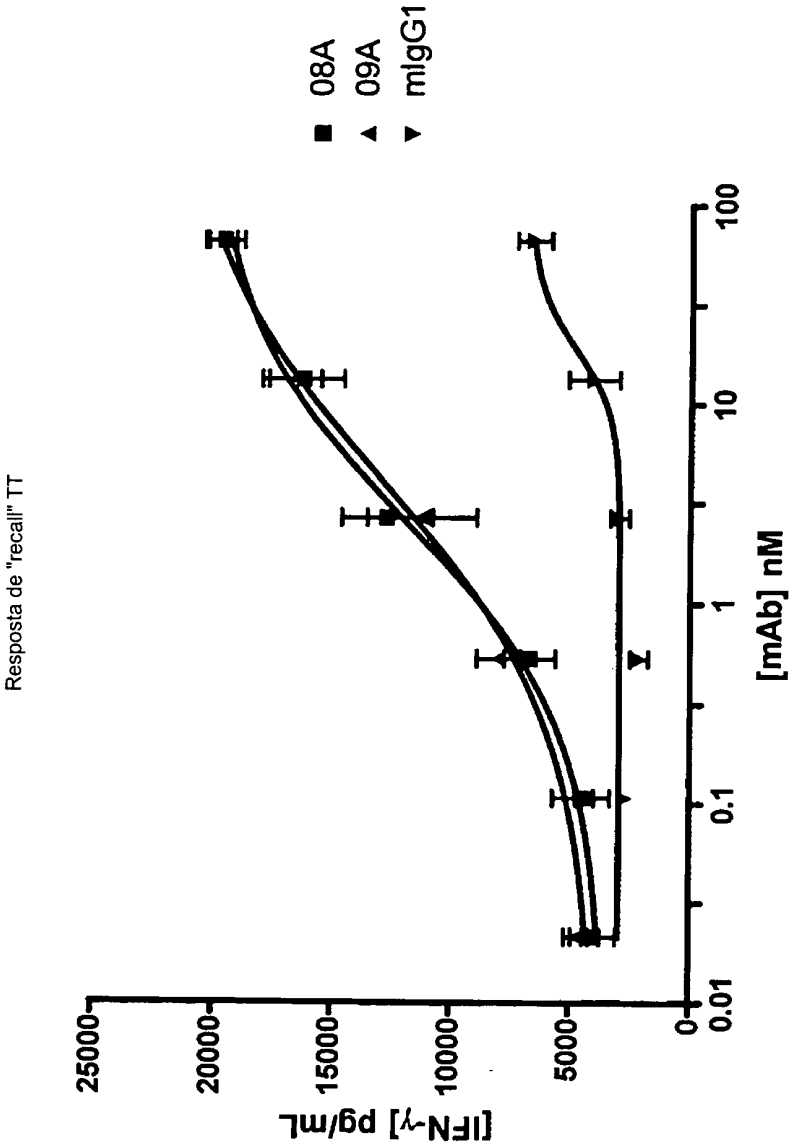

Resposta de "recall" TT
08A
09A
mIgG1
[IFN-γ] pg/mL
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
[mAb] nM

Fig 6

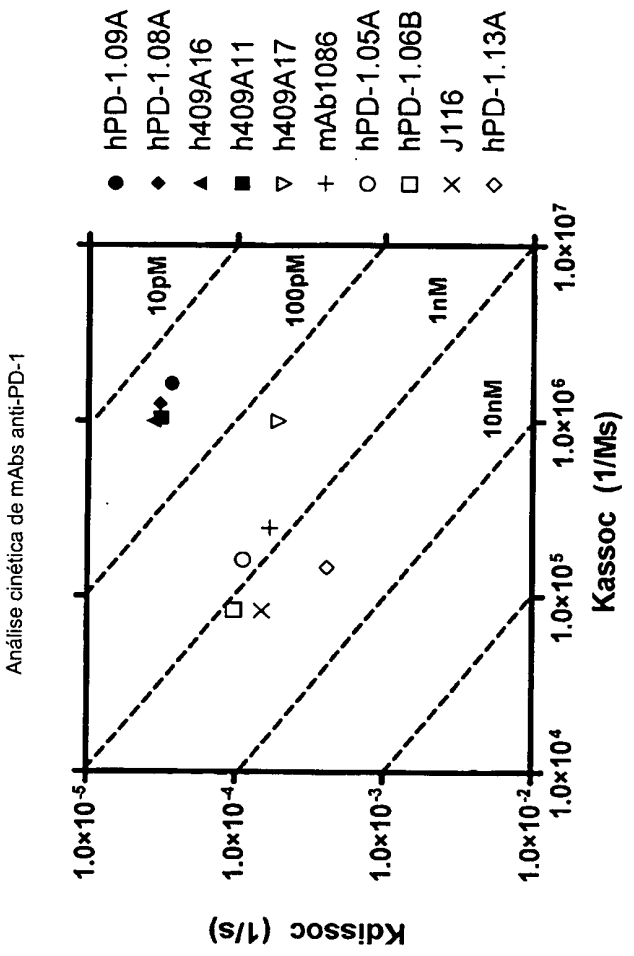
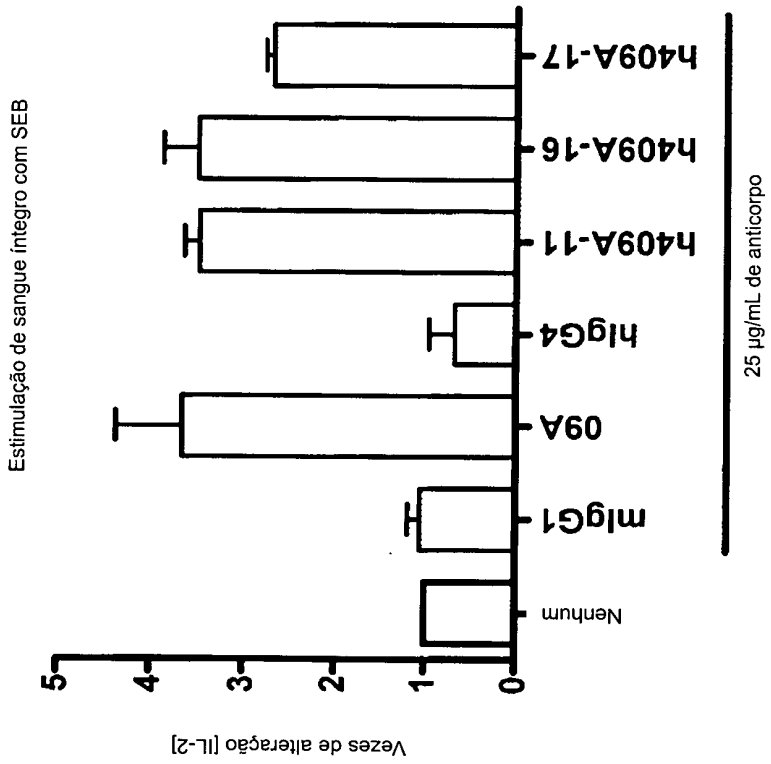

Análise cinética de mAbs anti-PD-1
hPD-1.09A
hPD-1.08A
h409A16
h409A11
h409A17
mAb1086
hPD-1.05A
hPD-1.06B
J116
hPD-1.13A
10pM
100pM
1nM
10nM
1.0×10⁻⁵
1.0×10⁻⁴
1.0×10⁻³
1.0×10⁻²
1.0×10⁴
1.0×10⁵
1.0×10⁶
1.0×10⁷
Kdissoc (1/s)
Kassoc (1/Ms)

Fig 7


Estimulação de sangue íntegro com SEB
Vezes de alteração [IL-2]
0
1
2
3
4
5
Nenhum
mIgG1
09A
hIgG4
h409A-11
h409A-16
h409A-17
25 µg/mL de anticorpo