

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

(21) **PI0610235-2 A2**

(22) Data de Depósito: 02/05/2006
(43) Data da Publicação: 08/06/2010
(RPI 2057)



(51) *Int.Cl.:*

C12N 15/09
C07K 16/28
C12N 5/00
C12P 21/08
C12Q 1/02

(54) Título: **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA MORTE PROGRAMADA 1 (PD-1) E USOS DE ANTICORPOS ANTI-PD-1 SOZINHOS OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS IMUNOTERAPÊUTICOS PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER**

(30) Prioridade Unionista: 09/05/2005 US 60/679.466, 21/11/2005 US 60/738.434, 08/12/2005 US 60/748.919, 08/12/2005 US 60/748.919, 08/12/2005 US 60/748.919, 09/05/2005 US 60/679.466, 21/11/2005 US 60/738.434

(73) Titular(es): MEDAREX, INC., ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

(72) Inventor(es): Alan J. Korman, Bing Chen, Changyu Wang, Josephine M. Cardarelli, Mark J. Selby, Mohan Srinivasan

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006309606 de 02/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO WO 2006/121168de 16/11/2006

(57) Resumo: A presente invenção provê anticorpos monoclonais geneticamente modificados e diferentes daqueles encontrados na natureza, particularmente anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente ao PD-1 com afinidade alta. São também providas moléculas de ácido nucléico codificando os anticorpos da invenção, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressão dos anticorpos da invenção. São também providos imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos da invenção. A invenção também provê métodos para detectar PD-1, bem como métodos para tratamento de várias doenças, incluindo câncer e doenças infecciosas, usando anticorpos anti-PD-1. A presente invenção também provê métodos para emprego de uma imunoterapia de combinação, tal como, a combinação de anticorpos anti-CTLA-4 e anticorpos anti-PD-1, para tratamento de doença hiperproliferativa, tal como, câncer. A invenção também provê métodos para alterar eventos adversos relacionados ao tratamento individual com tais anticorpos. Além disso, a invenção revela usos de anticorpos Anti-PD-1 sozinhos ou em combinação com outros imunoterapêuticos para preparação de composições farmacêuticas para tratamento de câncer.

"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA MORTE PROGRAMADA 1 (PD-1) E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER USANDO ANTICORPOS ANTI-PD-1 SOZINHOS OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS IMUNOTERAPÊUTICOS"

5 Campo Técnico

A presente invenção se refere, de modo geral, à imunoterapia no tratamento de doença humana e redução dos eventos adversos relacionados à mesma. Mais especificamente, a presente invenção se refere ao uso de anticorpos anti-PD-1 e ao uso de imunoterapia de combinação, incluindo a combinação dos anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-1 para tratar o câncer e/ou para diminuir a incidência ou grandeza dos eventos adversos relacionados ao tratamento com tais anticorpos de modo individual.

15 Antecedentes da Invenção

Morte Programada da proteína 1 (PD-1) é um elemento inibidor da família CD28 dos receptores, que também inclui CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. O PD-1 é expresso nas células B ativadas, células T e células mielóides (Agata e outros, supra, Okazaki e outros (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett e outros (2003) *J Immunol* 170:711-8). Os elementos iniciais da família, CD28 e ICOS, foram descobertos por efeitos funcionais no aumento da proliferação da célula T, seguindo-se à adição de anticorpos monoclonais (Hutloff e outros (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen e outros (1980) *Immunogenics* 10:247-260). O PD-1 foi descoberto através da classificação para expressão diferencial em células apoptóticas (Ishida e outros (1992)

EMBO J 11:3887-95). Os outros elementos da família, CTLA-4 e BTLA foram descobertos através da classificação para expressão diferencial em linfócitos T citotóxicos e células TH1, respectivamente. CD28, ICOS e CTLA-4 todas possuem um
 5 resíduo de cisteína não emparelhado permitindo a homodimerização. Em contraste, sugere-se que PD-1 exista como um monômero, não possuindo a característica de resíduo de cisteína anão emparelhado em outros elementos da família CD28.

10 O gene de PD-1 é uma proteína de transmembrana do tipo 1 de 55 kDa que faz parte da superfamília do gene Ig (Agata e outros (1996) *Int Immunol* 8:765-72). O PD-1 contém um motivo inibidor de tirosina imunoreceptor proximal de membrana (ITIM) e um motivo de comutação com base na
 15 tirosina distal de membrana (ITSM) (Thomas, M.L (1995) *J Exp Med*, 181:1953-6; Vivier, E e Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Embora estruturalmente semelhante ao CTLA-4, PD-1 não possui o motivo MYPPPY que é importante para a ligação de B7-1 e B7-2. Dois ligantes para PD-1 foram identificados,
 20 o PD-L1 e PD-L2, que mostraram infraregular a ativação da célula T mediante ligação ao PD-1 (Freeman e outros (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman e outros (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter e outros (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Ambos PD-L1 e PD-L2 são homólogos a B7 que se liga ao PD-1,
 25 porém, não se ligam aos outros elementos da família CD28. Outro ligante para PD-1, o PD-L1, é abundante em uma variedade de cânceres humanos (Dong e outros (2002) *Nat. Med* 8:787-9). A interação entre PD-1 e PD-L1 resulta em uma

diminuição nos linfócitos de infiltração de tumor, uma diminuição na proliferação mediada pelo receptor de célula T e evasão imune por células cancerígenas (Dong e outros (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank e outros (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi e outros (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). A supressão imune pode ser revertida por inibição da interação local de PD-1 com DP-L1 e o efeito é aditivo quando a interação de PD-1 com PD-L2 é bloqueada (Iwai e outros (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* 99:12293-7; Brown e outros (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

PD-1 é um elemento inibidor da família CD28 expresso nas células B ativadas, células T e células mielóides (Agata e outros, supra; Okazaki e outros (2002) *Curr Opin Immunol* 14:391779-82; Bennett e outros (2003) *J Immunol* 170:711-8). Os animais deficientes em PD-1 desenvolvem vários fenótipos autoimunes, incluindo cardiomiopatia autoimune e síndrome semelhante a lúpus com artrite e nefrite (Nishimura e outros (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura e outros (2001) *Science* 291:319-22). Adicionalmente, foi verificado que PD-1 desempenha um papel na encefalomielite autoimune, lúpus eritematoso sistêmico, doença de hospedeiro versus enxerto (GVHD), diabetes do tipo 1 e artrite reumatóide (Salama e outros (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina e Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen e outros (2004) *Lupus* 13:510). Em uma linhagem de tumor de célula B de murino, o ITSM de PD-1 mostrou ser essencial para bloquear fluxo de Ca^{2+} mediado por BCR e fosforilação de tirosina de moléculas efetoras a

jusante (Okazaki e outros (2001) *PNAS* 98:13866-71).

Conseqüentemente são desejados agentes que reconheçam PD-1, e métodos de uso de tais agentes.

Revelação da Invenção

5 A presente invenção provê anticorpos monoclonal isolados, especificamente anticorpos monoclonais humanos específicos que se ligam ao PD-1 e que exibem várias propriedades desejáveis. Essas propriedades incluem, por exemplo, a ligação de alta afinidade ao PD-1 humano, porém
10 não possuindo reatividade cruzada substancial com cada um dentre CD28, CTLA-4 ou ICOS. Adicionalmente, os anticorpos da invenção mostraram modular as respostas imunes. Conseqüentemente, outro aspecto da invenção se refere aos métodos de modulação das respostas imunes usando anticorpos
15 anti-PD-1. Especificamente, a invenção provê um método para inibir o crescimento das células tumorais *in vivo* usando anticorpos anti-PD-1.

Em um aspecto, a invenção se refere a um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do
20 mesmo, onde o anticorpo exibe pelo menos uma das seguintes propriedades:

- a) se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos;
- b) não se liga substancialmente a CD28, CTLA-4 ou
25 ICOS humana;
- c) aumenta a proliferação da célula T em um ensaio de Reação de Linfócito Misto (MLR);
- d) aumenta a produção de interferon-gama em um

ensaio de MLR; ou

e) aumenta a secreção de IL-2 em um ensaio de MRL.

f) se liga ao PD-1 humano e PD-1 de macaco *Cynomolgus*;

5 g) inibe a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 ao PD-1;

h) estimula respostas de memória específicas de antígeno;

i) estimula respostas de anticorpo;

j) inibe o crescimento da célula tumoral *in vivo*;

10 Preferivelmente o anticorpo é um anticorpo humano, embora nas modalidades alternativas, o anticorpo possa ser, por exemplo, um anticorpo de murino, um anticorpo quimérico ou anticorpo humanizado.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo se liga
15 ao PD-1 humano com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos, se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-8} M ou menos, se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 5×10^{-9} M ou menos ou se liga ao PD-1 humano com uma K_D entre 1×10^{-8} M e 1×10^{-10} M.

Em outra modalidade, a invenção provê um anticorpo
20 monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, onde o anticorpo compete em cruzamento para ligação ao PD-1 com um anticorpo de referência compreendendo:

a) uma região variável de cadeia pesada humana que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo
25 consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

b) uma região variável de cadeia leve humana que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Nas várias modalidades, o anticorpo de referência compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1; e

5 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:8; ou o anticorpo de referência compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:2; e

10 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:9; ou o anticorpo de referência compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:3; e

15 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:10; ou o anticorpo de referência compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:4; e

20 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11; ou o anticorpo de referência compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:5; e

25 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:12; ou o anticorpo de referência compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada

compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:6; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:13; ou o anticorpo de referência compreende:

5 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:7; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

Em um outro aspecto, a invenção se refere a um
10 anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene V_H 3-33 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1. A invenção provê adicionalmente um anticorpo monoclonal
15 isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 4-39 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1. A invenção provê adicionalmente um anticorpo monoclonal isolado, ou uma
20 porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K L6 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1. A invenção provê adicionalmente um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao
25 antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K L15 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

Em uma modalidade preferida, a invenção provê um

anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo:

a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-33 humano; e

5 b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6 humano;

onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

Em outra modalidade preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo:

10 a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 4-39 humano; e

 b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L15 humano; onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

Em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo:

20 uma região variável de cadeia pesada que compreende as seqüências CDR1, CDR2, e CDR3; e

 uma região variável de cadeia leve que compreende as seqüências CDR1, CDR2, e CDR3 onde:

25 a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, e modificações conservadoras das mesmas;

 b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do

grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56, e modificações conservadoras das mesmas; e

c) o anticorpo se liga especificamente ao PD-1 humano.

5 Preferivelmente, a sequência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, e modificações conservadoras das mesmas; e a sequência CDR2 da
10 região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, e modificações conservadoras das mesmas. Preferivelmente, a sequência CDR1 da região variável de cadeia pesada
15 compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, e modificações conservadoras das mesmas; e a sequência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo
20 consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, e modificações conservadoras das mesmas.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao
25 antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

a) a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a

uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7;

b) a região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma
5 seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14;

c) o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} ou menos; e

d) o anticorpo substancialmente não se liga a
10 CD28, CTLA-4 ou ICOS humana.

Em uma modalidade preferida, os anticorpos compreendem, adicionalmente, pelo menos uma das seguintes propriedades:

a) o anticorpo aumenta a proliferação da célula T
15 em um ensaio MLR;

b) o anticorpo aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio MLR; ou

c) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 em um ensaio MLR.

20 Adicional ou alternativamente, o anticorpo pode compreender um ou mais dos outros aspectos listados acima.

Nas modalidades preferidas, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo:

25 a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28;

5 c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1
10 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2
15 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3
compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e
20 56;

onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

Uma combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:15;

25 b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:22;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:29;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:36;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:43; e

5 f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:50.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:16;

10 b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:23;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:30;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1
15 compreendendo a SEQ ID NO:37;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:44; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:51.

20 Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:17;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:24;

25 c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:31;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:38;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:45; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:52.

5 Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:18;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:25;

10 c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:32;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:39;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2
15 compreendendo a SEQ ID NO:46; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:53.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1
20 compreendendo a SEQ ID NO:19;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:26;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:33;

25 d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:40;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:47; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ DD NO:54.

Outra combinação preferida compreende:

5 a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:20;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:27;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:34;

10 d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:41;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:48; e

15 f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:55.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:21;

20 b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:28;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:35;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:42;

25 e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:49; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:56.

Outros anticorpos preferidos da invenção ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos compreendem:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

Uma combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:8.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:2; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:9.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:3; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:10.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:4; e

b) uma região variável de cadeia leve

compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:5; e

5 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:12.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:6; e

10 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:13.

Outra combinação preferida compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:7; e

15 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

Os anticorpos da invenção podem ser, por exemplo, anticorpos de comprimento pleno, por exemplo de um isótopo IgG1 ou IgG4. Alternativamente, os anticorpos podem ser
20 fragmentos de anticorpo, tais como, fragmentos de Fab ou Fab'2 ou anticorpos de cadeia simples.

A invenção também provê um imunoconjugado compreendendo um anticorpo da invenção ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, ligado a um agente terapêutico, tal
25 como, citotoxina ou um isótopo radioativo. A invenção também provê uma molécula biespecífica compreendendo um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo da invenção, ligado a uma segunda fração funcional possuindo uma

especificidade de ligação diferente daquela do anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo.

São também providas composições compreendendo um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, ou
5 imunoconjugado ou molécula biespecífica da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Moléculas de ácido nucléico codificando os anticorpos ou porções de ligação ao antígeno dos mesmos da invenção são também englobados pela invenção, bem como
10 vetores de expressão compreendendo tais ácidos nucléicos e células hospedeiras compreendendo tais vetores de expressão. Além disso, a invenção provê um camundongo transgênico compreendendo transgenes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana, onde o camundongo expressa um
15 anticorpo da invenção, bem como hibridomas preparados de tal camundongo, onde o hibridoma produz o anticorpo da invenção.

Ainda em outro aspecto, a invenção provê um método para modulação da resposta imune em um indivíduo compreendendo administração ao indivíduo do anticorpo ou
20 porção de ligação ao antígeno do mesmo da invenção, tal que a resposta imune no indivíduo é modulada. Preferivelmente, o anticorpo da invenção melhora, estimula ou aumenta a resposta imune no indivíduo.

Em um aspecto adicional, a invenção provê um
25 método para inibir o crescimento das células tumorais em um indivíduo, compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD1, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo. Os anticorpos da

invenção são preferidos para uso no método, embora outros anticorpos anti-PD-1 possam ser usados ao invés (ou em combinação com um anticorpo anti-PD-1 da invenção). Por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 quimérico, completamente humano ou humanizado pode ser empregado no método de inibição do crescimento do tumor.

Em um aspecto adicional, a invenção provê um método para tratar uma doença infecciosa em um indivíduo, compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo. Os anticorpos da invenção são preferidos para uso no método, embora outros anticorpos anti-PD-1 possam ser usados (ou em combinação com um anticorpo anti-PD-1 da invenção). Por exemplo, um anticorpo anti-PD-1 quimérico, humanizado ou completamente humano pode ser usado no método para tratamento de uma doença infecciosa.

Adicionalmente, a invenção provê um método para melhorar uma resposta imune a um antígeno em um indivíduo, compreendendo administração ao indivíduo de: i) o antígeno; e ii) um anticorpo anti-PD-1, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, tal que uma resposta imune ao antígeno no indivíduo é melhorada. O antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno de um agente patogênico. Os anticorpos da invenção são preferidos para uso no método, embora outros anticorpos anti-PD-1 possam ser usados (ou em combinação com um anticorpo anti-PD-1 da invenção). Por exemplo, um

anticorpo anti-PD-1 quimérico, humanizado ou completamente humano pode ser usado no método para melhorar uma resposta imune a um antígeno em um indivíduo.

A invenção também provê métodos para fabricação de anticorpos anti-PD-1 de "segunda geração" com base na seqüência de anticorpos anti-PD-1 provida aqui. Por exemplo, a invenção provê um método para preparação de um anticorpo anti-PD-1 compreendendo:

a) provisão de: i) uma seqüência de anticorpo de uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, e/ou uma seqüência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28; e/ou uma seqüência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35; ou ii) uma seqüência de anticorpo de uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, e/ou uma seqüência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, e/ou uma seqüência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

b) alteração de pelo menos um resíduo de aminoácido dentro de pelo menos uma seqüência de anticorpo da região variável, a seqüência sendo selecionada da seqüência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e uma seqüência de anticorpo da região variável de cadeia

leve, para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e

c) expressão da sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

5 Outros aspectos e vantagens da presente invenção ficarão claros a partir da descrição detalhada que se segue e exemplos que não devem ser tidos como limitantes. O conteúdo de todas referências, entradas de GenBank, patentes e pedidos de patente publicados citados em todo esse pedido
10 são incorporados aqui expressamente como referência.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:57) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:1) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano
15 17D8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:15), CDR2 (SEQ ID NO:22) e CDR3 (SEQ ID NO:29) são delineadas e as derivações de linhagem germinal V, D e J são indicadas.

A figura 1B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:64) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:8) da região
20 variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 17D8. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:36), CDR2 (SEQ ID NO:43) e CDR3 (SEQ ID NO:50) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 2A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ
25 ID NO:58) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:2) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 2D3. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:16), CDR2 (SEQ ID NO:23) e CDR3 (SEQ ID NO:30) são delineadas e as derivações da

linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 2B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:65) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:9) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 2D3.

5 As regiões CDR1 (SEQ ID NO:37), CDR2 (SEQ ID NO:44) e CDR3 (SEQ ID NO:51) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 3A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:59) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:3) da região

10 variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 4H1. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:17), CDR2 (SEQ ID NO:24) e CDR3 (SEQ ID NO:31) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 3B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:66) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:10) da região

15 variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 4H1. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:38), CDR2 (SEQ ID NO:45) e CDR3 (SEQ ID NO:52) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 4A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:60) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:4) da região

20 variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 5C4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:18), CDR2 (SEQ ID NO:25) e CDR3 (SEQ ID NO:32) são delineadas e as derivações da

25 linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 4B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:67) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:11) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 5C4.

As regiões CDR1 (SEQ ID NO:39), CDR2 (SEQ ID NO:46) e CDR3 (SEQ ID NO:53) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

5 A figura 5A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:61) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:5) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 4A11. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:19), CDR2 (SEQ ID NO:26) e CDR3 (SEQ ID NO:33) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

10 A figura 5B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:68) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:12) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 4A11. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:40), CDR2 (SEQ ID NO:47) e CDR3 (SEQ ID NO:54) são delineadas e as derivações da linhagem
15 germinal V e J são indicadas.

A figura 6A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:62) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:6) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 7D3. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:20), CDR2 (SEQ ID NO:27) e
20 CDR3 (SEQ ID NO:34) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 6B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:69) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:13) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 7D3.
25 As regiões CDR1 (SEQ ID NO:41), CDR2 (SEQ ID NO:48) e CDR3 (SEQ ID NO:55) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 7A mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ

ID NO:63) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:7) da região variável de cadeia pesada do anticorpo monoclonal humano 5F4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:28) e CDR3 (SEQ ID NO:35) são delineadas e as derivações da
5 linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 7B mostra a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO:70) e sequência de aminoácido (SEQ ID NO:14) da região variável de cadeia leve do anticorpo monoclonal humano 5F4. As regiões CDR1 (SEQ ID NO:42), CDR2 (SEQ ID NO:49) e CDR3
10 (SEQ ID NO:56) são delineadas e as derivações da linhagem germinal V e J são indicadas.

A figura 8 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 7D3 com a sequência de aminoácido V_H 3-33 da
15 linhagem germinal humana (SEQ ID NO:71).

A figura 9 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 17D8, 2D3 e 7D3 com a sequência de aminoácido V_K L6 da linhagem germinal humana (SEQ ID NO:73).

20 A figura 10 mostra o alinhamento da sequência de aminoácido da região variável de cadeia leve de 4H1 e 5C4 com a sequência de aminoácido V_K L6 da linhagem germinal humana (SEQ ID NO:73).

A figura 11 mostra o alinhamento da sequência de
25 aminoácido da região variável de cadeia pesada de 4A11 e 5F4 com a sequência de aminoácido V_H 4-39 da linhagem germinal humana (SEQ ID NO:72).

A figura 12 mostra o alinhamento da sequência de

aminoácido da região variável de cadeia leve de 4A11 e 5F4 com a sequência de aminoácido V_K L15 da linhagem germinal humana (SEQ ID NO:74).

As figuras 13A-13B mostram os resultados dos experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 5C4 e 4H1, dirigidos contra PD-1 humano, se ligam a superfície celular das células CHO transfectadas com PD-1 humano de comprimento pleno. A figura 13A mostra o gráfico de citometria de fluxo para 5C4. A figura 13B mostra o gráfico de citometria de fluxo para 4H1. A linha fina representa a ligação às células CHO e a linha sólida representa a ligação às células CHO hPD-1.

A figura 14 mostra um gráfico demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, e 4A11, dirigidos contra PD-1 humano, ligam-se especificamente ao PD-1 e não aos outros elementos da família CD28.

As figuras 15A-15C mostram os resultados dos experimentos de citometria de fluxo demonstrando que os anticorpos monoclonais humanos 4H1 e 5C4, dirigidos contra PD-1 humano, se ligam ao PD-1 na superfície da célula. A figura 15A mostra a ligação às células T humanas ativadas. A figura 15B mostra a ligação às células T de macacos *Cynomolgus*. A figura 15C mostra a ligação às células transfectadas CHO expressando PD-1.

As figuras 16A-16C mostram os resultados dos experimentos demonstrando que anticorpos monoclonais humanos contra PD-1 humano promovem a proliferação da célula T, secreção de IFN-gama e a secreção de IL-2 em um ensaio de

reação de linfócito misto. A figura 16A é um gráfico de barras mostrando a proliferação de célula T dependente da concentração; a figura 16B é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN-gama dependente da concentração; a Figura 5 16C é um gráfico de barras mostrando a secreção de IL-2 dependente da concentração.

As figuras 17A-17B mostram os resultados dos experimentos de citometria de fluxo demonstrando que anticorpos monoclonais humanos contra PD-1 humano bloqueiam 10 a ligação de PD-L1 e PD-L2 às células CHO transfectadas expressando PD-1. Figura 17A é um gráfico mostrando a inibição da ligação de PD-L1; A figura 17B é um gráfico mostrando a inibição da ligação de PD-L2.

A figura 18 mostra os resultados dos experimentos 15 de citometria de fluxo demonstrando que anticorpos monoclonais humanos contra PD-1 humano não promovem apoptose de célula T.

A figura 19 mostra os resultados dos experimentos demonstrando que anti-PD-1 de HuMabs possuem uma 20 concentração dependendo do efeito na secreção IFN gama por PBMCs de doadores CMV positivos quando PBMCs foram estimulados com um lisado de CMV e anti-PD-1.

A figura 20 mostra os resultados dos experimentos de crescimento de tumor em um sistema modelo de camundongo 25 demonstrando que o tratamento *in vivo* dos tumores do camundongo com anticorpos anti-PD-1 inibe o crescimento dos tumores.

As figuras 21A a 21D mostram o volume do tumor com

o tempo em camundongos individuais que foram implantados com células de tumor de cólon MC38 (PD-L1⁺) e no mesmo dia tratados com uma das seguintes terapias: (A) IgG de camundongo (controle), (B) anticorpo anti-CTLA-4, (C) anticorpo anti-PD-1, e (D) anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1. Os camundongos receberam tratamentos com anticorpo subseqüentes nos dias 3, 6 e 10 conforme descrito no Exemplo 13 e o volume de tumor foi monitorado por 60 dias.

Figura 22 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na Figura 21.

Figura 23 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na Figura 21.

As figuras 24A a 24D mostram o volume de tumor com o tempo em camundongos individuais que foram implantados com as células tumorais de cólon MC38 (PD-L1⁺) e uma semana mais tarde tratados com uma das seguintes terapias: (A) IgG de camundongo (controle), (B) anticorpo anti-CTLA-4, (C) anticorpo anti-PD-1 e (D) anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1. O volume de tumor no primeiro dia do tratamento foi de cerca de 315 mm³. Os camundongos receberam tratamentos de anticorpo subseqüentes nos dias 3, 6 e 10 conforme descrito no Exemplo 14.

A figura 25 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 24.

A figura 26 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrados na figura 24.

A figura 27 mostra o volume médio do tumor com o

tempo nos camundongos individuais que foram implantados células de tumor de cólon MC38 (PD-L⁻¹) (dia -7) e então tratados nos dias 0, 3, 6 e 10 após implantação (conforme descrito no Exemplo 15) com uma das seguintes terapias: (A)

5 a) IgG de camundongo como um controle (20 mg/kg, X₂₀) b) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg) e IgG de camundongo (10 mg/kg) (P₁₀X₁₀), c) anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg) e IgG de camundongo (10 mg/kg) (C₁₀X₁₀), d) anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg cada) (C₁₀P₁₀), e)

10 anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 (3 mg/kg cada) (C₃P₃), e f) anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 (1 mg/kg cada) (C₁P₁). Dois grupos de camundongos foram tratados com cada anticorpo seqüencialmente como se segue: (G) anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg, dia 0), anticorpo anti-CTLA-4 (10

15 mg/kg, dia 3), anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg, dia 6), e anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg, dia 10) (C₁₀C₁₀P₁₀P₁₀); e (FJ) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg, dia 0), anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg, dia 3), anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg, dia 6), e anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg, dia 10) (10 mg/kg, dia

20 10) (P₁₀P₁₀C₁₀C₁₀).

A figura 28 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 27.

A figura 29 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 27.

25 As figuras 30A a 30F mostram o volume de tumor com o tempo nos camundongos individuais que foram implantados com células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L⁻¹) e um dia mais tarde tratados com uma ou mais das seguintes terapias: A)

PBS (veículo de controle), b) IgG de camundongo (controle de anticorpo, 10 mg/kg), c) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg), d) anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg), e) anticorpo anti-CTLA-4 (0,2 mg/kg), e f) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg) e anticorpo anti-CTLA-4 (0,2 mg/kg). Os camundongos receberam tratamentos de anticorpo subseqüentes nos dias 4, 7 e 11 conforme descrito no Exemplo 16 e o volume do tumor foi monitorado por 41 dias.

A figura 31 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 29.

A figura 32 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 29.

As figuras 33A a 33J mostram o volume de tumor com o tempo em camundongos individuais que foram implantados com células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁺) e então tratadas nos dias 7, 10, 13 e 17 pós-implantação (conforme descrito no Exemplo 17) com uma das seguintes terapias: A) PBS (veículo de controle), b) IgG de camundongo (veículo de controle, 10 mg/kg), c) anticorpo anti-CTLA-4 (0,25 mg/kg), d) anticorpo anti-CTLA-4 (0,5 mg/kg), e) anticorpo anti-CTLA-4 (5 mg/kg), f) anticorpo anti-PD-1 (3 mg/kg), (G) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg), (H) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg) e anticorpo anti-CTLA-4 (0,25 mg/kg), (I) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg) e anticorpo anti-CTLA-4 (0,5 mg/kg), e f) anticorpo anti-PD-1 (3 mg/kg) e anticorpo anti-CTLA-4 (0,5 mg/kg). O volume do tumor no primeiro dia de tratamento foi de cerca de 110 mm³.

A figura 34 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 33.

A figura 35 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 33.

As figuras 36A e 36B mostram o volume do tumor com o tempo em camundongos individuais que foram implantados com células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1-) e então tratados nos dias 10, 13, 16 e 19 após a implantação (conforme descrito no Exemplo 17) com uma das seguintes terapias: a) IgG de camundongo (anticorpo de controle, 10 mg/kg) ou b) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg) e anticorpo anti-CTLA-4 (1 mg/kg). O volume do tumor no primeiro dia de tratamento foi de 250 mm³.

A figura 37 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 36.

A figura 38 mostra o volume médio do tumor dos camundongos mostrado na figura 36.

A figura 39 mostra a inibição do tumor percentual média calculada dos volumes de tumor mostrados nas figuras 33 e 36.

Figuras 40A a 40D mostram o volume de tumor nos camundongos BALB/c que foram implantados subcutaneamente com células de adenocarcinoma renal RENCA (PD-L1⁺) (Murphy and Hrushesky (1973) *J. Natl. Cancer Res.* 50:1013-1025) (dia -12) e então tratadas intraperitonealmente nos dias 0, 3, 6 e 9 pós-implantação com uma das seguintes terapias: a) IgG de camundongo (anticorpo de controle, 20 mg/kg), b) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg), c) anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg), e d) anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg) em combinação com o anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg). O volume do tumor no

primeiro dia do tratamento foi de cerca de 115 mm³.

A figura 41 mostra que a ligação da proteína de fusão PD-L2-Fc de camundongo ao PD-1 de camundongo (mPD-1) é bloqueada por anticorpo anti-mPD-1 4H2 em um modo dependente da dose. A ligação é detectada por medição da fluorescência da IgG anti-rato de burro marcada com FITC por ELISA. Quanto maior a MFI (intensidade de fluorescência média) maior a ligação.

A figura 42 mostra as curvas de ligação dos anticorpos anti-mPD-1 à proteína de fusão mPD-1-Fc imobilizada por ELISA.

A figura 43 mostra a curva de ligação do anticorpo anti-mPD-1 de rato 4H2.B3 às células CHO expressando mPD-1. A ligação foi detectada com IgG anti-rato de burro, conjugada com FITC e medida por FACS (MFI).

A figura 44 mostra a curva de ligação da proteína de fusão mPD-L1-hFc às células CHO expressando mPD-1 na presença de concentrações crescentes de anticorpo anti-mPD-1 4H2.B3. A ligação foi detectada com IgG anti-humano de cabra, conjugada com FITC e medida por FACS (MFI).

A figura 45 mostra as curvas de ligação de anticorpo anti-mPD-1 de rato 4H2.B3 às células CHO expressando mPD-1 conforme comparadas ao anticorpo anti-mPD-1 de camundongo 4H2:rato quimérico.

A figura 46 mostra as curvas de ligação da proteína de fusão mPD-L1-hFc às células CHO expressando mPD-1 na presença de concentrações crescentes de anticorpo anti-mPD-1 de rato 4H2.B3 ou anticorpo anti-mPD-1 de camundongo

4H2:rato quimérico.

A figura 47 mostra o volume médio do tumor dos camundongos isentos de tumor previamente preparados com anticorpo anti-PD1 e desafiados novamente com células de
5 fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁻). Conforme mostrado é o volume médio do tumor de camundongos puros (controle, não previamente desafiados ou tratados) implantadas com células de fibrosarcoma SA1/N.

A figura 48 mostra o volume do tumor com o tempo
10 nos camundongos individuais, que sobreviveram à retirada do tumor seguindo implantação de células de tumor de cólon MC38 (PD-L1⁻) e tratamento com anticorpo anti-PD1 ou uma combinação do anticorpo anti-PD1 e anticorpo anti-CTLA-4), desafiados novamente com 10 vezes mais células de tumor de
15 cólon MC38 que em relação ao tratamento inicial. Também é mostrado o volume médio do tumor do camundongo puro (controle, não previamente desafiado ou tratado) implantado com células de tumor de cólon MC38.

A figura 49 mostra o volume médio do tumor dos
20 camundongos mostrado na figura 48.

A figura 50 mostra o volume médio do tumor com o tempo em camundongos individuais que receberam implante de células de tumor de cólon CT26.

As figuras 51A-B mostram os resultados dos
25 experimentos demonstrando que anticorpos monoclonais humanos contra PD-1 humano promovem a proliferação da célula T e secreção de IFN-gama nas culturas contendo células reguladoras T. A figura 50A é um gráfico de barras mostrando

proliferação de célula T dependente de concentração usando HuMAb 5C4; a figura 50B é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN-gama dependente de concentração usando HuMAb 5C4.

5 As figuras 52A-B mostram os resultados dos experimentos demonstrando que anticorpos monoclonais humanos contra PD-1 humano promovem a proliferação da célula T e secreção de IFN-gama nas culturas contendo células T ativadas. A figura 51A é um gráfico de barras mostrando
10 proliferação de célula T dependente de concentração usando HuMAb 5C4; a figura 51B é um gráfico de barras mostrando a secreção de IFN-gama dependente de concentração usando HuMAb 5C4.

15 A figura 53 mostra os resultados de um ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) demonstrando que os anticorpos anti-PD-1 monoclonais humanos exterminam as células T ativadas em um modo dependente da concentração de ADCC, em relação à região Fc do anticorpo anti-PD-1.

20 A figura 54 mostra os resultados de um ensaio de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) demonstrando que os anticorpos anti-PD-1 monoclonais humanos não exterminam células T ativadas humanas em um modo dependente da concentração de CDC.

25 Melhor Modo de Realizar a Invenção

Em um aspecto, a presente invenção se refere aos anticorpos monoclonais isolados, especificamente anticorpos monoclonais humanos, que se ligam especificamente ao PD-1.

Em determinadas modalidades, os anticorpos da invenção exibem uma ou mais propriedades funcionais desejáveis, tais como, ligação de afinidade alta ao PD-1, falta de reatividade cruzada aos outros elementos da família CD28, a
5 capacidade de estimular proliferação da célula T, IFN- γ e/ou a secreção de IL-2 nas reações de linfócito mistas, a capacidade de inibir ligação de um ou mais ligantes PD-1 (por exemplo, PD-L1 e/ou PD-L2), a capacidade de reação cruzada com PD-1 de macaco *Cynomolgus*, a capacidade de
10 estimular respostas de memória específicas de antígeno, a capacidade de estimular respostas de anticorpo e/ou a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais *in vivo*. Adicional ou alternativamente, os anticorpos da invenção são derivados de seqüências específicas de linhagem
15 germinal de cadeia pesada e leve e/ou compreendem aspectos estruturais específicos, tais como, regiões CDR compreendendo seqüências de aminoácido específicas. Em outro aspecto, a invenção se refere ao uso combinado de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao PD-1 e aos
20 anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao CTLA-4.

A invenção provê, por exemplo, anticorpos isolados, métodos para fabricação de tais anticorpos, imunoconjugados e moléculas biespecíficas compreendendo tais
25 anticorpos e composições farmacêuticas contendo os anticorpos, imunoconjugados ou moléculas biespecíficas da invenção.

Em outro aspecto, a invenção se refere aos métodos

para inibir o crescimento das células tumorais em um indivíduo empregando anticorpos anti-PD-1. Conforme demonstrado aqui, os anticorpos anti-PD-1 são capazes de inibir o crescimento celular tumoral *in vivo*. A invenção
5 também se refere aos métodos de uso de tais anticorpos para modificar a resposta imune, bem como para tratar as doenças, tais como, câncer ou doença infecciosa, ou para estimular uma resposta autoimune de proteção ou para estimular respostas imunes específicas de antígeno (por exemplo, co-
10 administração de um anti-PD-1 com um antígeno de interesse).

De modo que a presente invenção possa ser mais prontamente entendida, determinados termos serão primeiro definidos. Definições adicionais são estabelecidas através de toda a descrição detalhada.

15 Os termos "Morte Programada 1", "Morte Celular Programada 1", "PD-1 de proteína", "PD-1," PD1," "PDCD1," "hPD-1" e "hPD-F são empregados intercambiavelmente, e incluem variantes, isoformas, espécies homólogas do PD-1 humano, e análogos possuindo pelo menos um epítipo comum com
20 PD-1. A sequência de PD-1 completa pode ser encontrada no GenBank Número de Acesso U64863.

Os termos "antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico", "CTLA-4," "CTLA4," "antígeno de CTLA-4" e "CD152" (vide, por exemplo, Murata, *Am. J. Pathol.* (1999)
25 155:453-460) são empregados intercambiavelmente, e incluem variantes, isoformas, espécies homólogas ao CTLA-4 humano, e análogos possuindo pelo menos um epítipo comum com CTLA-4 (vide, por exemplo, Balzano (1992) *Int. J. Cancer Suppl.*

7:28-32). A sequência de ácido nucléico de CTLA-4 completa pode ser encontrada no GenBank Número de Acesso L15006.

O termo "resposta imune" se refere à ação, por exemplo, dos linfócitos, células apresentando antígeno, células fagocíticas, granulócitos e macromoléculas solúveis produzidas pelas células acima ou do fígado (incluindo anticorpos, citocinas e complemento) que resulta em lesão seletiva, destruição ou eliminação do corpo humano de agentes patogênicos invasores, células ou tecidos infectados com agentes patogênicos, células cancerígenas ou nos casos de autoimunidade ou inflamação patológica, células de tecido normal ou tecidos.

Uma "via de transdução de sinal" se refere à relação bioquímica entre uma variedade de moléculas de transdução de sinal que desempenham um papel na transmissão de um sinal de uma porção de uma célula para outra porção da célula. Conforme usado aqui, a frase "receptor de superfície da célula" inclui, por exemplo, moléculas e complexos de moléculas capazes de receber um sinal e a transmissão de tal sinal através da membrana plasmática de uma célula. Um exemplo de um "receptor de superfície celular" da presente invenção é um receptor PD-1.

O termo "anticorpo" conforme referido aqui inclui anticorpos totais e qualquer fragmento de ligação ao antígeno (isto é, "porção de ligação ao antígeno") ou cadeias simples do mesmo. Um "anticorpo" se refere a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações

dissulfeto ou uma porção de ligação ao antígeno das mesmas. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve (abreviada como V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve é compreendida do domínio C_L . As regiões V_H e V_L podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação da complementariedade (CDR), dispersas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino para o terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar à ligação da imunoglobulina aos tecidos do hospedeiro ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efetoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complemento clássico.

O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção do anticorpo"), conforme usado aqui, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que mantêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (por exemplo, PD-1). Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um

anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento pleno. Exemplos de fragmentos de ligação englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo dos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de articulação; iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e C_{H1} ; iv) um fragmento Fv dos domínios V_L e V_H de uma ramificação simples de um anticorpo, v) um fragmento dAb (Ward e outros, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste em um domínio V_H ; e (vi) uma região de determinação de complementariedade (CDR). Adicionalmente, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que os mesmos se tornem uma cadeia de proteína simples onde as regiões V_L e V_H se emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia simples Fv (scFv); vide, por exemplo, Bird e outros (1988) *Science* 242:423-426; e Huston e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples são englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" do anticorpo. Esses fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas dos versados na arte e os fragmentos são classificados quanto à utilidade da mesma maneira como são corpos intactos.

Um "anticorpo isolado" conforme usado aqui, se

refere a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos possuindo especificidades diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente ao PD-1 é substancialmente isento de anticorpos que se ligam especificamente aos antígenos diferentes de PD-1). Um anticorpo isolado que se liga especificamente ao PD-1 pode, contudo, possuir reatividade cruzada em relação a outros antígenos, tais como, moléculas de PD-1 de outras espécies. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outro material celular e/ou substâncias químicas.

Os termos "anticorpo monoclonal" ou "composição de anticorpo monoclonal" conforme empregados aqui se referem à preparação as moléculas de anticorpo da composição molecular simples. Uma composição de anticorpo monoclonal revela especificidade e afinidade de ligação simples a um epítopo específico.

O termo "anticorpo humano" conforme empregado aqui inclui anticorpos possuindo regiões variáveis onde ambas as regiões de estrutura e CDR são derivadas das seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal. Adicionalmente, se o anticorpo contiver uma região constante, a região constante também será derivada das seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese específica ou aleatória de sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). Contudo, o termo "anticorpo humano"

conforme usado aqui, não se destina a incluir anticorpos onde as seqüências de CDR derivadas da linhagem germinal de outras espécies de mamíferos, tais como, camundongo, foram enxertadas nas seqüências de estrutura humana.

5 O termo "anticorpo monoclonal humano" se refere aos anticorpos revelando uma especificidade de ligação simples que possui regiões variáveis onde ambas as regiões de estrutura e CDR são derivadas das seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Em uma
10 modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, possuindo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve
15 fundidos em uma célula imortalizada.

 O termo "anticorpo humano recombinante" conforme empregado aqui, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como a) anticorpos isolados de um animal
20 (por exemplo, camundongo) que é transgênico ou transcromossômico aos genes da imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado dos mesmos (descrito a seguir), b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira para expressarem o anticorpo humano, por exemplo, de um
25 transfectoma, c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatórios, recombinantes e d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva recomposição das seqüências

gênicas da imunoglobulina humana em outras seqüências de DNA. Tais anticorpos humanos recombinantes possuem regiões variáveis onde as regiões de estrutura e CDR são derivadas das seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Em determinadas modalidades, contudo, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos à mutagênese *in vitro* (ou quando é empregado um animal transgênico para seqüências Ig humanas, na mutagênese somática *in vivo*) e assim as seqüências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, enquanto derivadas e relacionadas às seqüências V_H e V_L da linhagem germinal humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linhagem germinal de anticorpo humano *in vivo*.

Conforme usado aqui, "isótopo" se refere a uma classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificada pelos genes da região constante de cadeia pesada.

As frases "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usadas intercambiavelmente aqui com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno".

O termo "derivados de anticorpo humano" se refere a qualquer forma modificada de anticorpo humano, por exemplo, um conjugado de anticorpo e outro agente ou anticorpo.

O termo "anticorpo humanizado" se refere aos anticorpos onde as seqüências de CDR derivadas da linhagem germinal de outras espécies de mamíferos, tais como,

camundongo, foram enxertadas nas seqüências de estrutura humana. Modificações adicionais da região de estrutura podem ser feitas dentro das seqüências de estrutura humana.

O termo "anticorpo quimérico" se refere aos anticorpos onde as seqüências de região variável são derivadas de uma espécie e as seqüências de região constante são derivadas de outra espécie, tal como um anticorpo no qual as seqüências de região variável são derivadas de um anticorpo de camundongo e as seqüências de região constante são derivadas de um anticorpo humano.

Conforme usado aqui, um anticorpo que "se liga especificamente ao PD-1 humano" se refere a um anticorpo que se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos, mais preferivelmente 5×10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 1×10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 5×10^{-9} ou menos.

O termo " K_{assoc} " ou " K_a " conforme usado aqui, se refere à razão de associação de uma interação de anticorpo-antígeno específica, considerando-se que o termo " K_{dis} " ou " K_d " se refere à razão de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno específica. O termo " K_D " conforme usado aqui se refere à constante de dissociação, que é obtida da razão de K_d a K_a (isto é, K_d/K_a) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores de K_D para anticorpos podem ser determinados usando métodos bem estabelecidos na arte. Um método preferido para determinar a K_D de um anticorpo é por emprego de ressonância de plasmônio preferivelmente usando um sistema biosensor tal como o

sistema Biacore^(R).

Conforme usado aqui, o termo "afinidade alta" com relação a um anticorpo IgG se refere a um anticorpo possuindo uma K_D de 10^{-8} M ou menos, mais preferivelmente 10^{-9} M ou menos e mesmo mais preferivelmente 10^{-10} M ou menos para um antígeno alvo. Contudo, ligação de "afinidade alta" pode variar para outros isótopos de anticorpo. Por exemplo, ligação de "afinidade alta" para um isótopo IgM se refere a um anticorpo possuindo uma K_D de 10^{-7} M ou menos, mais preferivelmente 10^{-8} M ou menos, mesmo mais preferivelmente 10^{-9} M ou menos.

O termo "tratamento" ou "terapia" se refere à administração de um agente ativo com a finalidade de cura, cicatrização, alívio, atenuação, alteração, remediação, melhora, aperfeiçoamento ou de afetar uma condição (por exemplo, uma doença), os sintomas da condição ou para prevenir ou retardar o início dos sintomas, complicações, indícios bioquímicos de uma doença ou de outra formar parar ou inibir o desenvolvimento adicional da doença, condição ou transtorno de um modo estatisticamente significativo.

"Efeito adverso" (AE) conforme empregado aqui significa qualquer sinal (incluindo uma verificação laboratorial anormal), sintoma ou doença desfavorável e geralmente involuntário, mesmo indesejável, associada ao uso de um tratamento médico. Por exemplo, um evento adverso pode estar associado à ativação do sistema imune ou expansão das células do sistema imune (por exemplo, células T) em resposta a um tratamento. Um tratamento médico pode ter um

ou mais AEs associados e cada AE pode ter o mesmo nível de gravidade ou diferente. A referência aos métodos capazes de "alterar os eventos adversos" significa um regime de tratamento que diminui a incidência e/ou gravidade de um ou
5 mais AEs associados ao uso de um regime de tratamento diferente.

Conforme empregado aqui "doença hiperproliferativa" se refere às condições onde o crescimento celular é aumentado em níveis normais. Por
10 exemplo, doenças hiperproliferativas ou transtornos incluem doenças malignas (por exemplo, câncer esofageano, câncer de cólon, câncer biliar) e doenças não malignas (por exemplo, aterosclerose, hiperplasia benigna, hipertrofia prostática benigna).

15 Conforme empregado aqui "dose subterapêutica" significa uma dose de um composto terapêutico (por exemplo, um anticorpo) que é mais baixa que a usual ou dose típica de composto terapêutico quando administrada sozinha para o tratamento de uma doença hiperproliferativa (por exemplo,
20 câncer). Por exemplo, uma dose subterapêutica ou anticorpo CTLA-4 é uma dose simples do anticorpo em menos de cerca de 3 mg/kg, isto é, a dose conhecida do anticorpo anti-CTLA-4.

O uso da alternativa (por exemplo, "ou") deve ser entendido como significando uma, ambas ou qualquer
25 combinação das alternativas. Conforme empregado aqui, os artigos indefinidos "um, uma" devem ser entendidos como se referindo a "um ou mais" de quaisquer dos componentes citados ou enumerados.

Conforme empregado aqui, "cerca de" ou "compreendendo essencialmente" dentro de uma faixa de erro aceitável para o valor específico conforme determinado por um versado na técnica, dependerá em parte de como o valor é medido ou determinado, isto é, as limitações do sistema de medição. Por exemplo, "cerca de" ou "compreendendo essencialmente" podem significar dentro de 1 ou mais de 1 desvio padrão para a prática da técnica. Alternativamente, "cerca de" ou "compreendendo essencialmente" significa uma faixa de até 20%. Adicional e especificamente com relação aos sistemas biológicos ou processos, os termos podem significar até uma ordem de grandeza ou até 5 vezes o valor. Quando são providos valores específicos no pedido e nas reivindicações, a menos que de outra forma declarado, o significado de "cerca de" ou "compreendendo essencialmente" seria presumido como estando dentro de uma faixa de erro aceitável para aquele valor específico.

Conforme descrito aqui, qualquer faixa de concentração, faixa de porcentagem ou faixa de inteiro deve ser entendida como incluindo o valor de qualquer inteiro dentro da faixa citada e, quando apropriado, as frações do mesmo (tais como, um décimo a um centésimo de um inteiro) a menos que de outra forma indicado.

Conforme usado aqui, o termo "indivíduo" inclui qualquer ser humano ou animal não humano. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como, primatas não humanos, carneiros, cães, gatos, cavalos, gado, galinhas, anfíbios,

répteis, etc. Exceto quando citado, os termos "paciente" ou "indivíduo" são usados intercambiavelmente.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas subseções que se seguem.

5 Anticorpos Anti-PD-1

Os anticorpos da invenção são caracterizados por aspectos funcionais específicos ou propriedades dos anticorpos. Por exemplo, os anticorpos se ligam especificamente ao PD-1 (por exemplo, se ligam ao PD-1 humano e podem sofrer reação cruzada com PD-1 de outras espécies, tais como, macacos *Cynomolgus*). Preferivelmente, um anticorpo da invenção se liga ao PD-1 com afinidade alta por exemplo com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos. Os anticorpos anti-PD-1 da invenção preferivelmente exibem uma ou mais das seguintes características:

10

15

a) se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos;

b) não se liga substancialmente a CD28, CTLA-4 ou ICOS humana;

20 c) aumenta a proliferação da célula T em um ensaio de Reação de Linfócito Misto (MLR);

d) aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio de MLR; ou

e) aumenta a secreção de IL-2 em um ensaio de MRL;

25 f) se liga ao PD-1 humano e PD-1 de macaco *Cynomolgus*;

g) inibe a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 ao PD-1;

h) estimula respostas de memória específicas de

antígeno;

i) estimula respostas de anticorpo;

j) inibe o crescimento da célula tumoral *in vivo*;

Preferivelmente o anticorpo se liga ao PD-1 humano
 5 com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos, se liga ao PD-1 humano com
 uma K_D de 1×10^{-8} M ou menos, se liga ao PD-1 humano com uma
 K_D de 5×10^{-9} M ou menos ou se liga ao PD-1 humano com uma
 K_D entre 1×10^{-8} M e 1×10^{-10} M.

Um anticorpo da invenção pode exibir qualquer
 10 combinação dos aspectos listados acima, tais como, dois,
 três, quatro, cinco ou mais aspectos listados acima.

Os ensaios padrão para avaliar a capacidade de
 ligação dos anticorpos na direção de PD-1 são conhecidos na
 técnica, incluindo, por exemplo, ELISAs, Western blots e
 15 RIAs. A cinética de ligação (por exemplo, afinidade de
 ligação) dos anticorpos pode também ser avaliada por ensaios
 padrão conhecidos na técnica, tais como, por análise
 Biacore. Ensaios apropriados para avaliar qualquer uma das
 características descritas acima são mencionados em detalhes
 20 nos Exemplos.

Anticorpos Monoclonais 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4

Os anticorpos preferidos da invenção são os
 anticorpos monoclonais humanos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11,
 25 7D3 e 5F4 isolados e caracterizados estruturalmente conforme
 descrito nos Exemplos 1 e 2. As seqüências de aminoácido V_H
 de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 são mostradas nas
 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. As

seqüências de aminoácido V_L de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, respectivamente.

Dado que cada um desses anticorpos pode se ligar
5 ao PD-1, as seqüências V_H e V_L podem ser "misturadas e combinadas" para criar outras moléculas de ligação anti-PD-1 da invenção. A ligação de PD-1 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada empregando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por
10 exemplo, ELISAs). Preferivelmente, quando as cadeias V_H e V_L são misturadas e combinadas, uma seqüência V_H de um emparelhamento específico V_H/V_L é substituída por uma seqüência V_H estruturalmente semelhante. Da mesma forma, preferivelmente, uma seqüência V_L de um emparelhamento
15 específico V_H/V_L é substituída por uma seqüência V_L estruturalmente semelhante.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo:

20 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do
25 grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14;

onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1, preferivelmente PD-1 humano. Combinações de cadeia leve e pesada preferidas incluem:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:8; ou

5 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:2; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:9; ou

10 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:3; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:10; ou

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:4; e b) 15 uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11; ou

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:5; e b) 20 uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:12; ou

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:6; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:13; ou

25 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:7; e b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

Em outro aspecto, a invenção provê anticorpos que compreendem a cadeia pesada e a cadeia leve CDR1s, CDR2s e CDR3s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4, ou combinações das mesmas. As seqüências de aminoácidos de CDR1s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 de V_H são mostradas nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, respectivamente. As seqüências de aminoácidos de CDR2s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 de V_H são mostradas nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, respectivamente. As seqüências de aminoácidos de CDR3s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 de V_H são mostradas nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, respectivamente. As seqüências de aminoácidos de CDR1s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 de V_k são mostradas nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, respectivamente. As seqüências de aminoácidos de CDR2s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 de V_k são mostradas nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, respectivamente. As seqüências de aminoácidos de CDR3s de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 de V_k são mostradas nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56, respectivamente. As regiões CDR são delineadas usando o sistema Kabat (Kabat, E. A., e outros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, Publicação NTH Número 91-3242).

Dado que esses anticorpos podem se ligar ao PD-1 e que a especificidade de ligação do antígeno é provida primariamente pelas regiões CDR2, CDR2, e CDR3, as seqüências de CDR1, CDR2, e CDR3 de V_H e seqüências CDR1,

CDR2, e CDR3 de V_K podem ser "misturadas e combinadas" (isto é, CDRs de anticorpos diferentes podem ser misturadas e combinadas, embora cada anticorpo possa conter uma CDR1, CDR2, e CDR3 de V_H e uma CDR1, CDR2, e CDR3 de V_K) para
5 criar as outras moléculas de ligação anti-PD-1 da invenção. A ligação PD-1 de tais anticorpos "misturados e combinados" pode ser testada usando os ensaios de ligação descritos acima e nos Exemplos (por exemplo, ELISAs, análise Biacore). Preferivelmente, quando as seqüências de CDR de V_H são
10 misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_H específica é substituída com seqüência(s) CDR estruturalmente semelhantes. Da mesma forma, quando as seqüências CDR de V_K são misturadas e combinadas, a seqüência CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de uma seqüência V_K
15 específica preferivelmente é substituída por seqüência(s) CDR estruturalmente semelhantes. Ficará claro aos versados na arte que as novas seqüências V_H e V_L podem ser criadas por substituição das seqüências da região CDR de V_H e/ou V_L com seqüências estruturalmente semelhantes e das seqüências
20 CDR reveladas aqui para anticorpos monoclonais 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4.

Conseqüentemente, em outro aspecto, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo compreendendo:

- 25 a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28;

5 c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1
10 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2
15 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3
20 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1, preferivelmente PD-1 humano.

Em uma modalidade preferida o anticorpo compreende:

25 a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:15;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:22;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:29;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:36;

5 e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:43; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:50.

Em outra modalidade preferida, o anticorpo
10 compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:16;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:23;

15 c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:30;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:37;

e) uma região variável de cadeia leve CDR2
20 compreendendo a SEQ ID NO:44; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:51.

Em outra modalidade preferida, o anticorpo compreende:

25 a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:17;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:24;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:31;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:38;

5 e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:45; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:52.

10 Em outra modalidade preferida, o anticorpo compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:18;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:25;

15 c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:32;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:39;

20 e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:46; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:53.

Em outra modalidade preferida, o anticorpo compreende:

25 a) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:19;

b) uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:26;

c) uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:33;

d) uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo a SEQ ID NO:40;

5 e) uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo a SEQ ID NO:47; e

f) uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo a SEQ ID NO:54.

Anticorpos Possuindo Sequências de Linhagem

10 Germinal Específicas

Em determinadas modalidades, um anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada de um gene de imunoglobulina de cadeia pesada de linhagem germinal específica e/ou região variável de cadeia leve de um gene de imunoglobulina de cadeia leve de linhagem germinal específica.

Por exemplo, em uma modalidade preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 3-33 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1, preferivelmente PD-1 humano. Em outra modalidade preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 4-39 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1, preferivelmente PD-1 humano. Ainda em uma outra modalidade

preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K L6 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1, preferivelmente PD-1 humano. Ainda em uma outra modalidade preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K L15 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1, preferivelmente PD-1 humano. Ainda em uma outra modalidade preferida, a invenção provê um anticorpo monoclonal isolado, ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, onde o anticorpo:

a) compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou é derivada de um gene V_H 3-33 ou 4-39 humano (o gene codificando a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO:71 ou 73, respectivamente);

b) compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto ou é derivada de um gene V_K L6 ou L15 humano (o gene codificando a sequência de aminoácido estabelecida na SEQ ID NO:72 ou 74, respectivamente); e

c) se liga especificamente ao PD-1.

Exemplos de anticorpos possuindo V_H e V_K de V_H 3-33 e V_K L6, respectivamente são 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, e 7D3. Exemplos de anticorpos possuindo V_H e V_K de V_H 4-39 e V_K L15, respectivamente, são 4A11 e 5F4.

Conforme usado aqui, um anticorpo humano compreende regiões variáveis de cadeia pesada ou leve que é

"o produto de" ou "derivado de" uma sequência de linhagem germinal específica, se as regiões variáveis do anticorpo forem obtidas de um sistema que emprega genes de imunoglobulina de linhagem germinal humana. Tais sistemas

5 incluem imunização de um camundongo transgênico portando genes de imunoglobulina humana com o antígeno de interesse ou classificação de uma biblioteca de genes da imunoglobulina humana revelados no fago com o antígeno de interesse. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou

10 "derivado de" uma sequência de imunoglobulina de linhagem germinal humana pode ser identificado como tal por comparação da sequência de aminoácido do anticorpo humano com as sequências de aminoácido das imunoglobulinas de linhagem germinal humana e seleção da sequência de

15 imunoglobulina da linhagem germinal humana que está mais próxima na sequência (isto é, a maior porcentagem de identidade) em relação à sequência de anticorpo humano. Um anticorpo humano que é "o produto de" ou "derivado de" uma sequência de imunoglobulina de linhagem germinal humana

20 específica pode conter diferenças de aminoácido em comparação à sequência de linhagem germinal devido, por exemplo, às mutações somáticas que ocorrem naturalmente ou introdução intencional de mutação direcionada ao sítio. Contudo, um anticorpo humano selecionado tipicamente é pelo

25 menos 90% idêntico na sequência de aminoácidos à sequência de aminoácido codificada por um gene de imunoglobulina de linhagem germinal humano e contém resíduos de aminoácido que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando

comparado às seqüências de aminoácido de imunoglobulina de linhagem germinal de outras espécies (por exemplo, seqüências de linhagem germinal de murino). Em determinados casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95% ou mesmo 5 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico na seqüência de aminoácido à seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linhagem germinal. Tipicamente, um anticorpo humano derivado de uma seqüência de linhagem germinal humana específica mostrará não mais de 10 10 diferenças de aminoácido da seqüência de aminoácido codificada pelo gene de imunoglobulina de linhagem germinal humano. Em determinados casos, o anticorpo humano pode mostrar não mais de 5, ou mesmo não mais de 4, 3, 2 ou 1 diferenças de aminoácido da seqüência de aminoácido 15 codificada pelo gene de imunoglobulina de linhagem germinal.

Anticorpos Homólogos

Ainda em outra modalidade, um anticorpo da invenção compreende regiões variáveis de cadeia pesada e leve compreendendo seqüências de aminoácido que são 20 homólogas às seqüências de aminoácidos dos anticorpos preferidas descritas aqui, e onde os anticorpos mantêm as propriedades funcionais desejadas dos anticorpos anti-PD-1 da invenção.

Por exemplo, a invenção provê um anticorpo 25 monoclonal isolado, ou porção de ligação de antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

a) a região variável de cadeia pesada compreende

uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7;

b) a região variável de cadeia leve compreende uma
5 sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOS: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14; e

o anticorpo exibe uma ou mais das seguintes propriedades:

10 c) o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos;

d) o anticorpo substancialmente não se liga a CD28, CTLA-4 ou ICOS humana;

e) o anticorpo aumenta a proliferação da célula T
15 em um ensaio MLR;

f) o anticorpo aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio MLR;

g) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 em um ensaio de MRL;

20 h) o anticorpo se liga ao PD-1 humano e PD-1 de macaco *Cynomolgus*;

i) o anticorpo inibe a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 ao PD-1;

j) o anticorpo estimula respostas de memória
25 específicas de antígeno;

k) o anticorpo estimula respostas de anticorpo;

l) o anticorpo inibe o crescimento da célula tumoral *in vivo*.

Em outras modalidades, as seqüências V_H e/ou V_L do aminoácido podem ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% homólogas às seqüências estabelecidas acima. Um anticorpo possuindo regiões de V_H e V_L com alta homologia (isto é, 80% ou mais) em relação às regiões V_H e V_L das seqüências estabelecidas acima pode ser obtido por mutagênese (por exemplo, mutagênese mediada por PCR ou direcionada ao sítio) das moléculas de ácido nucléico codificando as SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70, seguido pelo teste do anticorpo alterado codificado para função mantida (isto é, as funções estabelecidas em c) a 1) acima) usando os ensaios descritos aqui.

Conforme descrito aqui, a porcentagem de homologia entre duas seqüências de aminoácido é equivalente à porcentagem de identidade entre as duas seqüências. A porcentagem de identidade entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, % de homologia = $\frac{\# \text{ de posições idênticas}}{\# \text{ total de posições}} \times 100$), levando-se em consideração o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo, que precisam ser introduzidas para alinhamento ótimo de duas seqüências. A comparação das seqüências e determinação da porcentagem de identidade entre duas seqüências pode ser realizada usando um algoritmo matemático, conforme descrito nos exemplos não limitantes a seguir.

A porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de E.

Meyers e W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela residual de peso PAM120, uma penalidade de comprimento do intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Além disso, a porcentagem de identidade entre duas seqüências de aminoácido pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que foi incorporado ao programa GAP no pacote de software GCG (disponível na www.gcg.com), usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250 e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

Adicional ou alternativamente, as seqüências de proteína da presente invenção podem ser usadas adicionalmente como uma "seqüência de questão" para realizar uma busca contra bases de dados públicas, por exemplo, para identificar as seqüências correlatas. Tais pesquisas podem ser realizadas usando o programa XBLAST (versão 2.0) de Altschul e outros (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Pesquisas da proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, classificação = 50, comprimento da palavras = 3 para obter seqüências de aminoácido homólogas às moléculas de anticorpo da invenção. Para obter os alinhamentos com intervalos para fins de comparação, BLAST com Intervalo pode ser utilizado conforme descrito em Altschul e outros, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Quanto se utiliza programas BLAST e BLAST com Intervalo, os parâmetros padrão dos respectivos programas

(por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. (vide www.ncbi.nlm.nih.gov).

Anticorpos com Modificações Conservadoras

Em determinadas modalidades, um anticorpo da
5 invenção compreende uma região variável de cadeia pesada
compreendendo as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 e uma região
variável de cadeia leve compreendendo as seqüências CDR1,
CDR2 e CDR3, onde uma ou mais dessas seqüências CDR
compreendem seqüências de aminoácido específicas com base
10 nos anticorpos preferidos descritos aqui (por exemplo, 17D8,
2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4), ou modificações
conservadoras das mesmas, e onde os anticorpos mantêm as
propriedades funcionais desejadas anticorpos anti-PD-1 da
invenção. Conseqüentemente, a invenção provê um anticorpo
15 monoclonal isolado ou porção de ligação ao antígeno do
mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada
compreendendo as seqüências CDR1, CDR2 CDR3 e uma região
variável de cadeia leve compreendendo as seqüências CDR1,
CDR2 e CDR3 onde:

20 a) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia
pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do
grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID
NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, e modificações
conservadoras das mesmas;

25 b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia
leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do
grupo consistindo na seqüência de aminoácido das SEQ ID NOs:
50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56, e modificações conservadoras

das mesmas; e

o anticorpo exibe um ou mais das seguintes propriedades:

c) o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D
5 de 1×10^{-7} M ou menos;

d) o anticorpo substancialmente não se liga a CD28, CTLA-4 ou ICOS humana;

e) o anticorpo aumenta a proliferação da célula T em um ensaio MLR;

10 f) o anticorpo aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio MLR;

g) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 em um ensaio MLR;

15 h) o anticorpo se liga ao PD-1 humano e PD-1 de macaco *Cynomolgus*;

i) o anticorpo inibe a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 ao PD-1;

6 j) o anticorpo estimula respostas de memória específicas de anticorpo;

20 k) o anticorpo estimula respostas de anticorpo;

(l) o anticorpo inibe o crescimento de célula tumoral *in vivo*.

Em uma modalidade preferida, a sequência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de
25 aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, e modificações conservadoras das mesmas; e a sequência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de

aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, e modificações conservadoras das mesmas. Em outra modalidade preferida, a seqüência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, e modificações conservadoras das mesmas; e a seqüência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, e modificações conservadoras das mesmas.

Conforme usado aqui, o termo "modificações conservadoras da seqüência" se refere às modificações de aminoácido que não afetam ou alteram significativamente as características de ligação do anticorpo contendo a seqüência de aminoácido. Tais modificações conservadoras incluem substituições de aminoácido, adições e deleções. Modificações podem ser introduzidas em um anticorpo da invenção por técnicas padrão conhecidas na arte, tais como, mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR. As substituições conservadoras de aminoácido são aquelas onde o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido possuindo uma cadeia lateral semelhante. Famílias de resíduos de aminoácido possuindo cadeias laterais semelhantes foram definidos na arte. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais

ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais apolares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais ramificadas beta (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim, um ou mais resíduos de aminoácido dentro das regiões CDR de um anticorpo da invenção podem ser substituídos com outros resíduos de aminoácido da mesma família da cadeia lateral e o anticorpo alterado pode ser testado quanto à função mantida (isto é, as funções estabelecidas em c) a l) acima) usando os ensaios funcionais descritos aqui.

Anticorpos que se Ligam ao Mesmo Epítopo que os Anticorpos Anti-PD-1 da Invenção

Em outra modalidade, a invenção provê anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo no PD-1 humano como anticorpos monoclonais de PD-1 da invenção (isto é, os anticorpos possuem a capacidade de competição cruzada para ligação ao PD-1 com qualquer um dos anticorpos monoclonais da invenção). Nas modalidades preferidas, o anticorpo de referência para estudos de competição cruzada pode ser o anticorpo monoclonal 17D8 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 1 e 8, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 2D3 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 2 e 9, respectivamente) ou

o anticorpo monoclonal 4H1 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 3 e 10, respectivamente), ou o anticorpo monoclonal 5C4 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 4 e 11, respectivamente) ou o anticorpo monoclonal 4A11 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 5 e 12, e o anticorpo monoclonal 7D3 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 6 e 13, ou o anticorpo monoclonal 5F4 (possuindo seqüências V_H e V_L conforme mostradas nas SEQ ID NOs: 7 e 14, respectivamente). Tais anticorpos de competição cruzada podem ser identificados com base em sua capacidade de competição cruzada com 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4 no ensaio de ligação de PD-1. Por exemplo, análise Biacore, ensaios ELISA ou citometria de fluxo podem ser usados para demonstrar competição cruzada com os anticorpos da presente invenção. A capacidade de um anticorpo de teste de inibir a ligação por exemplo, de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4, ao PD-1 humano demonstra que o anticorpo de teste pode competir com 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4 para ligação ao PD-1 humano e assim se liga ao mesmo epítipo no PD-1 humano como 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, ou 4A11. Em uma modalidade preferida, o anticorpo que se liga ao mesmo epítipo no PD-1 humano como 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4 é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos monoclonais humanos podem ser preparados e isolados nos Exemplos.

Anticorpos Construídos e Modificados

Um anticorpo da invenção pode ser preparado usado

um anticorpo possuindo uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_L reveladas aqui como material de partida para construir um anticorpo modificado, o anticorpo modificado podendo ter propriedades alteradas do anticorpo de partida. Um anticorpo
5 pode ser construído por modificação de um ou mais resíduos dentro de uma ou ambas regiões variáveis (isto é, V_H e/ou V_L), por exemplo, dentro de uma ou mais regiões CDR e/ou dentro de uma ou mais regiões de estrutura. Adicional ou alternativamente, um anticorpo pode ser construído por
10 modificação dos resíduos dentro da(s) região(ões) constante(s), por exemplo, para alterar a(s) função(ções) efetora(s) do anticorpo.

Um tipo de construção de região variável que pode ser realizada é a de enxerto de CDR. Os anticorpos interagem
15 com os antígenos alvo predominantemente através dos resíduos de aminoácido que estão localizados na sexta região de determinação de complementariedade de cadeia pesada e leve (CDR). Por essa razão, as seqüências de aminoácido dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais que
20 as seqüências fora das CDRs. Uma vez que as seqüências de CDR são sensíveis para a maioria das interações de anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que mimetizam as propriedades dos anticorpos específicos que ocorrem naturalmente por construção de
25 vetores de expressão que incluem seqüências de CDR do anticorpo específico ocorrendo naturalmente, enxertado nas seqüências de estrutura de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (vide, por exemplo, Riechmann, L. e

outros (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. e outros (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. e outros (1989) *Proc. Natl. Acad.* Vide *U.S.A.* 86:10029-10033; Patente US número 5.225.539 de Winter, e Patentes US números 5.530.101; 5 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen e outros)

Conseqüentemente, outra modalidade da invenção se refere a um anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo as seqüências CDR1, 10 CDR2 e CDR3 consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, e SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, respectivamente, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as 15 seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, e SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56, respectivamente. Assim, tais anticorpos contêm as seqüências 20 CDR de V_H e V_L dos anticorpos monoclonais 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4 ainda podendo conter seqüências de estrutura diferente desses anticorpos.

Tais seqüências de estrutura podem ser obtidas de bases de dados de DNA públicas ou referências publicadas que 25 incluem seqüências gênicas de anticorpo de linhagem germinal. Por exemplo, seqüências de DNA de linhagem germinal para genes de região variável de cadeia pesada e leve podem ser encontradas na base de dados de seqüência de

linhagem germinal humana "VBase" (disponível na Internet no site www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ybase), bem como em Kabat, E. A. e outros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., e outros (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; e Cox, J. P. L. e outros (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; o conteúdo dos mesmos são expressamente incorporados aqui como referência. Como outro exemplo, as seqüências de DNA de linhagem germinal para genes de região variável de cadeia pesada e leve humana podem ser encontradas na base de dados GenBank. Por exemplo, as seqüências de linhagem germinal de cadeia pesada que se segue encontradas no camundongo HCo7 HuMAb estão disponíveis nos números de acesso ao GenBank anexos 1-69 (NG_0010109, NT_024637 e BC070333), 3-33 (NG_0010109 and NT_024637) e 3-7 (NG_0010109 e NT_024637). Como outro exemplo, as seqüências de linhagem germinal de cadeia pesada encontradas no camundongo HCo 12 HuMAb estão disponíveis nos números de acesso ao GenBank anexos 1-69 (NG_0010109, NT_024637 e BC070333), 5-51 (NG_0010109 e NT_024637), 4-34 (NG_0010109 e NT_024637), 3-30.3 (AJ556644) e 3-23 (AJ406678).

Seqüências de estrutura preferidas para uso nos anticorpos da invenção são aquelas que são estruturalmente semelhantes às seqüências de estrutura usadas por anticorpos

selecionados da invenção, por exemplo, semelhantes às seqüências de estrutura V_H 3-33 (SEQ ID NO:71) e/ou as seqüências de estrutura V_H 4-39 (SEQ ID NO:73) e/ou as seqüências de estrutura V_K L6 (SEQ ID NO:72) e/ou as

5 seqüências de estrutura V_K L15 (SEQ ID NO:74) usadas pelos anticorpos monoclonais preferidos. As seqüências de CDR1, CDR2 e CDR3 de V_H, e as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3 de V_K, podem ser enxertadas nas regiões de estrutura que possuem a seqüência idêntica àquela encontrada no gene de

10 imunoglobulina de linhagem germinal da qual a seqüência de estrutura deriva, ou as seqüências CDR podem ser enxertadas nas regiões de estrutura que contêm uma ou mais mutações quando comparadas às seqüências da linhagem germinal. Por exemplo, foi verificado que em determinados momentos, é

15 benéfico mutar os resíduos dentro das regiões de estrutura para manter ou melhorar a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo (vide, por exemplo, Patentes US números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen e outros).

20 Outro tipo de modificação de região variável é mutar os resíduos de aminoácido dentro das regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de V_H e/ou V_K para dessa forma aperfeiçoar uma ou mais das propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo de interesse. A mutagênese

25 direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR pode ser realizada para introduzir a(s) mutação(ões) e o efeito na ligação do anticorpo ou outra propriedade funcional de interesse pode ser avaliada em ensaios *in vitro* ou *in vivo*,

conforme descrito aqui e fornecido nos Exemplos. Preferivelmente são introduzidas modificações conservadoras (conforme revelado acima). As mutações podem ser substituições de aminoácido, adições ou deleções, porém são
5 preferivelmente substituições. Além disso, tipicamente não mais de um, dois, três, quatro ou cinco resíduos dentro de uma região CDR são alterados.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção provê anticorpos monoclonais anti-PD-1 isolados ou porções
10 de ligação aos antígenos dos mesmos, compreendendo uma região variável de cadeia pesada compreendendo: a) uma região CDR1 de V_H compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 ou uma sequência de aminoácido possuindo
15 uma, duas, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido, deleções ou adições quando comparado às SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21; b) uma região CDR2 de V_H compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e
20 28 ou uma sequência de aminoácido possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido, deleções ou adições quando comparado às SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28; c) uma região CDR3 de V_H compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas
25 SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, ou uma sequência de aminoácido possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido, deleções ou adições quando comparado às SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35; d) uma

região CDR1 de V_K compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 ou uma sequência de aminoácido possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido, deleções ou adições quando comparado às SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42; e) uma região CDR2 de V_K compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, ou uma sequência de aminoácido possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido, deleções ou adições quando comparado às SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49; e f) uma região CDR3 de V_K compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo na SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56, ou uma sequência de aminoácido possuindo uma, duas, três, quatro ou cinco substituições de aminoácido, deleções ou adições quando comparado às SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56.

Os anticorpos construídos da invenção incluem aqueles nos quais as modificações foram realizadas com relação aos resíduos da estrutura dentro de V_H e/ou V_K , por exemplo, para aperfeiçoar as propriedades do anticorpo. Tipicamente, tais modificações da estrutura são realizadas para diminuir a imunogenicidade do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem é "retro-mutar" um ou mais resíduos da estrutura para a sequência de linhagem germinal correspondente. Mais especificamente, um anticorpo que sofreu mutação somática pode conter resíduos de estrutura que diferem da sequência de linhagem de germinação da qual o

anticorpo é derivado. Tais resíduos podem ser identificados por comparação das seqüências de estrutura de anticorpo com as seqüências da linhagem de germinação a partir das quais o anticorpo é derivado.

5 Por exemplo, a Tabela 1 a seguir mostra vários alterações de aminoácido nas regiões dos anticorpos anti-PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 que diferem da seqüência de linhagem germinal de origem da cadeia pesada. Para retornar um ou mais dos resíduos de aminoácido nas
10 seqüências de região de estrutura para sua configuração de linhagem germinal, as mutações somáticas podem ser "retro-mutadas" para a seqüência de linhagem germinal, por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR.

15 Podem ocorrer alterações no aminoácido nas regiões de estrutura dos anticorpos anti-PD-1 que diferem da seqüência de linhagem germinal de origem de cadeia leve. Por exemplo, para 17D8, o resíduo de aminoácido número 47 (dentro de FR2) de V_K é uma isoleucina, considerando-se que
20 o resíduo na seqüência de linhagem germinal V_K L6 correspondente é uma leucina. Para retornar as seqüências da região de estrutura para sua configuração de linhagem germinal, as mutações somáticas podem ser "retro-mutadas" para a seqüência de linhagem germinal, por exemplo, por
25 mutagênese direcionada ao sítio ou mutagênese mediada por PCR (por exemplo, resíduo número 47 (resíduo número 13 de FR2) da V_K de 17D8 pode ser "retro-mutado" da isoleucina em leucina).

Como outro exemplo, para 4A11, o resíduo de aminoácido número 20 (dentro de FR1) de V_K é uma serina, considerando-se que esse resíduo na seqüência de linhagem germinal V_K L15 correspondente é uma treonina. Para retornar as seqüências de região de estrutura à sua configuração de

5 linhagem germinal, por exemplo, o resíduo número 20 de V_K de 4A11 pode ser "retro-mutado" de serina em treonina. Tais anticorpos "retro-mutados" são também englobados pela invenção.

10 O alinhamento das regiões V_H para 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 7D3, contra a seqüência V_H 3-33 da linhagem germinal de origem é mostrado na figura 8. O alinhamento das regiões V_H para 4A11 e 5F4 contra a linhagem germinal de origem V_H 4-39 é mostrado na figura 11.

15 Tabela 1. Modificações da configuração da linhagem germinal da cadeia pesada nos anticorpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4.

Anti-PD-1 Ab	Posição do Aminoácido	Anticorpo do Aminoácido	Aminoácido original da configuração da linhagem germinal
17D8	10	D	G
	16	G	R
	27	V	F
	28	A	T
	78	M	T
	93	M	V
2D3	10	D	G

	27	L	F
	30	T	S
	85	N	S
	98	T	R
4H1	3	Y	Q
	84	T	N
	88	V	A
	98	S	R
5C4	21	D	S
	23	K	A
	27	I	F
	80	F	Y
	98	T	R
4A11	29	L	I
	79	Q	H
	98	V	A
7D3	23	T	A
	24	T	A
	27	I	F
	70	L	I
	74	D	N
	97	V	A
	98	T	R
5F4	23	S	T
	29	L	I
	51	A	G
	77	R	K

Outro tipo de modificação da estrutura envolve mutação de um ou mais resíduos dentro da região de estrutura ou mesmo dentro de uma ou mais regiões de CDR, para remover epítomos da célula T para dessa forma reduzir a imunogenicidade em potencial do anticorpo. Essa abordagem é também referida como "desimunização" e é descrita em mais detalhes na Publicação de Patente US número 20030153043 de Carr e outros.

Além ou alternativamente as modificações realizadas dentro da estrutura ou das regiões de CDR, os anticorpos da invenção podem ser construídos para incluir modificações dentro da região Fc, tipicamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tais como, meia vida do soro, fixação do complemento, ligação do receptor Fc e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno. Adicionalmente, um anticorpo da invenção pode ser quimicamente modificado (por exemplo, uma ou mais frações químicas podem ser anexadas ao anticorpo) ou ser modificado para alterar sua glicosilação, novamente para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo. Cada uma dessas modalidades é descrita em detalhes a seguir. A numeração dos resíduos na região Fc é aquela do índice EU de Kabat.

Em uma modalidade, a região de articulação de H1 é modificada, tal que, o número de resíduos de cisteína na região de articulação é alterado, por exemplo, aumentado ou diminuído. Essa abordagem é descrita adicionalmente na Patente US número 5.677.425 de Bodmer e outros. O número de resíduos de cisteína na região de articulação de CH1 é

alterado, por exemplo, para facilitar a montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo.

Em outra modalidade, a região de articulação Fc de um anticorpo é mutada para diminuir a meia vida biológica do anticorpo. Mais especificamente, uma ou mais mutações de aminoácido são introduzidas na região de interface do domínio CH2-CH3 do fragmento de articulação de Fc, tal que o anticorpo possua ligação de proteína A de *staphylococcus* emparelhada (Spa) em relação à ligação de SpA de domínio de articulação Fc nativa. Essa abordagem é descrita em detalhes adicionais na Patente US número 6.165.745 de Ward e outros.

Em outra modalidade, o anticorpo é modificado para aumentar sua meia vida biológica. Várias abordagens são possíveis. Por exemplo, uma ou mais das mutações que se seguem podem ser introduzidas: T252L, T254S, T256F, conforme descrito na Patente US número 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar a meia vida biológica, o anticorpo pode ser alterado dentro da região CH1 ou CL para conter o epítipo de ligação de receptor de recuperação tomado de duas alças de um domínio CH2 de uma região Fc de uma IgG, conforme descrito nas Patentes US números 5.869.046 e 6.121.022 de Presta e outros.

Ainda em outras modalidades, a região Fc é alterada por substituição pelo menos em um resíduo de aminoácido com um resíduo de aminoácido diferente para alterar a(s) função(ões) efetora(s) do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de

aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente, tal que, o anticorpo tenha uma afinidade alterada para um ligante efetor, porém mantenha a capacidade de ligação do antígeno do anticorpo de origem. O ligante efetor do qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente C1 do complemento. Essa abordagem é descrita em detalhes adicionais nas Patentes US números 5.624.821 e 5.648.260, ambas de Winter e outros.

Em outro exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de aminoácido 329, 331 e 322 podem ser substituídos com um resíduo de aminoácido diferente, tal que, o anticorpo tenha ligação C1q alterada e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CD) reduzida ou abolida. Essa abordagem é descrita em detalhes na Patente US número 6.194.551 de Idusogie e outros.

Em outro exemplo, um ou mais resíduos de aminoácido dentro das posições de aminoácido 231 e 239 são alterados para dessa forma alterar a capacidade do anticorpo de fixar o complemento. Essa abordagem é descrita adicionalmente na Publicação PCT WO 94/29351 de Bodmer e outros.

Ainda em outro exemplo, a região Fc é modificada para aumentar a capacidade do anticorpo de medir citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo para um receptor Fcγ por modificação de um ou mais aminoácidos nas seguintes posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265,

267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439. Essa abordagem é descrita na Publicação PCT WO 00/42072 de Presta. Além disso, os sítios de ligação na IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcRn foram mapeados e variantes com ligação aperfeiçoada foram descritas (vide Shields, R.L. e outros (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Mutações específicas nas posições 256, 290, 298, 333, 334 e 339 mostraram aperfeiçoar a ligação ao FcγRIII. Adicionalmente, os mutantes de combinação que se seguem mostraram aperfeiçoar a ligação de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e S298A/E333A/K334A.

Ainda em outra modalidade, a glicosilação de um anticorpo é modificada. Por exemplo, um anticorpo aglicosilado pode ser fabricado (por exemplo, o anticorpo não possui glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo com relação ao antígeno. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, alterando-se um ou mais sítios de glicosilação dentro da sequência do anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas, as quais resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de estrutura da região variável para dessa forma eliminar a glicosilação naquele sítio. Tal aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo com

relação ao antígeno. Tal abordagem é descrita em mais detalhes nas Patentes US números 5.714.350 e 6.350.861 de Co e outros.

Adicional ou alternativamente, pode ser fabricado
5 um anticorpo que possua um tipo alterado de glicosilação, tal como, anticorpo hipofucosilado, possuindo quantidades reduzidas de resíduos de fucosila ou um anticorpo possuindo estruturas GlcNac de biseção aumentada. Tal padrão de glicosilação alterado demonstrou aumentar a capacidade de
10 ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. As células com maquinaria de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem se usadas como células
15 hospedeiras, nas quais se expressam os anticorpos recombinantes da invenção para dessa forma produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Por exemplo, as linhagens de célula Ms704, Ms705 e Ms709 não possuem o gene de fucosiltransferase, FUT8 (alfa(1,6)fucosiltransferase),
20 tal que os anticorpos expressos nas linhagens de células Ms704, Ms705 e Ms709 não possuem fucose em seus carboidratos. As linhagens de células Ms705, Ms705 e Ms709 FUT8 foram criadas pela interrupção alvejada do gene FUT8 nas células CHO/DG44 usando dois vetores de substituição
25 (vide Publicação de Patente US número 20040110704 de Yamane e outros e Yamane-Ohnuki e outros (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como outro exemplo, a EP 1.176.195 de Hanai e outros descreve uma linhagem celular com um gene FUT8

funcionalmente interrompido, que codifica uma fucosil transferase, tal que, os anticorpos expressos em tal linhagem de célula exibem hipofucosilação por redução ou eliminação da enzima relacionada à ligação alfa 1,6. Hanai e
5 outros também descrevem linhagens de células que possuem uma atividade de enzima baixa para adição de fucose à N-acetilglicosamina que se liga à região Fc do anticorpo ou não possui a atividade de enzima, por exemplo, na linhagem de célula de mieloma YB2/0 (ATCC CRL 1662). A Publicação PCT
10 WO 03/035835 de Presta descreve uma linhagem de célula CHO variante, células Lec13, com capacidade reduzida de atacar fucose em relação aos carboidratos ligados Asn(297), também resultando na hipofucosilação dos anticorpos expressos naquela célula hospedeira (vide Shields, R.L. e outros
15 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). A Publicação PCT WO 99/54342 de Umana e outros descrevem linhagens de células construídas para expressar glicosil transferases modificando a glicoproteína (por exemplo, beta(1,4)-N-acetilglicosaminiltransferase III (GnTIII)), tal que, os
20 anticorpos expressos nas linhagens de células construídas aumentaram as estruturas GlcNac de bisecção o que resulta em atividade ADCC aumentada dos anticorpos (vide também Umana e outros (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternativamente, os resíduos de fucose do anticorpo podem ser clivados usando
25 uma enzima fucosidase. Por exemplo, a fucosidase alfa-L-fucosidase remove os resíduos de fucosila dos anticorpos (Tarentino, A.L. e outros (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Outra modificação dos anticorpos aqui que é

contemplada pela invenção é a pegilação. Um anticorpo pode ser pegilado, por exemplo, para aumentar a meia vida biológica (por exemplo, soro) do anticorpo. Para pegilar um anticorpo, o anticorpo ou fragmento do mesmo é tipicamente
5 regido com polietileno glicol (PEG), tal como um éster reativo ou derivado aldeído de PEG, sob condições nas quais um ou mais grupos PEG se tornam anexados ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. Preferivelmente, a pegilação é realizada através de uma reação de acilação ou uma reação de
10 alquilação com uma molécula PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Conforme usado aqui, o termo "polietileno glicol" se destina a englobar quaisquer das formas de PEG que tenham sido usadas para derivatizar outras enzimas, tais como, mono alcóxi (C1-10) ou arilóxi-
15 polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. Em determinadas modalidades, o anticorpo a ser pegilado é um anticorpo aglicosilado. Os métodos para pegilação das proteínas são conhecidos na arte e podem ser aplicados aos anticorpos da invenção. Vide, por exemplo, a EP 0.154.316 de
20 Nishimura e outros e a EP 0.401.384 de Ishikawa e outros.

Métodos de Construção dos Anticorpos

Conforme discutido acima, os anticorpos anti-PD-1 possuindo as seqüências V_H e V_K reveladas aqui podem ser usados para criar novos anticorpos anti-PD-1 por modificação
25 das seqüências V_H e/ou V_K ou da(s) região(ões) constante(s) anexada(s) aos mesmos. Assim, em outro aspecto da invenção, os aspectos estruturais de um anticorpo anti-PD-1 da invenção, por exemplo, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4

são usados para criar anticorpos anti-PD-1 estruturalmente correlatos que mantêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como, ligação ao PD-1 humano. Por exemplo, uma ou mais regiões CDR de 17D8, 2D3, 5 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4 ou mutações das mesmas podem ser combinadas recombinantemente com regiões de estrutura conhecida e/ou outras CDRs para criar anticorpos anti-PD-1, construídos recombinantemente, adicionais da invenção, conforme discutido acima. Outros tipos de modificações 10 incluem aquelas descritas na seção anterior. O material de partida para o método de construção é uma ou mais das seqüências V_H e/ou V_K providas aqui, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Para criar o anticorpo construído, não é necessário preparar realmente (isto é, expressar como uma 15 proteína) um anticorpo possuindo uma ou mais das seqüências V_H e/o V_K providas aqui, ou uma ou mais regiões CDR das mesmas. Ao invés disso, as informações contidas na(s) seqüências(s) são usadas como o material de partida para criar seqüência(s) de "segunda geração" derivadas da(s) 20 seqüência(s) original(is) e então a(s) seqüência(s) de "segunda geração" são preparadas e expressas como uma proteína.

Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção provê um método para preparar um anticorpo anti-PD-1 25 compreendendo:

a) provisão de: i) uma seqüência de anticorpo de uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência CDR1 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID

NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21, uma sequência CDR2 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28, e/ou uma sequência CDR3 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35; e/ou ii) uma sequência de anticorpo de uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, uma sequência CDR2 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49, e/ou uma sequência CDR3 selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

b) alteração de pelo menos um resíduo de aminoácido dentro da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e/ou da sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve para criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e

c) expressão da sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

Técnicas de biologia molecular padrão podem ser usadas para preparar e expressar a sequência de anticorpo alterada.

Preferivelmente, o anticorpo codificado pela(s) sequência(s) de anticorpo alterada(s) é um que mantenha uma, alguma ou todas as propriedades funcionais dos anticorpos anti-PD-1 descritos aqui, as propriedades funcionais incluindo, porém não limitadas a:

a) o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos;

b) o anticorpo não se liga substancialmente a CD28, CTLA-4 ou ICOS humana;

c) o anticorpo aumenta a proliferação da célula T em um ensaio de Reação de Linfócito Misto (MLR);

5 d) o anticorpo aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio de MLR;

e) o anticorpo aumenta a secreção de IL-2 em um ensaio de MRL;

10 f) o anticorpo se liga ao PD-1 humano e PD-1 de macaco *Cynomolgus*;

g) o anticorpo inibe a ligação de PD-L1 e/ou PD-L2 ao PD-1;

h) o anticorpo estimula respostas de memória específicas de antígeno;

15 i) o anticorpo estimula respostas de anticorpo;

j) o anticorpo inibe o crescimento da célula tumoral *in vivo*.

As propriedades funcionais dos anticorpos alterados podem ser avaliadas usando ensaios padrão
20 disponíveis na arte e/ou descritos aqui, tais como aqueles estabelecidos nos Exemplos (por exemplo, citometria de fluxo, ensaios de ligação).

Em determinadas modalidades dos métodos de construção de anticorpos da invenção, mutações podem ser
25 introduzidas aleatória ou seletivamente ao longo de toda ou de uma parte de uma sequência de codificação de anticorpo anti-PD-1 e os anticorpos anti-PD-1 modificados resultantes podem ser classificados por atividade de libação e/ou outras

propriedades funcionais conforme descrito aqui. Os métodos mutacionais foram descritos na técnica. Por exemplo, a Publicação PCT WO 02/092780 de Short descreve métodos para criar e classificar mutações de anticorpo usando mutagênese de saturação, conjunto de ligação sintético ou uma combinação dos mesmos. Alternativamente, a Publicação PCT WO 03/074679 de Lazar e outros descreve métodos de uso de processos de classificação por computador para otimizar as propriedades dos anticorpos.

10 Moléculas de Ácido Nucléico Codificando Anticorpos
 da Invenção

 Outro aspecto da invenção se refere às moléculas de ácido nucléico que codificam os anticorpos da invenção. Os ácidos nucléicos podem estar presentes nas células integrais, em um lisado de célula ou em uma forma substancialmente pura ou parcialmente purificada. Um ácido nucléico é "isolado" ou "se torna substancialmente puro" quando purificado sem outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucléicos celulares ou proteínas, por técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, ligação CsCl, cromatografia de coluna, eletroforese de gel de agarose e outras bem conhecidas na arte. Vide, F. Ausubel, e outros ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Um ácido nucléico da invenção pode ser, por exemplo, DNA ou RNA e pode ou não conter seqüências intrônicas. Em uma modalidade preferida, o ácido nucléico é uma molécula de DNAc.

Ácidos nucleicos da invenção podem ser obtidos usando técnicas de biologia molecular padrão. Para anticorpos expressos por hibridomas (por exemplo, hibridomas preparados de camundongos transgênicos portando genes da
5 imunoglobulina humana conforme descrito adicionalmente a seguir), DNAs codificando as cadeias: leve e pesada do anticorpo feito pelo hibridoma podem ser obtidos por ampliação de PCR padrão ou técnicas de clonagem de DNA. Para anticorpos obtidos de uma biblioteca gênica de
10 imunoglobulina (por exemplo, usando técnicas de mostra de fago), o ácido nucleico codificando o anticorpo pode ser recuperado da biblioteca.

Moléculas de ácidos nucleicos preferidas da invenção são aquelas codificando as seqüências V_H e V_L dos
15 anticorpos monoclonais 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4. Seqüências de DNA codificando as seqüências V_H de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 60, 61, 62 e 63, respectivamente. Seqüências de DNA codificando as seqüências V_L de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4,
20 4A11, 7D3 e 5F4 são mostradas nas SEQ ID NOs: 64, 65, 66, 67, 68, 69 e 70, respectivamente.

Uma vez que os fragmentos de DNA codificando os segmentos V_H e V_L são obtidos, esses fragmentos de DNA podem ser manipulados por técnicas de DNA recombinante padrão, por
25 exemplo, para converter os genes da região variável nos genes de cadeia de anticorpo de comprimento pleno, nos genes de fragmento Fab ou em um gene scFv. Nessas manipulações, um fragmento de DNA codificando V_L ou V_H é operativamente

ligado a outro fragmento de DNA codificando outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. O termo "operativamente ligado" conforme usado nesse contexto significa que os dois fragmentos de DNA são
5 unidos, tal que, as seqüências de aminoácido codificadas pelos dois fragmentos de DNA permanecem na estrutura.

O DNA isolado codificando a região VH pode ser convertido em um gene de cadeia pesada de comprimento pleno por ligação operativa do DNA codificando VH a outra molécula
10 de DNA codificando regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As seqüências dos genes da região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na arte (vide, por exemplo, Kabat, E. A., e outros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Department of
15 Health and Human Services, NTH Publicação número 91-3242) e os fragmentos de DNA englobando essas regiões podem ser obtidos por ampliação de PCR padrão. A região constante de cadeia pesada pode ser uma região constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM ou IgD, porém mais preferivelmente
20 é uma região constante IgG1 ou IgG4. Para um gene de cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA codificando VH pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA codificando apenas a região constante CH1 de cadeia pesada.

O DNA isolado codificando a região VL pode ser
25 convertido em um gene de cadeia leve de comprimento pleno (bem como um gene de cadeia leve Fab) por ligação operativa do DNA codificando VL a outra molécula de DNA codificando a região constante de cadeia leve, CL. As seqüências dos genes

da região de cadeia leve humana são conhecidas na arte (vide, por exemplo, Kabat, E. A., e outros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NTH Publicação
 5 número 91-3242) e fragmentos de DNA englobando essas regiões podem ser obtidos por ampliação de PCR padrão. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante κ ou λ , porém mais preferivelmente é uma região constante κ .

10 Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA codificando VH e VL são operativamente ligados a outro fragmento codificando um ligante flexível, por exemplo, codificando a sequência de aminoácido (Gly₄-Ser)₃, tal que as sequências VH e VL podem ser expressas como uma proteína
 15 de cadeia simples contínua, com as regiões VL e VH unidas pelo ligante flexível (vide, por exemplo, Bird e outros (1988) *Science* 242:423-426; Huston e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty e outros, (1990) *Nature* 348:552-554).

20 Produção de Anticorpos Monoclonais da Invenção

Anticorpos monoclonais (mAbs) da presente invenção podem ser produzidos por várias técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão
 25 de Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495. Embora os procedimentos de hibridização de célula somática sejam preferidos, em princípio, outras técnicas para produção de anticorpo monoclonal podem ser empregadas, por exemplo,

transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

O sistema animal preferido para preparação de hibridomas é o sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Os
5 protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão são bem conhecidos.

Anticorpos quiméricos ou humanizados da presente
10 invenção podem ser preparados com base na seqüência de um anticorpo monoclonal de murino preparado conforme descrito acima. O DNA codificando as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido do hibridoma de murino de interesse e construído para conter seqüências de imunoglobulina de não
15 murino (por exemplo, humanas) usando técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões de murino variáveis podem ser ligadas às regiões constantes humanas usando métodos conhecidos na arte (vide, por exemplo, Patente US número 4.816.567 de
20 Cabilly e outros). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões de CDR de murino podem ser inseridas na estrutura humana usando métodos conhecidos na arte (vide, por exemplo, Patente US número 5.225.539 de Winter e Patentes US números 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 e 6.180.370 de Queen e
25 outros).

Em uma modalidade preferida, os anticorpos da invenção são anticorpos monoclonais humanos. Tais anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra PD-1 podem ser gerados

usando partes de transporte de camundongos transgênicos ou transcromossômicos do sistema imune humano ao invés do sistema do camundongo. Esses camundongos transgênicos e transcromossômicos incluem camundongos referidos aqui como

5 camundongos HuMAb e KMTM, respectivamente e são coletivamente referidos aqui como "camundongos de Ig humana".

O camundongo HuMAb^(R) (Medarex, Inc.) contém posições gênicas de imunoglobulina humana que codificam seqüências de imunoglobulina de cadeia leve κ e pesada humana não rearranjadas (μ e γ), em conjunto com mutações alveajdas que inativam as posições da cadeia μ e κ endógenas (vide, por exemplo, Lonberg, e outros (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Conseqüentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de camundongo IgM ou κ e em resposta à

10 imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humanos introduzidos sofrem comutação de classe e mutação somática para gerar monoclonal IgG κ humana de alta afinidade (Lonberg, N. e outros (1994), supra; revisto em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101;

20 Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764:536-546). A preparação e uso de camundongos HuMAb e as modificações genômicas realizadas por tais camundongos, são adicionalmente descritas em Taylor, L. e outros (1992)

25 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. e outros (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi e outros (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. e outros

(1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon e outros (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. e outros (1994) *International Immunology* 6: 579-591; e Fishwild, D. e outros (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, o conteúdo dos
5 quais é incorporado especificamente como referência em sua totalidade. Vide, adicionalmente, as Patentes US números 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todas para Lonberg e Kay; Patente US número 5.545.807 de
10 Surani e outros; Publicações PCT números WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO 99/45962 todas para Lonberg e Kay; e Publicação PCT número WO 01/14424 de Korman e outros.

Em outra modalidade, os anticorpos humanos da
15 invenção podem ser elevados usando um camundongo que porta seqüências de imunoglobulina humana nos transgenes e transcromossomas, tal como um camundongo que porta um transgene de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humana. Tais camundongos, referidos aqui como
20 "KM mice™" são descritos em detalhes na Publicação PCT WO 02/43478 de Ishida e outros.

Adicionalmente, sistemas de animal transgênico alternativo expressando genes de imunoglobulina são disponíveis na técnica e podem ser usados para elevar
25 anticorpos anti-PD-1 da invenção. Por exemplo, um sistema transgênico alternativo referido como Xenomouse (Abgenix, Inc.) pode ser usado; tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes US números 5.939.598; 6.075.181;

6.114.598; 6.150.584 e 6.162.963 de Kucherlapati e outros.

Além disso, os genes de imunoglobulina humana expressando sistemas animais transcromossômicos alternativos estão disponíveis na técnica e podem ser usados para elevar anticorpos anti-PD-1 da invenção. Por exemplo, os camundongos portando ambos um transcromossoma de cadeia pesada humana e um transcromossoma de cadeia leve humana, referidos como "camundongos TC" podem ser empregados; tais camundongos são descritos em Tomizuka e outros (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Adicionalmente, as vacas que portam transcromossomas de cadeia pesada e leve humanas foram descritas na técnica (Kuroiwa e outros (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) e podem ser usadas para elevar anticorpos anti-PD-1 da invenção.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser também preparados usando métodos de mostra de fago para classificação de bibliotecas de genes de imunoglobulina humana. Tais métodos de mostra de fago para isolar anticorpos humanos são estabelecidos na técnica. Vide, por exemplo: Patentes US números 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 de Ladner e outros; Patentes US números 5.427.908 e 5.580.717 de Dower e outros; Patentes US números 5.969.108 e 6.172.197 de McCafferty e outros; e Patentes US números 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 de Griffiths e outros.

Anticorpos monoclonais humanos da invenção podem também ser preparados usando camundongos SCID dentro dos quais as células imunes humanas foram reconstituídas, tal

que, uma resposta de anticorpo humano pode ser gerada usando imunização. Tais camundongos são descritos, por exemplo, nas Patentes US números 5.476.996 e 5.698.767 de Wilson e outros

Imunização de Camundongos portando Ig Humana

5 Quando camundongos portando Ig humana são usados para elevar anticorpos humanos da invenção, tais camundongos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno PD-1 e/ou recombinante PD-1, ou uma proteína de fusão de PD-1, conforme descrito por Lonberg, N.
10 e outros (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. e outros (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; e Publicação PCT WO 98/24884 e WO 01/14424. Preferivelmente, os camundongos terão 6-16 semanas de idade na primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou recombinante (5-50
15 µg) de antígeno PD-1 pode ser usada para imunizar intraperitonealmente o camundongo portando Ig humana.

Procedimentos detalhados para gerar anticorpos monoclonais plenamente humanos para PD-1 são descritos no Exemplo 1 a seguir. O experimento cumulativo com vários
20 antígenos mostrou que os camundongos transgênicos respondem quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno no adjuvante de Freund completo, seguido por cada imunização com IP, semana sim, semana não (até um total de 6) com antígeno no adjuvante de Freund incompleto. Contudo,
25 os adjuvantes diferentes do de Freund são também eficazes. Além disso, foi verificado que as células integrais na ausência do adjuvante são altamente imunogênicas. A resposta imune pode ser monitorada no curso do protocolo de

imunização com amostras de plasma sendo obtidas por sangramentos retro-orbitais. O plasma pode ser classificado por ELISA (conforme descrito a seguir) e os camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina anti-PD-1 humana
 5 podem ser usados para fusões. Os camundongos podem receber reforço intravenoso com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Espera-se que 2-3 fusões para cada imunização possam ser necessárias. Entre 6 e 24 camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno. Geralmente
 10 ambas as cepas HCo7 e HCo12 são empregadas. Além disso, ambos o transgene HCo7 e HCo12 podem ser reproduzidos em conjunto em um camundongo simples possuindo dois transgenes de cadeia pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). Alternativa ou adicionalmente, a cepa KM mouse™ pode ser usada, conforme
 15 descrito no Exemplo 1.

Geração de Hibridomas Produzindo Anticorpos Monoclonais Humanos da Invenção

Para gerar hibridomas produzindo anticorpos monoclonais humanos da invenção, os esplenócitos e/ou
 20 células de nodo linfático dos camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos em uma linhagem de célula imortalizada apropriada, tal como uma linhagem de células de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser classificados para produção de anticorpos específicos de
 25 antígeno. Por exemplo, as suspensões de células simples de linfócitos esplênicos dos camundongos humanizados podem ser fundidas em um sexto o número de P3X63-Ag8.653 não secretando células de mieloma de camundongo (ATCC, CRL 1580)

com PEG a 50%. Alternativamente, as suspensões de células simples de linfócitos esplênicos dos camundongos imunizados podem ser fundidas usando um método de eletrofusão com base no campo elétrico empregando um eletroporador de fusão de célula de câmara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD). As células são colocadas em placas em aproximadamente 1×10^5 na placa de microtitulação de fundo plano, seguido por incubação de duas semanas em meio seletivo contendo Clone de Soro fetal a 20%, meios condicionados "653" a 18%, origina 5% (IGEN), 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina, 50 mg/mL de gentamicina e 1X HAT (Sigma; o HAT é adicionado 24 horas após a fusão). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio onde o HAT é substituído por HT. Os poços individuais podem então ser classificados por ELISA quanto a IgM monoclonal humano e anticorpos IgG. Uma vez que tenha ocorrido o crescimento extensivo do hibridoma, o meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. O anticorpo secretando hibridomas pode ser recolocado na placa, classificado novamente e se ainda for positivo para IgG humana, os anticorpos monoclonais podem ser subclonados pelo menos duas vezes por limitação da diluição. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo e meio de cultura de tecido para caracterização.

Para purificar os anticorpos monoclonais humanos,

hibridomas selecionados podem ser desenvolvidos em frascos giratórios de dois litros para purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia por afinidade com
5 proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluída pode ser verificada por eletroforese de gel e cromatografia de líquido de alto desempenho para garantir pureza. A solução tampão pode ser trocada em PBS, e a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ empregando
10 coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C.

Geração de Transfectomas Produzindo Anticorpos Monoclonais da Invenção

Os anticorpos da invenção podem também ser
15 produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção gênica como é bem conhecido na arte (por exemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por exemplo, para expressar os anticorpos ou
20 fragmentos de anticorpo dos mesmos, cadeias leve e pesada de comprimento pleno ou parcial codificando DNAs, podem ser obtidas por técnicas de biologia molecular padrão (por exemplo, ampliação de PCR ou clonagem de DNAc empregando um hibridoma que expressa o anticorpo de interesse) e os DNAs
25 podem ser inseridos nos vetores de expressão, tal que, os genes são ligados operativamente às seqüências de controle transcricionais e translacionais. Nesse contexto, o termo "operativamente ligado" significa que um gene de anticorpo

está ligado dentro de um vetor, tal que, as seqüências de controle transcricionais e translacionais dentro do vetor servem a sua função pretendida de regular a transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as

5 seqüências de controle de expressão são escolhidos como sendo compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos no vetor separados ou mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo

10 vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação dos sítios de restrição complementares no fragmento do gene de anticorpo e vetor, ou ligação de extremidade cega se não existirem sítios de restrição). As regiões variáveis de

15 cadeia leve e pesada dos anticorpos descritos aqui podem ser empregadas para criar genes de anticorpo de comprimento pleno de qualquer isótopo de anticorpo por inserção dos mesmos nos vetores de expressão já codificando regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve do isótopo

20 desejado, tal que, o segmento V_H seja ligado operativamente ao(s) segmento(s) C_H dentro do vetor e o segmento V_K seja ligado operativamente ao segmento C_L dentro do vetor. Adicional ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo de sinal que

25 facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor, tal que, o peptídeo de sinal é ligado na estrutura ao término amino do gene da cadeia de anticorpo. O peptídeo

de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína de não imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia do anticorpo, os vetores
5 de expressão recombinante da invenção portam seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes da cadeia de anticorpo em uma célula hospedeira. O termo "seqüência reguladora" se destina a incluir promotores, melhoradoras e outros elementos de controle de expressão (por exemplo,
10 sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou translação dos genes da cadeia de anticorpo. Tais seqüências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado pelos versados
15 na arte que o projeto do vetor de expressão, incluindo a seleção de seqüências reguladoras, pode depender de fatores, tais como, a escolha da célula hospedeira a ser transformado, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Seqüências reguladoras preferidas para expressão de
20 célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que dirigem altos níveis de expressão de proteína nas células de mamíferos, tais como, promotores e/ou melhoradores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Simiano 40 (SV40), adeonírus (por exemplo, promotor tardio maior de adenovírus
25 (AdMLP) e polioma. Alternativamente, seqüências reguladoras não virais podem ser usadas, tais como, promotor de ubiquitina ou promotor de β -globina. Ainda adicionalmente, os elementos reguladores compostos de seqüências de fontes

diferentes, tais como, o sistema promotor de SRA, que contém as seqüências do promotor precedente SV40 e a repetição do terminal longo do vírus do tipo 1 da leucemia de célula T (Takebe, Y. e outros (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

5 Além dos genes de cadeia de anticorpo e seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinante da invenção podem portar seqüências adicionais, tais como, seqüências que regulam a replicação do vetor nas células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes
10 marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção das células hospedeiras dentro das quais o vetor foi introduzido (vide, por exemplo, as Patentes US números 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas de Axel e outros). Por exemplo, tipicamente, o gene marcador
15 selecionável confere resistência aos medicamentos, tais como, G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira dentro da qual o vetor foi induzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene diidrofolato redutase (DHFR) (para uso nas células
20 hospedeiras dhfr- com seleção/ampliação de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

Para expressão das cadeias leve e pesada, o(s) vetor(es) de expressão codificando as cadeias leve e pesada é(são) transfectado(s) dentro de uma célula hospedeira por
25 técnicas padrão. As várias formas do termo "transfecção" se destinam a englobar uma variedade ampla de técnicas geralmente usadas para a introdução do DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo,

eletroporação, precipitação de cálcio-fosfato, transfecção de DEAE-dextrano e semelhantes. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção tanto nas células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas, a
5 expressão dos anticorpos nas células eucarióticas e mais preferivelmente nas células hospedeiras de mamíferos, é a mais preferida, em razão de tais células eucarióticas e especificamente as células de mamíferos serem mais prováveis que as células procarióticas de montarem e secretarem um
10 anticorpo apropriadamente dobrado e imunologicamente ativo. A expressão procariótica dos genes de anticorpo foi reportada como sendo ineficaz para produção de altos rendimentos do anticorpo ativo (Boss, M. A. e Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

15 As células hospedeiras de mamífero preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) (incluindo células dhfr-CHO, descritas em Urlaub e Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 77:4216-4220, usadas com o marcador
20 selecionável de DHFr, por exemplo, conforme descrito em R. J. Kaufman e P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Especificamente, para uso com NOS reveladas no WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338.841. Quando os vetores de expressão
25 recombinante codificando genes de anticorpo são introduzidos nas células hospedeiras de mamíferos, os anticorpos são produzidos por cultivo das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir expressão do

anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura onde as células hospedeiras se desenvolvem. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação
5 de proteína padrão.

Caracterização do Anticorpo de Ligação ao Antígeno

Os anticorpos da invenção podem ser testados para ligação ao PD-1, por exemplo, o ELISA padrão. Em resumo, as placas de microtitulação são revestidas com PD-1 purificado
10 em 0,25 µg/mL em PBS e então bloqueadas com albumina de soro bovino a 5% em PBS. As diluições do anticorpo (por exemplo, diluições de plasma de camundongo imunizado com PD-1) são adicionadas a cada poço e incubadas por 1-2 horas a 37°C. As placas são lavadas com PBS/Tween e então incubadas com
15 reagente secundário (por exemplo, para anticorpos humanos, um reagente policlonal específico Fc de IgG anti-humano de cabra) conjugado à fosfatase alcalina por 1 hora a 37°C. Após a lavagem, as placas são reveladas com substrato de pNPP (1 mg/mL) e analisadas quanto a OD de 405-650.
20 Preferivelmente, os camundongos que desenvolvem as titulações mais altas serão usados para fusões.

Um ensaio ELISA conforme descrito acima pode também ser usados para classificar os hibridomas que mostram reatividade positiva com imunogênio PD-1. Os
25 hibridomas que se ligam com alta avidéz ao PD-1 são subclonados e adicionalmente caracterizados. Um clone para cada hibridoma, que mantenha a reatividade das células de origem (por ELISA), pode ser escolhido para fabricação de um

banco de 5-10 ampolas de células armazenadas a -140°C e para purificação do anticorpo.

Para purificar os anticorpos anti-PD-1, hibridomas selecionados podem ser desenvolvidos em frascos giratórios de dois litros para purificação de anticorpo monoclonal. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia por afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluída pode ser verificada por eletroforese de gel e cromatografia de líquido de alto desempenho para garantir pureza. A solução tampão pode ser trocada em PBS, e a concentração pode ser determinada por OD_{280} empregando coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a -80°C .

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-PD-1 selecionados se ligam aos epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado usando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, IL). Os estudos de competição usando anticorpos monoclonais não marcados e anticorpos monoclonais biotinilados podem ser realizados usando placas ELISA revestidas com PD-1, conforme descrito acima. A ligação de mAB biotinilado pode ser detectada com uma sonda de estreptavidina-alcalina fosfatase.

Para determinar o isótopo de anticorpos purificados, o isótopo ELISAs pode ser realizado usando reagentes específicos para anticorpos de um isótopo específico. Por exemplo, para determinar o isótopo de um

anticorpo monoclonal humano, os poços de placas microtituladoras podem ser revestidos com 1 µg/mL de imunoglobulina anti-humana por toda a noite a 4°C. Após bloqueio com BSA a 1%, as placas foram revestidas com 1
5 µg/mL ou menos de anticorpos monoclonais de teste ou controles de isótopo purificados, a temperatura ambiente por uma a duas horas. Os poços podem ser reagidos com IgG1 humana ou sondas conjugadas de fosfatase alcalina específica para IgM humana. As placas são reveladas e analisadas
10 conforme descrito acima. IgGs anti-PD-1 humanas podem ser adicionalmente testadas quanto a reatividade com antígeno PD-1 por Western blotting. Em resumo, PD-1 pode ser preparado e submetido a eletroforese de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio. Após a
15 eletroforese, os antígenos separados são transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro fetal de bezerro a 10% e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação da IgG humana pode ser detectada usando fosfatase alcalina de IgG anti-humana e revelada com
20 tabletes de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Imunoconjugados

Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza aspectos de um anticorpo anti-PD-1, ou um fragmento do
25 mesmo, conjugado a uma fração terapêutica, tal como, citotoxinas, um medicamento (por exemplo, imunossupressivo) ou uma radiotoxina. Tais conjugados são referidos como "imunoconjugados". Os imunoconjugados que incluem uma ou

mais citotoxinas são referidos como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial às células (por exemplo, exterminador). Exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorubicina, antracina diona diidróxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidroestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaina, propanolol e puromicina e análogos ou homólogos da mesma. Agentes terapêuticos incluem também, por exemplo, antimetabólicos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluoruracil decarbazina) agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucila, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitocina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina).

Outros exemplos preferidos de citotoxinas terapêuticas que podem ser conjugadas a um anticorpo da invenção incluem duocarmicinas, caliceamicinas, maitansinas e auristatinas e derivados das mesmas. Um exemplo de conjugado de anticorpo da caliceamicina encontra-se comercialmente disponível (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

As citoxinas podem se conjugadas aos anticorpos da invenção usando tecnologia de ligante disponível na arte. Exemplos de tipos de ligante que foram usados para conjugar uma citotoxina em um anticorpo incluem, porém não estão
5 limitados a hidrazonas, tioéteres, ésteres, dissulfetos e ligantes contendo peptídeo. Um ligante pode ser escolhido de modo que seja suscetível, por exemplo, à clivagem por pH baixo dentro do compartimento lisossômico ou suscetível à clivagem por proteases, tais como, proteases preferivelmente
10 expressas no tecido tumoral, tais como, catepsinas (por exemplo, catepsinas B, C, D).

Para uma discussão adicional dos tipos de citotoxinas, ligantes e métodos para conjugar agentes terapêuticos aos antibióticos, vide também, Saito, G. e
15 outros (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P. A. e outros (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R.J. (2002) *Curr Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D.
20 e Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados em relação a um isótopo radioativo para gerar radiofarmacêuticos citotóxicos, também referidos como radioimunoconjugados. Exemplos de isótopos radioativos que
25 podem ser conjugados em relação aos anticorpos para uso em diagnóstico ou terapêuticamente incluem, porém não são limitados ao iodo¹³¹, índio¹¹¹, ítrio⁹⁰ e lutétio¹⁷⁷. Os métodos para preparação dos radioimunoconjugados são

estabelecidos na técnica. Exemplos de radioimunoconjugados são comercialmente disponíveis incluem Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals) e métodos semelhantes podem ser usados para preparar
5 radioimunoconjugados usando os anticorpos da invenção.

Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica e a fração de medicamento não deve ser tida como limitada aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a fração de
10 medicamento pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa ou fragmento ativo da mesma, tal como, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas ou toxina da difteria; uma
15 proteína, tal como, fator de necrose de tumor ou interferon- γ ; ou modificadores de resposta biológica, tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator de estimulação de colônia de macrófago granulócito ("GM-CSF"), fator de
20 estimulação de colônia de granulócito ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

As técnicas para conjugação de tal fração terapêutica em relação aos anticorpos são bem conhecidas, vide, por exemplo, Arnon e outros, "Monoclonal Antibodies
25 For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld e outros (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom e outros, "Antibodies For Drug Delivery", em Controlled Drug

Delivery (2^a Ed.), Robinson e outros (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, 5 Pinchera e outros (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin e outros (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe e 10 outros, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Moléculas Biespecíficas

Em outro aspecto, a presente invenção caracteriza moléculas biespecíficas compreendendo um anticorpo anti-PD- 15 1, ou um fragmento do mesmo da invenção. Um anticorpo da invenção ou porções de ligação de antígeno do mesmo pode ser derivatizado ou ligado a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, outro anticorpo ou ligante para um receptor) para gerar uma 20 molécula biespecífica que se liga a pelo menos dois sítios de ligação diferentes ou moléculas alvo. O anticorpo da invenção pode, de fato, ser derivatizado ou ligado a mais de uma molécula funcional para gerar moléculas multiespecíficas que se ligam a mais de dois sítios de ligação diferentes 25 e/ou moléculas alvo; tais moléculas multiespecíficas se destinam também a serem englobadas pelo termo "molécula biespecífica" conforme usado aqui. Para criar uma molécula biespecífica da invenção, um anticorpo da invenção pode ser

funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outra forma) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como, outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou ligação
5 mimética, tal que isso resulte em uma molécula biespecífica.

Conseqüentemente, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação a PD-1 e uma segunda especificidade de ligação a um segundo epítipo alvo. Em uma
10 segunda modalidade específica da invenção, o segundo epítipo alvo é um receptor Fc, por exemplo, FcγRI (CD64) ou um receptor humano Fcα (CD89). Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas capazes de ligação a ambos FcγR ou FcαR expressando células efetoras (por exemplo, monócitos,
15 macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) e às células alvo expressando PD-1. Essas moléculas biespecíficas alvejam células expressando PD-1 para célula efetora e desencadeiam atividades de célula efetora mediada por receptor Fc, tais como, fagocitose de uma célula expressando
20 PD-1, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocina ou geração de ânion superóxido.

Em uma modalidade da invenção onde a molécula biespecífica é multiespecífica, a molécula pode incluir,
25 adicionalmente, uma terceira especificidade de ligação, além da especificidade de ligação anti-Fc e uma especificidade de ligação anti-PD-1. Em uma modalidade, a terceira especificidade de ligação é uma porção de fator anti-

melhoramento (EF), por exemplo, uma molécula que se liga a uma proteína de superfície envolvida na atividade citotóxica e dessa forma aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A "posição do fator anti-melhoramento" pode ser um anticorpo, fragmento de anticorpo funcional ou um ligante que se liga a uma dada molécula, por exemplo, um antígeno ou um receptor e dessa forma resulta em uma melhora do efeito dos determinantes de ligação para o receptor F_c ou antígeno de célula alvo. A "porção do fator anti-melhoramento" pode se ligar a um receptor F_c ou um antígeno de célula alvo. Alternativamente, a porção do fator de anti-melhoramento pode se ligar a uma entidade que é diferente d entidade a qual a primeira e segunda especificidades se ligam. Por exemplo, a porção do fator anti-melhoramento pode se ligar a uma célula T citotóxica (por exemplo, através de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulta em uma resposta imune aumentada contra a célula alvo).

Em uma modalidade, as moléculas biespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação, pelo menos um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, incluindo, por exemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv ou um Fv de cadeia simples. O anticorpo pode também ser um dímero de cadeia leve ou pesada ou fragmento mínimo do mesmo, tal como, Fv ou uma construção de cadeia simples, conforme descrito em Ladner e outros, Patente US número 4.946.778, o conteúdo da mesma sendo incorporada aqui expressamente como referência.

Em uma modalidade, a especificidade de ligação para um receptor Fc γ é provida por um anticorpo monoclonal, a ligação do qual não é bloqueada por imunoglobulina humana G (IgG). Conforme usado aqui, o termo "receptor de IgG" se refere qualquer um dos oito genes da cadeia γ localizados no cromossoma 1. Esses genes codificam um total de doze transmembranas ou isoformas de receptor solúveis que são agrupadas em três classes de receptor Fc γ : Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) e Fc γ RIII(CD16). Em uma modalidade preferida, o receptor Fc γ é um Fc γ RI de alta afinidade humano. O Fc γ RI humano é uma molécula de 72 kDa que mostra alta afinidade com relação à IgG monomérica ($10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$).

A produção e caracterização de determinados anticorpos monoclonais anti-Fc γ preferidos são descritas por Fanger e outros na Publicação PCT WO 88/00052 e na Patente US número 4.954.617, os ensinamentos da mesma sendo incorporados aqui como referência. Esses anticorpos se ligam a um epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII em um local que é distinto do sítio de ligação Fc γ do receptor e assim, essa ligação não é substancialmente bloqueada pelos níveis fisiológicos de IgG. Anticorpos anti-Fc γ RI específicos úteis nessa invenção são mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. O hibridoma que produz mAb 32 está disponível na American Type Culture Collection, Acesso ATCC número HB9469. Em outras modalidades, o anticorpo receptor anti-Fc γ é uma forma humanizada do anticorpo monoclonal 22 (H22). A produção e caracterização do anticorpo H22 são descritas em Graziano, R.F. e outros (1995; *J. Immunol* 155 (10): 4996-

5002 e Publicação PCT 94/10332. O anticorpo H22 produzindo linhagem celular foi depositado no American Type Culture Collection sob a denominação HA022CL1 e possui o número de acesso CRL 11177.

5 Ainda em outras modalidades preferidas, a especificidade de ligação para um receptor Fc é provida por um anticorpo que se liga a um receptor de IgA humano, por exemplo, um receptor de Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), a ligação do qual preferivelmente não é bloqueada por imunoglobulina
10 humana A (IgA). O termo "receptor de IgA" se destina a incluir o produto gênico de um α -gene (Fc α RI) localizado no cromossoma 19. Esse gene é conhecido por codificar várias isoformas de transmembrana alternativamente recompostas de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) é constitutivamente expresso nos
15 monócitos/macrófagos, granulócitos eosinófilos e neutrófilos, porém não nas populações de células não efectoras. Fc α RI possui afinidade com o meio ($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$) para ambos IgA1 e IgA2, que é aumentada por exposição às citocinas, tais como, G-CSF ou GM-CSF (Morton, H.C. e
20 outros, (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Quatro anticorpos monoclonais específicos de Fc α RI, identificados como A₃, A59, A62 e A77 que ligam Fc α RI fora do domínio de ligação do ligante IgA foram descritos (Monteiro, R.C. e outros, (1992), *J. Immunol.* 148:1764).

25 Fc α RI e Fc γ RI são receptores desencadeadores preferidos para uso nas moléculas biespecíficas da invenção porque eles são (1) expressos primariamente nas células efectoras imunes, por exemplo, monócitos, PMNs, macrófagos e

células dendríticas; (2) expressos em altos níveis (por exemplo, 5.000 a 100.000 por célula); (3) mediadores de atividades citotóxicas (por exemplo, ADCC, fagocitose); (4) mediam apresentação de antígeno melhorado dos antígenos, incluindo antígenos propriamente, alvejados para os mesmos.

Embora os anticorpos monoclonais humanos sejam preferidos, outros anticorpos que podem ser empregados nas moléculas biespecíficas da invenção são anticorpos monoclonais de murino, quiméricos e humanizados.

As moléculas biespecíficas da presente invenção podem ser preparadas por conjugação das especificidades de ligação de constituinte, por exemplo, as especificidades de ligação anti-FcR e anti-PD-1, usando os métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada especificidade de ligação de molécula biespecífica pode ser gerada separadamente e então conjugada uma com a outra. Quando as especificidades de ligação são proteína ou peptídeos, vários agentes de acoplamento ou de ligação cruzada podem ser usados para conjugação covalente. Exemplos de agentes de ligação cruzada incluem proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) e 4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidila (sulfo-SMCC) (vide, por exemplo, Karpovsky e outros (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA e outros (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Outros métodos incluem aqueles descritos em Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan e

outros (1985) *Science* 229:81-83), e Glennie e outros (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). Agentes de conjugação preferidos são SATA e sulfo-SMCC, ambos disponíveis na Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

5 Quando as especificidades de ligação são anticorpos, elas podem ser conjugadas através de ligação sulfidrila das regiões de articulação de término C das duas cadeias pesadas. Em uma modalidade especificamente preferida, a região de articulação é modificada para conter
10 um número ímpar de resíduos sulfidrila, preferivelmente um, antes da conjugação.

 Alternativamente, ambas especificidades de ligação podem ser codificadas no mesmo vetor e expressas e montadas na mesma célula hospedeira. Esse método é especificamente
15 útil quando a molécula biespecífica é uma mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ ou ligante x proteína de fusão Fab. Uma molécula biespecífica da invenção pode ser uma molécula de cadeia simples compreendendo um anticorpo de cadeia simples e um determinante de ligação, ou uma molécula biespecífica
20 de cadeia simples compreendendo dois determinantes de ligação. Moléculas biespecíficas podem compreender pelo menos duas moléculas de cadeia simples. Métodos para preparar moléculas biespecíficas são descritos, por exemplo, na Patente US número 5.260.203; Patente US número 5.455.030;
25 Patente US número 4.881.175; Patente US número 5.132.405; Patente US número 5.091.513; Patente US número 5.476.786; Patente US número 5.013.653; Patente US número 5.258.498; e Patente US número 5.482.858.

A ligação das moléculas biespecíficas aos seus alvos específicos pode ser conformada, por exemplo, por ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), análise FACS, bioensaio (por exemplo, inibição de crescimento) ou ensaio Western Blot. Cada um desses ensaios geralmente detecta a presença de complexos de proteína-anticorpo de interesse específico por emprego de um reagente marcado (por exemplo, um anticorpo) específico para o complexo de interesse. Por exemplo, os complexos de FcR-anticorpo podem ser detectados usando por exemplo, um anticorpo ligado a enzima ou fragmento de anticorpo que reconhece e se liga especificamente aos complexos de anticorpo-FcR. Alternativamente, os complexos podem ser detectados usando qualquer de uma variedade de outros imunoensaios. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado radioativamente e usado em um radioimunoensaio (RIA) (vide, por exemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, março de 1986, que é incorporado aqui como referência). O isótopo radioativo pode ser detectado por meios, tais como, o uso de um contador γ ou um contador de cintilação ou por autoradiografia.

Composições Farmacêuticas

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais, ou porção(ões) de ligação ao antígeno da mesma, da presente

invenção, formulada em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. Tais composições podem incluir um ou uma combinação de anticorpos (por exemplo, dois ou mais diferentes) ou imunoconjugados ou moléculas
5 biespecíficas da invenção. Por exemplo, uma composição farmacêutica da invenção pode compreender uma combinação de anticorpos (ou imunoconjugados ou biespecíficos) que se ligam aos diferentes epítomos no antígeno alvo ou que possuem atividades complementares.

10 As composições farmacêuticas da invenção podem também ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinada com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um anticorpo anti-DP-1 da presente invenção combinado com pelo menos um outro agente
15 antiinflamatório ou imunossupressor. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser usados na terapia de combinação são descritos em maiores detalhes a seguir na seção de usos dos anticorpos da invenção.

Conforme usado aqui, "veículo farmacêuticamente
20 aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifungo, agentes isotônicos e de retardo de absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o veículo é apropriado para administração
25 intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, anticorpo, imunoconjugado ou molécula biespecífica pode

ser revestido em um material para proteger o anticorpo da ação dos ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

Os compostos farmacêuticos da invenção podem
5 incluir um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis. Um "sal farmaceuticamente aceitável" se refere ao sal que mantém a atividade biológica desejada do composto de origem e não fornece qualquer efeito toxicológico indesejado (vide, por exemplo, Berge, S.M. e outros (1977) *J. Pharm. Sci.*
10 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como, clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodrídico, fósforo e semelhantes, bem como de
15 ácidos orgânicos não tóxicos, tais como, ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos, ácidos alcanóicos substituídos com fenila, ácidos alcanóicos hidróxi, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e semelhantes. Sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino
20 terrosos, tais como, sódio, potássio, magnésio, cálcio e semelhantes, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como, N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodimina, procaína e semelhantes.

25 Uma composição farmacêutica da invenção pode também incluir um antioxidante farmaceuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: 1) antioxidantes solúveis em água, tais como, ácido

ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; 2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como, palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propil, alfa-tocoferol e semelhantes; e 3) agentes quelantes de metal, tais como, ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes.

Exemplos de veículos aquosos e não aquosos apropriados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como, glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e semelhantes) e misturas dos mesmos, óleos vegetais, tais como, óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis, tais como, oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, por uso de materiais de revestimento, tais como, lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula desejado no caso de dispersões, e por uso de agentes tensoativos.

Essas composições podem conter também adjuvantes, tais como, preservantes, agentes umectantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microorganismos pode ser garantida por ambos os procedimentos de esterilização acima e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifungos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico e semelhantes. Pode ser também desejável incluir agentes isotônicos, tais como, açúcares, cloreto de sódio e semelhante nas

composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser obtida por inclusão de agentes que possam retardar a absorção, tais como, monoestearato de alumínio e gelatina.

5 Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões de pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou disperso. O uso de tais meios e agentes para as substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na arte. Exceto, à
10 medida que qualquer meio convencional ou agente seja compatível com o composto ativo, o uso do mesmo nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado. Compostos ativos suplementares podem ser também incorporados às composições.

15 Os compostos terapêuticos tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada apropriada para concentração alta de medicamento. O veículo
20 pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e semelhantes) e misturas apropriadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, por uso de um revestimento, tal
25 como, lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso da dispersão e por emprego de agentes tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais

como, manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida por inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

5 Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por microfiltração por esterilização. De modo geral, as
10 dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contenha um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso dos pós estéreis para preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de
15 preparação são secagem a vácuo e liofilização que rendem um pó de ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução filtrada estéril anterior dos mesmos.

 A quantidade de ingrediente ativo que pode ser
20 combinada com um material veículo pra produzir uma forma de dosagem simples variará, dependendo do indivíduo sendo tratado e do modo específico de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem simples
25 geralmente será aquela quantidade de composição que produz um efeito terapêutico. De modo geral, fora dos 100%, essa quantidade variará de cerca de 0,01% a cerca de 99% do ingrediente ativo, preferivelmente de cerca de 0,1% a cerca

de 70%, mais preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 30% do ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Os regimes de dosagem são ajustados para prover
5 resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo simples pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação
10 terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. A forma de dosagem unitária aqui se refere às unidades fisicamente separadas apropriadas como dosagens unitárias para os indivíduos a
15 serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. A especificação para as formas de dosagem unitárias da invenção é ditada por e depende
20 diretamente de a) características únicas do composto ativo e efeito terapêutico específico a ser obtido, e b) as limitações inerentes na técnica de compostagem de tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

25 Para administração do anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg, e mais geralmente de 0,01 a 5 mg/kg d peso do corpo do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corpóreo, 1 mg/kg de

peso corpóreo, 3 mg/kg de peso corpóreo, 5 mg/kg de peso corpóreo ou 10 mg/kg de peso corpóreo ou dentro da faixa de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar emprega administração uma vez por semana, uma vez a cada duas
5 semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez ao mês, uma vez a cada três meses ou uma vez a cada três a seis meses. Regimes de dosagem preferidos para um anticorpo anti-PD-1 da invenção incluem 1 mg/kg de peso corpóreo ou 3 mg/kg de peso corpóreo através de
10 administração intravenosa, com o anticorpo sendo fornecido usando uma das seguintes programações de dosagem: i) a cada quatro semanas para seis dosagens, então a cada três meses, ii) a cada três semanas; iii) 3 mg/kg de peso corpóreo uma vez seguido por 1 mg/kg de peso corpóreo a cada três
15 semanas.

Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes são administrados simultaneamente, em cada caso, a dosagem de cada anticorpo administrado cai pra as faixas indicadas. O
20 anticorpo é geralmente administrado em múltiplas ocasiões. Os intervalos entre dosagens simples podem ser, por exemplo, semanalmente, mensalmente, a cada três meses ou anualmente. Os intervalos podem também ser irregulares conforme indicado pela medição dos níveis sanguíneos do anticorpo no antígeno
25 alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para obter uma concentração de anticorpo no plasma de cerca de 1-1.000 µg/mL e em alguns métodos, cerca de 25-300 µg/mL.

Alternativamente, o anticorpo pode ser

administrado como uma formulação de liberação prolongada, na qual administração menos freqüente é necessária. A dosagem e freqüência variarão dependendo da meia vida útil do anticorpo no paciente. Em geral, anticorpos humanos mostram
5 a meia vida útil mais longa, seguido por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e freqüência de administração podem variar, dependendo se o tratamento for profilático ou terapêutico. Nas aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa
10 é administrada em intervalos relativamente não freqüentes por um período de tempo longo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento por toda vida. Nas aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos de tempo relativamente curtos é algumas vezes necessária,
15 até a progressão da doença ser reduzida ou terminada, e preferivelmente até o paciente mostrar melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Após isso, o paciente pode receber um regime profilático.

Níveis de dosagem real dos ingredientes ativos nas
20 composições farmacêuticas da presente invenção podem variar de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente específico, composição e modo de administração, sem ser tóxico ao paciente. O nível de dosagem selecionado
25 dependerá de vários fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições específicas da presente invenção empregadas, do éster, sal ou amida das mesmas, da via de administração, do tempo de administração, da razão de

excreção do composto específico sendo empregado, a duração do tratamento, outros medicamentos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições específicas empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e
5 histórico médico anterior do paciente sendo tratado e fatores semelhantes bem conhecidos nas artes médicas.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" de um anticorpo anti-PD-1 da invenção resulta preferivelmente em uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença, um
10 aumento na frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença ou a prevenção de debilitação ou incapacidade devido à aflição da doença. Por exemplo, para o tratamento de tumores, uma "dosagem terapeuticamente eficaz" preferivelmente inibe o crescimento celular ou crescimento
15 tumoral em pelo menos 20%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 40%, mesmo mais preferivelmente em pelo menos cerca de 60% e ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 80% em relação aos indivíduos não tratados. A capacidade de um composto de inibir o crescimento do tumor
20 pode ser avaliada em um sistema de modelo animal previsível da eficácia em tumores humanos. Alternativamente, essa propriedade de uma composição pode ser avaliada por exame da capacidade do composto de inibir, tal inibição *in vitro* por ensaios conhecidos de um versado na técnica. A quantidade
25 terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor ou de outra forma melhorar os sintomas em um indivíduo. Um versado na técnica comum será capaz de determinar tais quantidades com base em fatores,

tais como, tamanho do indivíduo, gravidade dos sintomas do indivíduo e composição específica ou via de administração selecionada.

Em outro aspecto, a presente revelação provê um
5 kit farmacêutico de partes compreendendo um anticorpo anti-PD-1 e um anticorpo anti-CTLA-4 conforme descrito aqui. O kit pode também compreender, adicionalmente, instruções para uso no tratamento de uma doença hiperproliferativa (tal como, câncer, conforme descrito aqui). Em outra modalidade,
10 os anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 pode ser embalados na forma de dosagem unitária.

Em determinadas modalidades, dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes (por exemplo, anti-PD-1 e anti-CTLA-4) são
15 administrados simultaneamente, onde a dosagem de cada anticorpo administrado se encontra dentro das faixas indicadas. O anticorpo pode ser administrado como uma dose simples ou mais comumente pode ser administrado em ocasiões múltiplas. Os intervalos entre formas de dosagem simples
20 podem ser, por exemplo, semanal, mensal, a cada três meses ou anualmente. Os intervalos podem ser também irregulares conforme indicado pela medição dos níveis sanguíneos do anticorpo para o antígeno alvo no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para obter uma concentração de
25 anticorpo no plasma de cerca de 1-1.000 µg/mL e em alguns métodos de cerca de 25-300 µg/mL.

A composição da presente invenção pode se administrada através de uma ou mais vias de administração

usando um ou mais dos vários métodos conhecidos na arte. Conforme será apreciado pelos versados na arte, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados. Vias preferidas de administração para anticorpos da invenção incluem vias de administração intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outras vias parenterais de administração, por exemplo, por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral" conforme usada aqui significa modos de administração diferentes da administração entérica e tópica, geralmente por injeção e inclui, sem limitação, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaraquinóide, intra-espinhal, epidural e injeção intraesterna e infusão.

Alternativamente, um anticorpo da invenção pode ser administrado através de uma via não parenteral, tal como, tópica, epidérmica ou via de administração pelas mucosas, por exemplo, intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou topicamente.

Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra liberação rápida, tais como, formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos e sistemas de liberação microencapsulados. Os polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como, acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno,

poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos dos versados na técnica. Vide, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade preferida, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica, tal como os dispositivos revelados nas Patentes US números 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes bem conhecidos e módulos úteis na presente invenção incluem: Patente US número 4.487.603, que revela uma bomba de microinfusão implantável para dispensa de medicamento em uma razão controlada; Patente US número 4.486.194, que revela um dispositivo terapêutico para administração de medicamentos através da pele; Patente US número 4.447.233, que revela uma bomba de infusão de medicamento para distribuição de medicamento em uma razão de infusão precisa; Patente US número 4.447.224 que revela um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para distribuição contínua de medicamento; Patente US número 4.439.196, que revela um sistema de liberação de medicamento osmótico possuindo múltiplos compartimentos de câmara; e Patente US número 4.475.196, que revela um sistema de liberação osmótica de medicamento. Essas patentes são incorporadas aqui como referência. Muitos outros tais

implantes, sistemas de liberação e módulos são conhecidos dos versados na técnica.

Em determinadas modalidades, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para garantir distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira hematopoiética (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrófilos. Para garantir que os compostos terapêuticos da invenção atravessem a BBB (caso desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabricação dos lipossomas vide, por exemplo, as Patentes US números 4.522.811; 5.374.548 e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais frações que sejam seletivamente transportadas para células ou órgãos específicos, assim melhorando a liberação alvejada do medicamento (vide, por exemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Frações alvo exemplares incluem flutuação de biotina (vide, por exemplo, Patente US número 5.416.016 de Low e outros); manosídeos (Umezawa e outros, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticorpos (P.G. Bloeman e outros (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais e outros (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A de agente tensoativo (Briscoe e outros (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier e outros (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); vide também K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; JJ. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos e Métodos da Invenção

Os anticorpos, composições de anticorpo e métodos

da presente invenção possuem várias utilidades *in vitro* e *in vivo* envolvendo, por exemplo, detecção de PD-1 ou melhoramento da resposta imune por bloqueio de PD-1. Em uma concretização preferida, os anticorpos da presente invenção
5 são anticorpos humanos. Por exemplo, essas moléculas podem ser administradas às células na cultura, *in vitro* ou *ex vivo* ou aos indivíduos humanos, por exemplo, *in vivo*, para melhorar a imunidade em várias situações. Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção provê um método para modificar uma
10 resposta imune em um indivíduo compreendendo administração ao indivíduo do anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, da invenção, tal que, a resposta imune no indivíduo seja modificada. Preferivelmente, a resposta imune é melhorada, estimulada ou supra-regulada.

15 Conforme usado aqui, o termo "indivíduo" se destina a incluir ser humano e animais não humanos. Animais não humanos incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como, primatas não humanos, carneiros, cães, gatos, vacas, cavalos, galinhas, anfíbios e
20 répteis, embora os mamíferos sejam preferidos, tais como, não primatas, carneiros, cães, gatos, vacas e cavalos. Indivíduos preferidos incluem pacientes humanos que precisam de melhoramento de uma resposta imune. Os métodos são especificamente apropriados para tratamento de pacientes
25 humanos possuindo um transtorno que podem ser tratados por aumento da resposta imune mediada por célula T. Em uma modalidade preferida, os métodos são especificamente apropriados para tratamento de células cancerígenas *in vivo*.

Para obter a melhora específica de antígeno da imunidade, os anticorpos anti-PD-1 podem ser administrados em conjunto com um antígeno de interesse. Quando os anticorpos para PD-1 são administrados em conjunto com outro agente, os dois podem
5 ser administrados tanto em ordem quanto simultaneamente.

A invenção provê, adicionalmente, métodos para detecção da presença de antígeno PD-1 humano em uma amostra ou medição da quantidade de antígeno PD-1, compreendendo contato d amostra e uma amostra de controle, com um
10 anticorpo monoclonal humano ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo, que especificamente se liga ao PD-1 humano, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou porção do mesmo e PD-1 humano. A formação de um complexo é então detectada, onde uma formação
15 complexa diferente entre a amostra em comparação à amostra de controle é indicativa da presença do antígeno PD-1 humano na amostra.

Dado à ligação específica dos anticorpos da invenção ao PD-1, em comparação a CD28, ICOS e CTLA-4, os
20 anticorpos da invenção podem ser usados para detectar especificamente a expressão de PD-1 na superfície das células e, além disso, pode ser usado pra purificar PD-1 através da purificação de imunoafinidade.

Câncer

25 O bloqueio de PD-1 por anticorpos pode melhorar a resposta imune às células cancerígenas no paciente. O ligante para PD-1, PD-L1 não é expresso nas células humanas normais, porém é abundante em uma variedade de cânceres

humanos (Dong e outros (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). A interação entre PD-1 e PD-L1 resulta em um aumento na infiltração de linfócitos, uma diminuição na proliferação mediada por receptor de célula T, e evasão imune por células cancerígenas (Dong e outros (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank e outros (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi e outros (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). A supressão imune pode ser revertida por inibição da interação local de PD-1 para PD-L1 e o efeito é aditivo quando a interação de PD-1 a PD-L2 é bloqueada (Iwai e outros (2002) *PNAS* 99: 12293-7; Brown e outros (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66). Embora estudos anteriores tenham mostrado que a proliferação de células T pode ser restaurada por inibição da interação de PD-1 para PD-L1, não existem relatos de um efeito direto no crescimento do tumor cancerígeno *in vivo* por bloqueio da interação de PD-1/PD-L1. Em um aspecto, a presente invenção se refere ao tratamento de um indivíduo *in vivo* empregando um anticorpo anti-PD-1 tal que, o crescimento dos tumores cancerígenos é inibido. Um anticorpo anti-PD-1 pode ser usado sozinho para inibir o crescimento dos tumores cancerígenos. Alternativamente, um anticorpo anti-PD-1 pode ser empregado em conjunto com outros agentes imunogênicos, tratamentos ou outros anticorpos, conforme descrito a seguir.

Conseqüentemente, em uma modalidade, a invenção provê um método para inibir o crescimento das células tumorais em um indivíduo, compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um

anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo anti-PD-1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos humanos anti-PD-1 humano descritos aqui). Adicional ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo anti-PD-1 quimérico ou humanizado.

Cânceres preferidos cujo crescimento pode ser inibido usando anticorpos da invenção incluem cânceres tipicamente sensíveis à imunoterapia. Exemplos não limitantes de cânceres preferidos para tratamento incluem melanoma (por exemplo, melanoma maligno metastático), câncer renal (por exemplo, carcinoma de célula límpida), câncer de próstata (por exemplo, adenocarcinoma de próstata refratário hormonal), câncer de mama, câncer de cólon e câncer de pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de célula não pequena). Adicionalmente, a invenção inclui malignidades refratárias ou recorrentes, cujo crescimento pode ser inibido usando os anticorpos da invenção.

Exemplos de outros cânceres que podem ser tratados usando os métodos da invenção incluem câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intra-ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer dos testículos, câncer uterino, carcinoma das trompas falopianas, carcinoma do endométrio, carcinoma do cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema

endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma do tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, leucemias crônica ou aguda incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia
 5 mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, câncer da bexiga, câncer dos rins ou uretra, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (CNS), linfoma primário do CNS, angiogênese do
 10 tumor, tumor do eixo da espinha, glioma do tronco encefálico, adenoma da pituitária, sarcoma de Kaposi, câncer epidermóide, câncer da célula escamosa, linfoma da célula T, cânceres induzidos ambientalmente incluindo aqueles induzidos por asbestos e combinações dos cânceres. A
 15 presente invenção também é útil para o tratamento de cânceres metastáticos, especialmente cânceres metastáticos que expressam PD-L1 (Iwai e outros (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

Opcionalmente, os anticorpos para PD-L1 podem ser
 20 combinadas com um agente imunogênico, tal como, células cancerígenas, antígenos de tumor purificados (incluindo proteínas recombinantes, peptídeos, e moléculas de carboidratos), células e células transfectadas com genes codificando estimulação imune das citocinas (He e outros
 25 (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Exemplos não limitantes de vacinas tumorais que podem ser usadas incluem peptídeos de antígenos de melanoma, tais como, peptídeos de gp100, antígenos de MAGE, Trp-2, MART1 e/ou tirosinase ou células

tumorais transfectadas para expressar a citocina GM-CSF (discutida em mais detalhes a seguir).

Nos seres humanos, alguns tumores mostraram ser imunogênicos, tais como, melanomas. Foi antecipado que, por
5 elevação do limite de ativação da célula T por bloqueio de PD-1, nós podemos esperar a ativação das respostas de tumor no hospedeiro.

O bloqueio de PD-1 é provavelmente mais eficaz quando combinado com um protocolo de vacinação. Muitas
10 estratégias experimentais para vacinação contra tumores foram previstas (vide, Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428;
15 Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; vide também Restifo, N. e Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 em DeVita, V. e outros (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Quinta Edição). Em uma dessas estratégias, uma vacina é prepara usando células
20 tumorais autólogas ou alogênicas. Essas vacinas celulares mostraram ser mais eficazes quando as células tumorais são transduzidas para expressar GM-CSF. GM-CSF mostrou ser um ativador potente da apresentação de antígeno pra vacinação de tumor (Dranoff e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).
25

O estudo da expressão gênica e padrão de expressão gênica em ampla escala nos vários tumores levou à definição dos assim denominados antígenos específicos de tumor

(Resenberg, SA (1999) *Immunity* 10:281-7). Em muitos casos, esses antígenos específicos de tumor são antígenos de diferenciação expressos nos tumores e na célula da qual o tumor surge, por exemplo, antígenos de melanócito gp100, antígenos de MAGE e Trp-2. De modo mais importante, muitos desses antígenos podem ser mostrados como sendo os alvos das células T específicas para tumor. O bloqueio de PD-1 pode ser usado em conjunto com uma coleção de proteínas recombinantes e/ou peptídeos expressos em um tumor, a fim de gerar uma resposta imune para essas proteínas. Essas proteínas são normalmente vistas pelo sistema imune como antígenos próprios e são, portanto, tolerantes aos mesmos. O antígeno tumoral pode também incluir a proteína telomerase, que é necessária para a síntese de telômeros de cromossomas e que é expressa e mais de 85% dos cânceres humanos e em apenas um número limitado de tecidos somáticos (Kim N. e outros, (1994) *Science* 266:2011-2013). (Esses tecidos somáticos podem ser protegidos do ataque imune por vários meios). O antígeno tumoral pode também constituir "neo-antígenos" expressos nas células cancerígenas em razão das mutações somáticas que alteram a sequência da proteína ou criam proteínas de fusão entre duas sequências não correlatas (isto é, bcr-abl no cromossoma Philadelphia) ou idiotype dos tumores de célula B.

Outras vacinas de tumor podem incluir as proteínas de vírus implicadas nos cânceres humanos tais como, Papiloma Vírus Humano (HPV), Vírus da Hepatite (HBV e HCV) e Herpes Vírus Sarcoma de Kaposi (KHSV). Outra forma de antígeno

específico de tumor que pode ser usada em conjunto com bloqueio de PD-1 são as proteínas de choque térmico purificadas (HSP) isoladas do tecido tumoral propriamente. Essas proteínas de choque térmico contêm fragmentos de
5 proteínas das células tumorais e essas HSPs são altamente eficientes na liberação às células apresentando antígeno para promoção de imunidade de tumor (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura, Y. e outros (1997) *Science* 278: 117-120).

10 Células dendríticas (DC) são células apresentando antígeno potentes que podem ser usadas para iniciar respostas específicas de antígeno. As DCs podem ser produzidas *ex vivo* e carregadas com vários antígenos de proteína e peptídeo, bem como extratos de célula tumoral
15 (Nestle, F. e outros (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). As DCs podem também ser transduzidas por meios genéticos para expressar esses antígenos tumorais. As DCs foram também diretamente fundidas às células tumorais com o fim de imunização (Kugler, A. e outros (2000) *Nature Medicine*
20 6:332-336). Como um método de vacinação, a imunização com DC pode se eficazmente combinada com bloqueio de PD-1 para ativar respostas anti-tumor mais potentes.

O bloqueio de PD-1 pode também ser combinado com tratamentos padrão para o câncer. O bloqueio de PD-1 pode
25 ser eficazmente combinado com regimes quimioterapêuticos. Nesses casos, pode ser possível reduzir a dose do reagente quimioterapêutico administrado (Mokyr, M. e outros, (1998) *Cancer Research* 58:5301-5304). Um exemplo de tal combinação

é um anticorpo anti-PD-1 em combinação com decarbazina para o tratamento do melanoma. Outro exemplo de tal combinação é um anticorpo anti-PD-1 em combinação com interleucina-2 (IL-2) para o tratamento de melanoma. A racionalização
5 especifica por trás do uso combinado de bloqueio de PD-1 e quimioterapia é que a morte da célula, que é uma consequência da ação citotóxica da maioria dos compostos quimioterapêuticos, resultaria em níveis aumentados de antígeno tumoral na via de apresentação do antígeno. Outras
10 terapias de combinação que podem resultar em sinergia com o bloqueio de PD-1 através da morte celular são radiação, cirurgia e ausência hormonal. Cada um desses protocolos cria uma fonte de antígeno tumoral no hospedeiro. Os inibidores de angiogênese podem também ser combinados com bloqueio de
15 PD-1. A inibição da angiogênese leva à morte da célula tumoral que pode alimentar o antígeno tumoral nas vias de apresentação do antígeno hospedeiro.

Os anticorpos de bloqueio de PD-1 podem também ser usados em combinação com anticorpos biespecíficos que
20 alvejam as células efetoras expressando receptor Fc-alfa ou Fc-gama para células tumorais (vide, por exemplo, Patentes US números 5.922.845 e 5.837.243). Anticorpos biespecíficos podem ser usados para alvejar dois antígenos separados. Por exemplo, anticorpos biespecíficos de receptor anti-
25 Fc/antígeno antitumoral (por exemplo, Her-2/neu), foram usados para alvejar macrófagos para sítios de tumor. Esse alvejamento pode ativar mais eficazmente as respostas específicas de tumor. A ramificação da célula T dessas

respostas poderia ser aumentada por emprego do bloqueio de PD-1. Alternativamente, o antígeno pode ser liberado diretamente para as DCs por emprego de anticorpos biespecíficos que se ligam ao antígeno tumoral e um marcador
5 de superfície de célula específico de célula dendrítica.

Os tumores escapam da fiscalização imune do hospedeiro por uma variedade de mecanismos. Muitos desses mecanismos podem ser superados pela inativação das proteínas que são expressas pelos tumores e que são imunossupressivas.
10 Essas incluem, entre outras, TGF-beta (Kehrl, J. e outros (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), e ligante Fas (Hahne, M. e outros (1996) *Science* 274: 1363- 1365). Os anticorpos para cada uma dessas entidades podem ser
15 empregados em combinação com anti-PD-1 para combater os efeitos do agente imunossupressivo e favorecer respostas imunes do tumor geradas pelo hospedeiro.

Outros anticorpos que podem ser usados para ativar a resposta imune do hospedeiro podem ser empregados em
20 combinação com anti-PD-1. Esses incluem moléculas na superfície das células dendríticas que ativam a função DC e apresentação do antígeno. Anticorpos anti-CD40 podem ser substituídos eficazmente por atividade da célula T auxiliar (Ridge, J. e outros (1998) *Nature* 393: 474-478) e podem ser
25 usados em conjunto com anticorpos PD-1 (Ito, N. e outros (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Ativação dos anticorpos para moléculas co-estimuladoras de célula T, tais como CTLA-4A (por exemplo, Patente US número 5.811.097), OX-

40 (Weinberg, A. e outros (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-
 IBB (Melero, I e outros (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685
 (1997), e ICOS (Hutloff, A. e outros (1999) *Nature* 397: 262-
 266) podem ser providos para níveis aumentados de ativação
 5 de célula T.

O transplante de medula óssea está sendo usado
 correntemente para tratar vários tumores de origem
 hematopoiética. Embora a doença de enxerto versus hospedeiro
 seja uma consequência desse tratamento, o benefício
 10 terapêutico pode ser obtido de respostas de enxerto versus
 tumor. O bloqueio de PD-1 pode ser empregado para aumentar a
 eficácia das células T específicas de tumor enxertadas no
 doador.

Existem também vários protocolos de tratamento
 15 experimental que envolvem ativação ex vivo e expansão das
 células T específicas de antígeno e transferência adotiva
 dessas células para os receptores em ordem para células T
 específicas de antígenos contra tumor (Greenberg, R. &
 Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Esses métodos podem
 20 também ser empregados para ativar as respostas da célula T
 aos agentes infecciosos, tais como, CMV. A ativação ex vivo
 na presença de anticorpos anti-PD-1 pode aumentar a
 frequência e atividade das células T transferidas por
 adoção.

25 Doenças Infecciosas

Outros métodos da invenção são empregados para
 tratar os pacientes que foram expostos às toxinas ou agentes
 patogênicos específicos. Conseqüentemente, outro aspecto da

invenção provê um método para tratamento de uma doença infecciosa em um indivíduo compreendendo administração ao indivíduo de um anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, tal que, o indivíduo é tratado da doença infecciosa. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo anti-humano PD-1 humano (tal como, quaisquer anticorpos anti-PD-1 humanos descritos aqui). Adicional ou alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou humanizado.

De modo semelhante a sua aplicação aos tumores conforme revelado acima, o bloqueio de PD-1 mediado por anticorpo pode ser usado sozinho ou como um coadjuvante, em combinação com vacinas, para estimular a resposta imune aos agentes patogênicos, toxinas e antígenos propriamente. Exemplos de agentes patogênicos para os quais essa abordagem terapêutica pode ser especificamente útil incluem agentes patogênicos para os quais não existe correntemente, qualquer vacina eficaz ou agentes patogênicos para os quais as vacinas convencionais são menos que completamente eficazes. Esses incluem, porém não estão limitados ao HIV, Hepatite (A, B & C), Influenza, Herpes, Giárdia, Malária, Leishmania, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*. O bloqueio de PD-1 é especificamente útil contra infecções estabelecidas por agentes, tais como, HIV que apresentam antígenos alterados no curso das infecções. Esses novos epítomos são reconhecidos como estranhos quando da administração de PD-1 anti-humano, provocando assim uma resposta de célula T forte que não é amortecida por sinais negativos através de PD-1.

Alguns exemplos de vírus patogênicos que causam infecções tratáveis por métodos da invenção incluem HIV, hepatite (A, B ou C), herpes vírus (por exemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II e CMV, vírus Epstein Barr), adenovírus, vírus
 5 influenza, flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus Cocksackie, cornovírus, vírus respiratório cincitial, vírus da cachumba, rotavírus, vírus do sarampo, vírus da rubéola, parvovírus, vírus da vacinia, vírus HTLV, vírus da dengue, papiloma vírus, vírus de molusco, vírus da pólio, vírus da raiva,
 10 vírus JC e vírus arborial encefalite.

Alguns exemplos de bactérias patogênicas que causam infecções tratáveis por métodos da invenção incluem clamídia, bactéria rickettsial, micobactéria, *staphylococci*,
streptococci, *pneumococci*, *meningococci* e *cornococci*,
 15 *klebsiella*, *proteus*, *serratia*, *pseudomonas*, *legionela*, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétano, botulismo, antrax, plague, leptospirose e bactéria da doença de Lyme.

Alguns exemplos de fungos patogênicos que causam infecções tratáveis pelos métodos da invenção incluem
 20 *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatos*, *niger*, etc.), Gênero *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizophus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e
 25 *Histoplasma capsulatum*.

Alguns exemplos de parasitas patogênicos que causam infecções tratáveis por métodos da invenção incluem *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*,

Acanthamoeba sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, e *Nippostrongylus brasiliensis*.

5 Em todos os métodos acima, o bloqueio de PD-1 pode ser combinado com outras formas de imunoterapia, tais como, tratamento com citocina (por exemplo, interferons, GM-CSF, G-CSF, IL-1) ou terapia de anticorpo biespecífica, que provê apresentação melhorada dos antígenos tumorais (vide,
10 por exemplo, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Reações Autoimunes

Anticorpos anti-PD-1 podem provocar e ampliar as respostas imunes. Na realidade, a indução das respostas
15 antitumor usando célula tumoral e vacinas de peptídeo revela que muitas respostas antitumor envolvem anti-reatividades próprias (despigmentação observada em anti-CTLA-4 + melanoma B16 modificado com GM-CSF em van Elisas e outros supra; despigmentação em camundongos vacinados com Trp2 (Overwijk,
20 W. e outros (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987); prostatite autoimune evocada por vacinas de célula de tumor TRAMP (Hurwitz, A. (2000) supra), vacinação com antígeno de peptídeo de melanoma e vitiligo observada em experimentos clínicos humanos (Rosenberg, SA e White, DE
25 (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19(1): 81-4).

Portanto, é possível considerar o emprego de bloqueio anti-PD-1 em conjunto com várias proteínas próprias a fim de projetar protocolos de vacinação para gerar

respostas imune eficientes contra essas proteínas próprias para tratamento de doença. Por exemplo, a doença de Alzheimer envolve acúmulo inapropriado de peptídeo A β nos depósitos amilóides no cérebro; respostas de anticorpo
5 contra amilóide são capazes de limpar esses depósitos de amilóide (Schenk e outros, (1999) *Nature* 400: 173-177).

Outras proteínas próprias podem também ser usadas como alvos, tais como, IgE para o tratamento da alergia e da asma, e TNF α para artrite reumatóide. Finalmente, as
10 respostas de anticorpo para vários hormônios podem ser induzidas pelo uso de anticorpo anti-DP-1. A neutralização das respostas de anticorpo aos hormônios de reprodução pode ser usada para contracepção. A neutralização da resposta do anticorpo aos hormônios e outros fatores solúveis que são
15 necessários pra o crescimento de tumores específicos podem também ser considerados como alvos de vacinação possíveis.

Métodos análogos conforme descritos aqui para uso de anticorpo anti-PD-1 podem ser usados para indução de respostas autoimunes terapêuticas para tratar pacientes
20 possuindo um acúmulo inapropriado de outros antígenos próprios, tais como depósitos de amilóide, incluindo A β na doença de Alzheimer, citocinas, tais como, TNF α e IgE.

Vacinas

25 Anticorpos anti-PD-1 podem ser usados para estimular respostas imunes específicas para antígeno por co-administração de um anticorpo anti-PD-1 com um antígeno de interesse (por exemplo, uma vacina). Conseqüentemente, em

outro aspecto, a invenção provê um método para melhorar a resposta imune a um antígeno em um indivíduo, compreendendo administração ao indivíduo de: i) o antígeno, e ii) um anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno, tal
5 que, uma resposta imune ao antígeno no indivíduo é melhorada. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo anti-humano PD-1 humano (tal como qualquer um dos anticorpos anti-PD-1 humanos descritos aqui). Adicional ou
alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo
10 quimérico ou humanizado. O antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno de um agente patogênico. Exemplos não limitantes de tais antígenos incluem aqueles discutidos nas seções acima, tais como, antígenos tumorais (ou vacinas
15 para tumor) discutidos acima ou antígenos de vírus, bactérias ou outros agentes patogênicos descritos acima.

As vias apropriadas de administração das composições de anticorpo (por exemplo, anticorpos monoclonais humanos, moléculas multiespecíficas e
20 biespecíficas e imunoconjugados) da invenção *in vivo* e *in vitro* são bem conhecidos na arte e podem ser selecionados pelos versados na técnica. Por exemplo, as composições de anticorpo podem ser administradas por injeção (por exemplo, intravenosa ou subcutânea). Dosagens apropriadas das
25 moléculas usadas dependerão da idade e peso do indivíduo e da concentração e/ou formulação da composição de anticorpo.

Conforme descrito aqui anteriormente, os anticorpos anti-PD-1 humanos da invenção podem ser

administrados com um ou mais outros agentes terapêuticos, por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico ou um agente imunossupressivo. O anticorpo pode ser ligado ao agente (como um imunocomplexo) ou pode ser administrado
5 separado do agente. No último caso (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, após ou concorrentemente com o agente ou pode ser co-administrado com outras terapias conhecidas, por exemplo, uma terapia anticâncer, por exemplo, radiação. Tais agentes terapêuticos
10 incluem, entre outros, agentes antineoplásicos, tais como, doxorubicina (adriamicina), sulfato de cisplatina bleomicina, carmustina, clorambucila, descarbazina e hidróxi uréia ciclofosfamida, que propriamente, são apenas eficazes em níveis que são tóxicos ou subtóxicos a um paciente.
15 Cisplatina é administrada intravenosamente como 100 mg/dose a cada quatro semanas e a adriamicina é administrada intravenosamente como uma dose de 60-75 mg/mL uma vez a cada 21 dias. A coadministração dos anticorpos anti-PD-1 humanos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, da presente
20 invenção com agentes quimioterapêuticos provê dois agentes anticâncer que operam com diferentes mecanismos que resultam em um efeito citotóxico às células tumorais humanas. Tal coadministração pode solucionar problemas devido ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos ou uma
25 alteração na antigenicidade das células tumorais o que tornaria as mesmas não reativas com o anticorpo.

Também dentro do escopo da presente invenção se encontram os kits compreendendo as composições de anticorpo

da invenção (por exemplo, anticorpos humanos, moléculas biespecíficas ou multiespecíficas ou imunoconjugados) e instruções de uso. O kit pode conter adicionalmente pelo menos um reagente adicional ou um ou mais anticorpos humanos
5 adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo humano possuindo uma atividade complementar que se liga a um epítopo no antígeno PD-1 distinto do primeiro anticorpo humano). Os kits incluem tipicamente um marcador indicando o uso pretendido do conteúdo do kit. O termo marcador inclui
10 qualquer matéria escrita ou gravada fornecida no ou com o kit ou que de outra forma acompanhe o kit.

Terapia de Combinação

A presente invenção se baseia, em parte, nos dados experimentais que se seguem. Modelos de tumor em camundongo
15 (câncer de cólon MC38 e fibrosarcoma SA1/N) foram usados para examinar o efeito *in vivo* de tratamento de um tumor por combinação dos anticorpos terapêuticos imunoestimuladores - anti-CTLA-4 e anti-PD-1. A combinação imunoterapêutica foi provida tanto simultaneamente com o implante das células
20 tumorais (Exemplos 14 e 17) quanto após as células tumorais serem implantadas por um tempo suficiente para se tornarem um tumor estabelecido (Exemplos 15, 16 e 18). Independente do tempo de tratamento do anticorpo, foi verificado que o tratamento com o anticorpo anti-CTLA-4 sozinho e tratamento
25 com anticorpo anti-PD-1 sozinho (anticorpo quimérico no qual um PD-1 anti-camundongo de rato foi modificado com uma região Fc de imunoglobulina de camundongo, vide Exemplo 1) teve um efeito modesto na redução do crescimento do tumor no

modelo de tumor MC38 (vide, por exemplo, figuras 21, 24 e 27). O anticorpo anti-CTLA-4 sozinho foi muito eficaz no modelo de tumor SA1/N (vide figura 30D), o que precisou uma dose de anticorpo anti-CTLA-4 inferior para estudos de
5 combinação nesse modelo. Não obstante, o tratamento de combinação do anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 mostrou um efeito significativamente maior e inesperado na redução do crescimento do tumor em comparação ao tratamento com o anticorpo sozinho (vide, por exemplo, Figuras 21D, 10 24D, 30F e 33H-J). Além disso, os resultados dos Exemplos 14, 16 e 18 mostram que o tratamento de combinação do anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 possui um efeito (sinérgico) significativo no crescimento do tumor, mesmo em doses terapêuticas subótimas quando comparado ao
15 tratamento tanto com o anticorpo sozinho (isto é, a terapia de combinação foi surpreendentemente mais eficaz em doses subterapêuticas que na monoterapia). Sem desejar estar ligado a qualquer teoria, é possível que elevando-se o limite de ativação da célula T por bloqueio de PD-1 e CTLA-
20 4, as respostas antitumorais possam ser ativadas em um hospedeiro.

Em uma modalidade, a presente invenção provê um método para tratamento de uma doença hiperproliferativa, compreendendo administração de um anticorpo PD-1 e um
25 anticorpo CTLA-4 a um indivíduo. Nas modalidades adicionais, o anticorpo anti-PD-1 é administrado em uma dose subterapêutica, o anticorpo anti-CTLA-4 é administrado em uma dose subterapêutica ou ambos são administrados em uma

dose subterapêutica. Em outra modalidade, a presente invenção provê um método para alterar um evento adverso associado ao tratamento de uma doença hiperproliferativa com um agente imunoestimulador, compreendendo administração de um anticorpo anti-PD-1 e uma dose subterapêutica de um anticorpo anti-CTLA-4 a um indivíduo. Em determinadas modalidades, o indivíduo é um ser humano. Em determinadas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 é o anticorpo monoclonal de seqüência humana 10D1 e o anticorpo anti-PD-1 é o anticorpo monoclonal de seqüência humana, tal como, 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 4A11. Anticorpos monoclonais de seqüência humana 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 4A11 foram isolados e caracterizados estruturalmente conforme descrito na Patente Provisória US número 60.679.466.

O anticorpo anti-CTLA-4 e os anticorpos monoclonais anti-PD-1 (mAbs) e os anticorpos de seqüência humana da invenção podem ser produzidos por várias técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnicas de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495. Qualquer técnica para produção de anticorpo monoclonal pode ser empregada, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B. Um sistema animal para preparação de hibridomas é o sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é uma produção bem estabilizada. Os protocolos de imunização e técnicas para isolamento de esplenócitos imunizados para fusão são conhecidos na arte. Os parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e

procedimentos de fusão são também conhecidos (vide, por exemplo, Harlow e Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

5 Anticorpos anti-CTLA-4 da presente invenção se ligam a um epítopo na CTLA-4 humana, de modo a inibir a interação de CTLA-4 com um contrareceptor B7 humano. Em razão da interação do CTLA-4 humano com B7 transduzir um sinal conduzindo a inativação das células T portando o
10 receptor de CTLA-4 humano, o antagonismo da interação induz, eficazmente, aumentos ou prolongamentos de ativação das células T portando o receptor CTLA-4 humano, pelo que, prolongando ou aumentando a resposta imune. Anticorpos anti-CTLA-4 são descritos nas Patentes US números 5.811.097;
15 5.855.887; 6.051.227; nas Publicações de Pedido PCT números WO 01/14424 e WO 00/37504; e na Publicação de Patente U.S. número 2002/0039581. Cada uma dessas referências é especificamente incorporada aqui como referência para fins da descrição dos anticorpos anti-CTLA-4. Um anticorpo anti-
20 CTLA-4 clínico exemplar é o anticorpo monoclonal humano 10D1 conforme revelado no WO 01/14424 e Pedido de Patente US número 09/644.668. O anticorpo 10D1 foi administrado em doses simples e múltiplas, sozinho ou em combinação com uma vacina, quimioterapia, ou interleucina-2 em mais de 500
25 pacientes diagnosticados com melanoma metastático, câncer de próstata, linfoma, câncer de célula renal, câncer de mama, câncer ovariano e HIV. Outros anticorpos anti-CTLA-4 englobados pelos métodos da presente invenção incluem, por

exemplo, aqueles revelados em: WO 98/42752; WO 00/37504; Patente US número 6.207.156; Hurwitz e outros (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho e outros (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Resumo número 2505
5 (anticorpo CP-675206); e Mokyr e outros. (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. Em determinadas modalidades, os métodos da presente invenção compreendem o uso de um anticorpo anti-CTLA-4 que é um anticorpo de sequência humana, preferivelmente um anticorpo monoclonal e em outra
10 modalidade é um anticorpo monoclonal 10D1.

Em determinadas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 se liga ao CTLA-4 humano com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos, se liga a CTLA-4 humana com uma K_D de 1×10^{-8} M ou menos, se liga a CTLA-4 humana com uma K_D de 5×10^{-9} M ou
15 menos, ou se liga a CTLA-4 humana com uma K_D entre 1×10^{-8} M e 1×10^{-10} M ou menos.

A combinação de anticorpos é útil para melhorar uma resposta imune contra a doença hiperproliferativa por bloqueio de PD-1 e CTLA-4. Em uma concretização preferida,
20 os anticorpos da presente invenção são anticorpos humanos. Por exemplo, essas moléculas podem ser administradas às células em cultura, *in vitro* ou *ex vivo*, ou aos indivíduos humanos, por exemplo, *in vivo*, para aumentar a imunidade em várias situações. Conseqüentemente, em um aspecto, a
25 invenção provê um método para modificação de uma resposta imune em um indivíduo compreendendo administração ao indivíduo de uma combinação de anticorpo ou uma combinação de porções de ligação de antígeno do mesmo, da invenção, tal

que, a resposta imune no indivíduo é modificada. Preferivelmente, a resposta é melhorada, estimulada ou supra-regulada. Em outra modalidade, a presente revelação provê um método para alterar os eventos adversos associados
5 ao tratamento de uma doença hiperproliferativa com um agente terapêutico imunoestimulador, compreendendo administração de um anticorpo anti-PD-1 e uma dose subterapêutica de anticorpo anti-CTLA-4 ao indivíduo.

O bloqueio de PD-1 e CTLA-4 por anticorpos pode
10 melhorar a resposta imune às células cancerígenas no paciente. Os cânceres que se desenvolvem podem ser inibidos usando os anticorpos da presente invenção que incluem cânceres tipicamente sensíveis a imunoterapia. Exemplos representativos de cânceres para tratamento com a terapia de
15 combinação da presente revelação incluem melanoma (por exemplo, melanoma maligno metastático), câncer renal, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de cólon e câncer de pulmão. Exemplos de outros cânceres que podem ser tratados usando os métodos da invenção incluem câncer ósseo, câncer
20 pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intra-ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer dos testículos, câncer uterino, carcinoma das trompas falopianas, carcinoma do endométrio,
25 carcinoma do cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula

paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma do tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, leucemias crônica ou aguda incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia 5 linfocítica crônica, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, câncer da bexiga, câncer dos rins ou uretra, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (CNS), linfoma primário do CNS, angiogênese do tumor, tumor do eixo da espinha, glioma do tronco 10 encefálico, adenoma da pituitária, sarcoma de Kaposi, câncer epidermóide, câncer da célula escamosa, linfoma da célula T, cânceres induzidos ambientalmente incluindo aqueles induzidos por asbestos e combinações dos cânceres. A presente invenção também é útil para o tratamento de 15 cânceres metastáticos.

Em determinadas modalidades, a combinação de anticorpos terapêuticos discutida aqui pode ser administrada concorrentemente em uma composição simples em um veículo farmacologicamente aceitável ou concorrentemente como 20 composições separadas com cada anticorpo em um veículo farmacologicamente aceitável. Em outra modalidade, a combinação de anticorpos terapêuticos pode ser administrada seqüencialmente. Por exemplo, um anticorpo anti-CTLA-4 e um anticorpo anti-PD-1 podem ser administrados seqüencialmente, 25 tal como anti-CTLA-4 sendo administrado primeiro e o anti-PD-1 sendo administrado depois ou o anti-PD-1 sendo administrado primeiro e o anti-CTLA-4 em segundo lugar. Adicionalmente, se mais de uma dose da terapia de combinação

for administrada seqüencialmente, a ordem de administração seqüencial pode ser revestida ou mantida na mesma ordem em cada ponto de tempo de administração, administrações seqüenciais podem ser combinadas com administração
5 concorrentes ou qualquer combinação das mesmas. Por exemplo, a primeira administração de uma combinação de anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 pode ser concorrente, a segunda administração pode ser seqüencial com anti-CTLA-4 em primeiro e anti-PD-1 em segundo lugar, e a terceira
10 administração pode ser seqüencial com anti-PD-1 em primeiro e anti-CTLA-4 em segundo lugar. Outro esquema de dosagem representativo pode envolver uma primeira administração que é seqüencial com anti-PD-1 em primeiro e anti-CTLA-4 em segundo lugar, e administrações subseqüentes podem ser
15 concorrentes.

Opcionalmente, a combinação dos anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 pode ser adicionalmente combinada com agente imunogênico, tais como, células cancerígenas, antígenos de tumor purificados (incluindo proteínas
20 recombinantes, peptídeos e moléculas de carboidratos), células e células transfectadas com genes codificando citocinas de estimulação imune (He e outros. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Exemplos não limitantes de vacinas de tumor que podem ser usadas incluem peptídeos de antígenos de
25 melanoma, tais como, peptídeos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 e/ou tirosinase ou células tumorais transfectadas para expressar a citocina GM-CSF (discutida adicionalmente a seguir).

Um bloqueio de PD-1 e CTLA-4 combinado pode ser adicionalmente combinado com um protocolo de vacinação. Muitas estratégias experimentais para vacinação contra tumores foram projetadas (vide, Rosenberg, S. (2000) Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. (2000) ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. (2000) ASCO Educational Book Spring: 730-738; vide também, Restifo e Sznol, Cancer Vaccines, capítulo 61, páginas 3023-3043 em DeVita e outros (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Quinta Edição). Em uma dessas estratégias, uma vacina é preparada usando células tumorais autólogas ou alogênicas. Essas vacinas celulares mostraram ser mais eficazes quando as células tumorais são transduzidas para expressar GM-CSF. GM-CSF mostrou ser um ativador potente da apresentação de antígeno para vacinação tumoral (Dranoff e outros. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

O estudo da expressão gênica e padrão de expressão gênica em grande escala em vários tumores conduziu a definição dos assim chamados antígenos específicos de tumor (Rosenberg (1999) *Immunity* 10:281-7). Em muitos casos, esses antígenos específicos de tumor são antígenos de diferenciação expressos nos tumores e na célula a partir da qual o tumor surge, por exemplo, antígenos de melanócito gp100, antígenos MAGE e Trp-2. De modo mais importante, muitos desses antígenos podem ser mostrados como sendo os alvos das células T específicas de tumor encontradas no

hospedeiro Em determinadas modalidades, um bloqueio de PD-1 e CTLA-4 combinado usando as composições de anticorpo descritas aqui pode ser usado em conjunto com uma coleção de proteínas recombinantes e/ou peptídeos expressos em um tumor, a fim de gerar uma resposta imune a essas proteínas. Essas proteínas são normalmente vistas pelo sistema imune como antígenos próprios e são, portanto, tolerantes aos mesmos. O antígeno tumoral pode também incluir a proteína telomerase, que é necessária para a síntese dos telômeros dos cromossomas e que é expressa em mais de 85% dos cânceres humanos e em apenas um número limitado de tecidos somáticos (Kim e outros (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Esses tecidos somáticos podem ser protegidos de ataque imune por vários meios) O antígeno tumoral pode também se constituir nos "neo-antígenos" expressos nas células cancerígenas em razão das mutações somáticas que alteram a seqüência da proteína ou criam proteínas de fusão entre duas seqüências não correlatas (isto é, bcr-abl no cromossoma Philadelphia) ou idiótipo de tumores da célula B.

Outras vacinas tumorais podem incluir as proteínas dos vírus implicados nos cânceres humanos tais como, Vírus do Papiloma Humano (HPV), Vírus da Hepatite (HBV e HCV) e Herpes Vírus Sarcoma de Kaposi (KHSV). Outra forma de antígeno específico de tumor que pode ser usada em conjunto com bloqueio de PD-1 são as proteínas de choque térmico purificadas (HSP) isoladas do tecido tumoral propriamente. Essas proteínas de choque térmico contêm fragmentos de proteínas das células tumorais e essas HSPs são altamente

eficientes na liberação às células apresentando antígeno para promoção de imunidade de tumor (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura, Y. e outros (1997) *Science* 278: 117-120).

5 Células dendríticas (DC) são células apresentando antígeno potentes que podem ser usadas para iniciar respostas específicas de antígeno. As DCs podem ser produzidas *ex vivo* e carregadas com vários antígenos de proteína e peptídeo, bem como extratos de célula tumoral
10 (Nestle, F. e outros (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). As DCs podem também ser transduzidas por meios genéticos para expressar esses antígenos tumorais. As DCs foram também diretamente fundidas às células tumorais com o fim de imunização (Kugler, A. e outros (2000) *Nature Medicine*
15 6:332-336). Como um método de vacinação, a imunização com DC pode se eficazmente combinada com bloqueio de PD-1 e CTLA-4 para ativar respostas antitumor mais potentes.

Um bloqueio de PD-1 e CTLA-4 combinado pode também ser adicionalmente combinado com tratamentos padrão para o
20 câncer. Por exemplo, um bloqueio de PD-1 e CTLA-4 combinado pode ser eficazmente combinado com regimes quimioterapêuticos. Nesses casos, como é observado com a combinação de anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4, pode ser possível reduzir a dose do reagente quimioterapêutico
25 administrado com a combinação da presente revelação (Mokyr, M. e outros, (1998) *Cancer Research* 58:5301-5304). Um exemplo de tal combinação é a combinação de anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 em combinação com decarbazina para o

tratamento do melanoma. Outro exemplo é a combinação dos anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 adicionalmente em combinação com interleucina-2 (IL-2) para o tratamento de melanoma. A racionalização específica por trás do uso
5 combinado de bloqueio de PD-1 e CTLA-4 com quimioterapia é que a morte da célula, que é uma consequência da ação citotóxica da maioria dos compostos quimioterapêuticos, resultaria em níveis aumentados de antígeno tumoral na via de apresentação do antígeno. Outras terapias de combinação
10 que podem resultar em sinergia com o bloqueio de PD-1 e CTLA-4 através da morte celular são radiação, cirurgia e ausência hormonal. Cada um desses protocolos cria uma fonte de antígeno tumoral no hospedeiro. Os inibidores de angiogênese podem também ser combinados com bloqueio de PD-1
15 e CTLA-4. A inibição da angiogênese leva a morte da célula tumoral que pode também ser uma fonte de antígeno tumoral a ser alimentada às vias de apresentação do antígeno hospedeiro.

Uma combinação de anticorpos de bloqueio PD-1 e
20 CTLA-4 pode também ser usada em combinação com anticorpos biespecíficos que alvejam as células efetoras expressando receptor $Fc\alpha$ ou $Fc\gamma$ para células tumorais (vide, por exemplo, Patentes US números 5.922.845 e 5.837.243). Anticorpos biespecíficos podem ser usados para alvejar dois
25 antígenos separados. Por exemplo, anticorpos biespecíficos de receptor anti-Fc/antígeno antitumoral (por exemplo, Her-2/neu), foram usados para alvejar macrófagos para sítios de tumor. Esse alvejamento pode ativar mais eficazmente as

respostas específicas de tumor. A ramificação da célula T dessas respostas poderia ser aumentada por emprego do bloqueio de PD-1 e CTLA-4 combinados. Alternativamente, o antígeno pode ser liberado diretamente para as DCs por
5 emprego de anticorpos biespecíficos que se ligam ao antígeno tumoral e um marcador de superfície de célula específico de célula dendrítica.

Em outro exemplo, uma combinação de anticorpos específicos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 pode ser usada em
10 conjunto com anticorpos antineoplásticos, tais como, Rituxan^(R) (rituximab), Herceptin^(R) (trastuzumab), Bexxar^(R) (tositumomab), Zevalin^(R) (ibritumomab), Campath^(R) (alemtuzumab), Lymphocide^(R) (epratuzumab), Avastin^(R) (bevacizumab) e Tarceva^(R) (erlotinib) e semelhantes. Como
15 exemplo e não desejando estar ligado a qualquer teoria, o tratamento com um anticorpo anticâncer ou um anticorpo anticâncer conjugado a uma toxina pode levar à morte da célula cancerígena (por exemplo, células tumorais), o que potencializa uma resposta imune mediada por CTLA-4 ou PD-1.
20 Em uma modalidade exemplar, um tratamento de uma doença hiperproliferativa (por exemplo, um tumor cancerígeno) pode incluir um anticorpo anticâncer em combinação com anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 concorrente ou seqüencialmente ou qualquer combinação dos mesmos, que possa potencializar
25 respostas imunes antitumor pelo hospedeiro.

Os tumores escapam da fiscalização imune do hospedeiro por uma variedade de mecanismos. Muitos desses mecanismos podem ser superados pela inativação das proteínas

que são expressas pelos tumores e que são imunossupressivas. Essas incluem, entre outras, TGF- β (Kehrl, J. e outros (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), e ligante Fas (Hahne, M. e outros (1996) *Science* 274: 1363- 1365). Em outro exemplo, os anticorpos para cada uma dessas entidades podem ser adicionalmente associados com combinação de anti-PD-1 e anti-CTLA-4 para combater os efeitos do agente imunossupressivo e favorecer respostas imunes do tumor geradas pelo hospedeiro.

Outros anticorpos que podem ser usados para ativar a resposta imune do hospedeiro podem ser adicionalmente empregados em associação com uma combinação de anti-PD-1 e anti-CTLA-4. Esses incluem moléculas na superfície das células dendríticas que ativam a função DC e apresentação do antígeno. Anticorpos anti-CD40 podem ser substituídos eficazmente por atividade da célula T auxiliar (Ridge, J. e outros (1998) *Nature* 393: 474-478) e podem ser usados em conjunto com uma combinação de anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 (Ito, N. e outros (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). Ativação dos anticorpos para moléculas co-estimuladoras de célula T, tais como OX-40 (Weinberg, A. e outros (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I e outros (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), e ICOS (Hutloff, A. e outros (1999) *Nature* 397: 262-266) podem ser providos para níveis aumentados de ativação de célula T.

O transplante de medula óssea está sendo usado correntemente para tratar vários tumores de origem

hematopoiética. Embora a doença de enxerto versus hospedeiro seja uma consequência desse tratamento, o benefício terapêutico pode ser obtido de respostas de enxerto versus tumor. O bloqueio de PD-1 e CTLA-4 combinado pode ser
5 empregado para aumentar a eficácia das células T específicas de tumor enxertadas no doador.

Existem também vários protocolos de tratamento experimental que envolvem ativação *ex vivo* e expansão das células T específicas de antígeno e transferência adotiva
10 dessas células para os receptores em ordem para células T específicas de antígenos contra tumor (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Esses métodos podem também ser empregados para ativar as respostas da célula T aos agentes infecciosos, tais como, CMV. A ativação *ex vivo*
15 na presença de anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 pode aumentar a frequência e atividade das células T transferidas por adoção.

Conforme estabelecido aqui, os órgãos podem exibir eventos adversos correlatos imunes seguindo-se a terapia com anticorpo terapêutico imunoestimulador, tal como o trato GI
20 (diarréia e colite) e a pele (erupção e prurido) após tratamento com anticorpo anti-CTLA-4. Por exemplo, eventos adversos correlatos imunes gastrointestinais não colônicos vêm sendo observados no esôfago (esofagite), duodeno
25 (duodenite) e íleo (ileite) após tratamento com anticorpo anti-CTLA-4.

Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método para alterar um evento adverso associado ao

tratamento de uma doença hiperproliferativa com um agente imunoestimulador, compreendendo um anticorpo anti-PD-1 e uma dose subterapêutica de anticorpo anti-CTLA-4 a um indivíduo. Por exemplo, os métodos da presente invenção fornecem um

5 processo para reduzir a incidência de colite induzida por anticorpo terapêutico imunoestimulador ou diarreia por administração de um esteróide não absorvível ao paciente. Uma vez que qualquer paciente que receba um anticorpo terapêutico imunoregulador corre o risco de desenvolver

10 colite ou diarreia induzidas por tal anticorpo, toda essa população de pacientes é apropriada para receber terapia de acordo com os métodos da presente invenção. Embora os esteróides venham sendo administrados para tratar doença dos intestinos inflamados (IBD) e prevenir exacerbações da IBD,

15 eles não vêm sendo usados para prevenir (diminuir a incidência) de IBD em pacientes não diagnosticados com IBD. Os efeitos colaterais significativos associados aos esteróides, mesmo esteróides não absorvíveis, vêm desencorajando o seu uso profilático.

20 Nas modalidades adicionais, uma combinação de bloqueio de PD-1 e CTLA-4 (isto é, anticorpos terapêuticos imunoestimuladores anti-PD-1 e anti-CTLA-4) podem ser adicionalmente associadas ao uso de qualquer esteróide não absorvível. Conforme empregado aqui, um "esteróide não

25 absorvível" é um glicocorticóide que exhibe metabolismo de primeira passagem extensivo, tal que, seguindo-se o metabolismo no fígado, a biodisponibilidade do esteróide é baixa, isto é, inferior a cerca de 20%. Em uma modalidade da

invenção, o esteróide não absorvível é budesonídeo. O budesonídeo é um glicocorticosteróide atuando localmente que é extensivamente metabolizado, primariamente pelo fígado, seguindo-se administração oral. ENTOCORT EC^(R) (Astra-Zeneca) é uma formulação oral dependente de pH e tempo de budesonídeo desenvolvido para otimizar a liberação do medicamento ao íleo e através de todo o cólon. ENTOCORT EC^(R) é aprovado nos Estados Unidos da América para o tratamento de doença de Crohn branda a moderada envolvendo o íleo e/ou cólon ascendente. A dosagem oral usual de ENTOCORT EC^(R) para o tratamento da doença de Crohn é de 6 a 9 mg/dia. ENTOCORT EC^(R) é liberado nos intestinos antes de ser absorvido e retido na mucosa dos intestinos. Uma vez que passa através do tecido alvo da mucosa dos intestinos, ENTOCORT EC^(R) é extensivamente metabolizado pelo sistema citocromo P450 no fígado para metabólitos com atividade glicocorticóide insignificante. Portanto, a biodisponibilidade é baixa (cerca de 10%). A biodisponibilidade baixa do budesonídeo resulta em uma razão terapêutica aperfeiçoada em comparação aos outros glicocorticóides com metabolismo de primeira passagem menos extenso. O budesonídeo resulta em poucos efeitos colaterais incluindo menos supressão do hipotálamo-pituitária, que os corticóides atuando sistematicamente. Contudo, a administração crônica de ENTOCORT EC^(R) pode resultar em efeitos de glicocorticóide, tais como, hipercorticismismo e supressão adrenal. Vide PDR, 58ª Edição, 2004: 608-610.

Ainda nas modalidades adicionais, uma combinação

de bloqueio de PD-1 e CTLA-4 (isto é, anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 terapêuticos imunoestimuladores) em conjunto com um esteróide não absorvível podem ser adicionalmente combinadas com um salicilato. Os salicilatos incluem agentes

5 5-ASA tais como, por exemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE^(R), Pharmacia & UpJohn); olsalazina (DIPENTUM^(R), Pharmacia & UpJohn); balsalazida (COLAZAL^(R), Salix Pharmaceuticals, Inc.) e mesalamina (ASACOL^(R), Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA^(R), Shire US; CANASA^(R), Axan

10 Scandipharm, Inc.; ROWASA^(R), Solvay).

De acordo com os métodos da presente invenção, o salicilato administrado em combinação com os anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 e um esteróide não absorvível pode incluir qualquer sobreposição ou administração seqüencial do

15 salicilato e do esteróide não absorvível para fins de diminuição da incidência de colite induzida por anticorpos imunoestimulatórios. Assim, por exemplo, os métodos para redução da incidência de colite induzida por anticorpos imunoestimuladores de acordo com a presente invenção

20 englobam administração do salicilato e um não absorvível concorrente ou seqüencialmente (por exemplo, um salicilato é administrado 6 horas após um esteróide não absorvível) ou qualquer combinação dos mesmos. Adicionalmente, de acordo com a presente invenção, um salicilato e um esteróide não

25 absorvível podem ser administrados pela mesma via (por exemplo, ambos são administrados oralmente) ou por vias diferentes (por exemplo, um salicilato é administrado oralmente e um esteróide não absorvível é administrado

retalmente), o que pode diferir da(s) via(s) usada(s) para administrar os anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4.

A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelos exemplos que se seguem que não devem ser tidos como
5 limitantes. O conteúdo de todas as figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados através de todo esse pedido são expressamente incorporados como referência.

EXEMPLOS

10 Exemplo 1: Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos Contra PD-1

Antígenos

Protocolos de imunização utilizaram como antígenos ambos i) uma proteína de fusão recombinante compreendendo a
15 porção extracelular de PD-1 e ii) PD-1 de comprimento pleno ligado à membrana. Ambos os antígenos foram gerados por métodos de transfecção recombinante em uma linhagem de células CHO.

Camundongos HuMab e KM^(R) transgênicos

20 Anticorpos monoclonais completamente humanos para PD-1 foram preparados usando a cepa HCo7 de camundongos transgênicos HuMab e a cepa KM de camundongos transcromossômicos transgênicos, cada uma das quais expressando os genes de anticorpo humano. Em cada uma dessas
25 cepas de camundongo, o gene de cadeia leve capa de camundongo endógeno foi interrompido homozigoneamente conforme descrito em Chen e outros (1993) *EMBO J.* 12:811-820 e o gene de cadeia pesada de camundongo endógeno foi

interrompido homozigoneamente conforme descrito no Exemplo 1 da Publicação PCT WO 01/09187. Cada uma dessas cepas de camundongo transporta um transgene de cadeia leve capa humano, KCo5, conforme descrito em Fishwild e outros (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. A cepa HCo7 transporta o transgene de cadeia pesada humana HCo7 conforme descrito nas Patentes US números 5.545.806; 5.625.825 e 5.545.807. A cepa KM contém o cromossoma SC20 conforme descrito na Publicação PCT WO 02/43478.

10 Imunizações de HuMab e KM

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para PD-1, camundongos HuMab e camundongos KM[™] foram imunizados com proteína de fusão de PD-1 recombinante purificada e as células CHO transfectadas com PD-1 como
 15 antígeno. Esquemas de imunização geral para camundongo HuMab são descritos em Lonberg, N. e outros (1994) *Nature* 368 (6474):856-859; Fishwild, D. e outros (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851 e Publicação PCT WO 98/24884. Os camundongos tinham 6-16 semanas de idade quando da primeira
 20 infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada (5-50 µg) de antígeno de proteína de fusão de PD-1 e 5-10 x 10⁶ células foram usadas para imunizar os camundongos HuMab e camundongos KM[™] intraperitonealmente, subcutaneamente (Sc) ou através de injeção na almofada da pata.

25 Os camundongos transgênicos foram imunizados duas vezes com antígeno em adjuvante de Freund ou adjuvante IP Ribi, seguido por 3-21 dias com IP (até um total de 11 imunizações) com o antígeno no adjuvante de Freund

incompleto ou de Ribí. A resposta imune foi monitorada por sangramentos retro-orbitais. O plasma foi classificado por ELISA (conforme descrito abaixo) e camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana anti-PD-1 foram usados para fusões. Os camundongos foram reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. Tipicamente, 10-35 fusões para cada antígeno foram realizadas. Várias dúzias de camundongos foram imunizados para cada antígeno.

Seleção de Camundongos HuMab ou KMTM Produzindo Anticorpos Anti-PD-1

Para selecionar camundongos HuMab ou KMTM que produzam anticorpos que se ligam a PD-1, os soros de camundongos imunizados foram testados por ELISA conforme descrito por Fishwild, D. e outros (1996). Em resumo, placas de microtitulação foram revestidas com proteína de fusão de PD-1 recombinante purificada de células CHO transfectadas em 1-2 µg/mL em PBS, 100 µl/poços incubada a 4°C por toda noite, então bloqueada com 200 µl/poço de soro fetal bovino a 5% em PBS/Tween (0,05%). Diluições de soros de camundongos imunizados com PD-1 foram adicionadas a cada poço e incubadas por 1-2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e então incubadas com anticorpo policlonal de IgG anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram reveladas com substrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/mL) e analisadas por espectrofotômetro em OD 415-495. Os

camundongos que desenvolveram as titulações mais altas de anticorpos anti-PD-1 foram usados para fusões. As fusões foram realizadas conforme descrito abaixo e sobrenadantes de hibridoma foram testados quanto à atividade anti-PD-1 por
5 ELISA.

Geração de Hibridomas Produzindo Anticorpos Monoclonais Humanos para PD-1:

Os esplenócitos de camundongo, isolados dos camundongos HuMab ou KM, foram infusados a uma linhagem de
10 célula de mieloma de camundongo usando tanto PEG com base nos protocolos padrão ou eletrofusão com base no campo elétrico usando um eletroporador de fusão de célula de câmara grande Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Os hibridomas resultantes foram então
15 classificados quanto à produção de anticorpos específicos para antígeno. As suspensões de célula simples de esplenócitos de camundongo imunizado foram fundidas para um quarto do número de células de mieloma de camundongo não seretando SP2/0 (ATCC, CRL 1581) com PEG a 50% (Sigma). As
20 células foram colocadas em placas em aproximadamente 1×10^5 /poço em placa de microtitulação de fundo plano, seguido por incubação de cerca de duas semanas em meio seletivo contendo soro fetal bovino a 10%, meio condicionado P388D1 a 10% (ATCC, CRL TIB-63), 3-5% de origeno (IGEN) em DMEM
25 (Mediatech, CRL 10013, com glicose alta, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 mg/mL de gentamicina e 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em

meio onde o HAT foi substituído por HT. Os poços individuais foram então classificados por ELISA (descrito acima) para anticorpos IgG monoclonais anti-PD-1 humanos. Uma vez que tenha ocorrido o crescimento extensivo do hibridoma, o meio
 5 foi monitorado geralmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretando anticorpo foram recolocados na placa, classificados novamente e, caso ainda positivos quanto a IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-PD-1 seriam subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitante. Os
 10 subclones estáveis foram então cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo no meio de cultura do tecido para caracterização adicional.

Clones de hibridoma 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 foram selecionados para análise adicional.

15 EXEMPLO 2: Caracterização estrutural de anticorpos monoclonais humanos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4

As seqüências de DNAC codificando as regiões variáveis de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 foram obtidas dos
 20 hibridomas 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4, respectivamente, empregando técnicas PCR padrão e foram sequenciadas usando técnicas de seqüenciamento de DNA padrão.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da
 25 região variável de cadeia pesada de 17D8 são mostradas na figura 1A e na SEQ ID NO:57 e 1, respectivamente.

As seqüências de nucleotídeo e aminoácido da região variável de cadeia leve de 17D8 são mostradas na

figura 1B e na SEQ ID NO: 64 e 8, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 17D8 com as seqüências de cadeia pesada da imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas
5 demonstrou que a cadeia pesada 17D8 utiliza um segmento de VH da linhagem germinal humana VH 3-33, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência 17D8 VH em relação à seqüência da linhagem germinal VH 3-33 é mostrado na figura
10 8. Análise adicional da seqüência 17D8 VH usando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostrado nas figuras 1A e 8, e nas SEQ ID NOs: 15, 22 e 29, respectivamente.

15 A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia leve 17D8 com as seqüências de cadeia pesada da imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia pesada 17D8 utiliza um segmento de VL da linhagem germinal humana VK L6, um segmento JK da
20 linhagem germinal humana JK 4. O alinhamento da seqüência 17D8 VL em relação à seqüência da linhagem germinal VL L6 é mostrado na figura 9. Análise adicional da seqüência 17D8 VL usando o sistema Kabat de determinação da região CDR levou ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e
25 CD3 conforme mostrado nas figuras 1B e 9, e nas SEQ ID NOs: 36, 43 e 50, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável da cadeia pesada de 2D3 são mostrados na figura 2A

e nas SEQ ID NOs:58 e 2, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável da cadeia leve de 2D3 são mostrados na figura 2B e nas SEQ ID NOs:65 e 9, respectivamente.

5 A comparação da seqüência de imunoglobulina da cadeia pesada 2D3 em relação às seqüências da cadeia pesada de imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas demonstraram que a cadeia pesada 2D₃ utiliza um segmento VH da linhagem germinal humana VH 3-33, um segmento da linhagem
10 germinal humana 7-27 e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência 2D3 VH em relação à seqüência VH 3-33 da linhagem germinal é mostrado na figura 8. Análise adicional da seqüência 2D3 VH usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento
15 das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 como mostrado na figuras 2A e 8, e nas SEQ ID NOs: 16, 23 e 30, respectivamente.

 A comparação da seqüência da imunoglobulina de cadeia leve 2D3 em relação às seqüências da cadeia leve de
20 imunoglobulina da linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia leve 2D3 emprega um segmento VL da linhagem germinal humana VK L6 e um segmento JK da linhagem germinal humana JK 4. O alinhamento da seqüência 2D3 VL em relação à seqüência VK L6 de linhagem germinal é mostrado na
25 figura 9. Análise adicional da seqüência 2D3 VL usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 as mostrado nas figuras 2B e 9, e nas SEQ ID NOs: 37, 44 e 51,

respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 4H1 são mostrados na figura 3A e nas SEQ ID NOs:59 e 3, respectivamente.

5 O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia leve de 4H1 são mostrados na figura 3B e nas SEQ ID NOs:66 e 10, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina da cadeia pesada 4H1 em relação às seqüências da cadeia pesada de imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia pesada 4H1 utiliza um segmento VH da linhagem germinal humana VH 3-33, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência 4H1 VH em relação à seqüência VH 3-33 da linhagem germinal é mostrado na figura 8. Análise adicional da seqüência 4H1 VH usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 como mostrado na figuras 3A e 8, e nas SEQ ID NOs: 17, 24 e 31, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina da cadeia leve 4H1 em relação às seqüências da cadeia leve de imunoglobulina da linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia 4H1 leve emprega um segmento VL da linhagem germinal humana VK L6 e um segmento JK da linhagem germinal humana JK 1. O alinhamento da seqüência 4H1 VL em relação à seqüência VK L6 de linhagem germinal é mostrado na figura 10. Análise adicional da seqüência 4H1 VL usando o

sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostrado nas figuras 3B e 10, e nas SEQ ID NOs: 38, 45 e 52, respectivamente.

5 O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 5C4 são mostrados na figura 4A e nas SEQ ID NO:60 e 4, respectivamente.

10 O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia leve de 5C4 são mostrados na figura 4B e nas SEQ JJD NOs:61 e 11, respectivamente.

15 A comparação da seqüência de imunoglobulina da cadeia pesada 5C4 em relação às seqüências da cadeia pesada de imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia 5C4 pesada utiliza um segmento VH da linhagem germinal humana VH 3-33, um segmento D indeterminado, e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência 5C4 VH em relação à seqüência VH 3-33 da linhagem germinal é mostrado na figura 8. Análise adicional da seqüência 5C4 VH usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 como mostrado na figuras 4A e 8, e nas SEQ JD NOs: 18, 25 e 32, respectivamente.

25 A comparação da seqüência de imunoglobulina da cadeia leve 5C4 em relação às seqüências da cadeia leve de imunoglobulina da linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia leve 5C4 emprega um segmento VL da linhagem germinal humana VK L6 e um segmento JK da linhagem

germinal humana JK 1. O alinhamento da seqüência 5C4 VL em relação à seqüência VK L6 de linhagem germinal é mostrado na figura 10. Análise adicional da seqüência 5C4 VL usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostrado na figuras 4B e 10, e nas SEQ JD NOs: 39, 46 e 53, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 4A11 são mostrados nas figura 10 5A e nas SEQ ID NOs:61 e 5, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia leve de 4A11 são mostrados na figura 5B e nas SEQ ID NOs:68 e 12, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina de cadeia pesada 4A11 com relação às seqüências da cadeia pesada de imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia pesada 4A11 utiliza um segmento VH da linhagem germinal humana VH 4-39, um segmento D da linhagem germinal humana 3-9, e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da seqüência 4A11 VH em relação à seqüência VH 4-39 da linhagem terminal é mostrado na figura 11. Análise adicional da seqüência 4A11 VH usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 como mostrado na figuras 5A e 11, e nas SEQ ID NOs: 19, 26 e 33, respectivamente.

A comparação da seqüência de imunoglobulina da cadeia leve 4A11 em relação às seqüências da cadeia leve de

imunoglobulina da linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia leve 4A11 emprega um segmento VL da linhagem germinal humana VK L15 e um segmento JK da linhagem germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência 4A11 VL em
5 relação à sequência VK L6 de linhagem germinal é mostrado na figura 12. Análise adicional da sequência 4A11 VL usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostrado nas figuras 5B e 12, e nas SEQ JD NOs: 40,
10 47 e 54, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada de 7D3 são mostrados na figura 7A e nas SEQ ID NOs:62 e 6, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região
15 variável de cadeia leve de 7D3 são mostrados na figura 7B e nas SEQ ID NOs:69 e 13, respectivamente.

A comparação da sequência de imunoglobulina da cadeia pesada 7D3 em relação às seqüências da cadeia pesada de imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecida
20 demonstrou que a cadeia pesada 7D3 utiliza um segmento VH da linhagem germinal humana VH 3-33, um segmento 7-27 D da linhagem germinal humana e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da sequência 7D3 VH em relação à sequência VH 3-33 da linhagem germinal é mostrado
25 na figura 8. Análise adicional da sequência 7D3 VH usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 como mostrado nas figuras 6A e 8, e nas SEQ ID NOs: 20, 27 e

34, respectivamente.

A comparação da sequência de imunogloblina da cadeia leve 7D3 em relação às seqüências da cadeia leve de imunoglobulina da linhagem germinal humana conhecidas
5 demonstrou que a cadeia 7D3 leve emprega um segmento VL da linhagem germinal humana VK L6 e um segmento JK da linhagem germinal humana JK 4. O alinhamento da sequência 7D3 VL em relação à sequência VK L6 de linhagem germinal é mostrado na figura 9. Análise adicional da sequência 7D3 VL usando o
10 sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3 conforme mostrado nas figuras 6B e 9, e nas SEQ JD NOs: 41, 48 e 55, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região
15 variável de cadeia pesada de 5F4 são mostrados na figura 7A e nas SEQ JD NOs:63 e 7, respectivamente.

O nucleotídeo e seqüências de aminoácido da região variável de cadeia leve de 5F4 são mostrados na figura 7B e nas SEQ ID NOs:70 e 14, respectivamente.

20 A comparação da sequência de imunoglobulina da cadeia pesada 5F4 em relação às seqüências da cadeia pesada de imunoglobulina de linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia pesada 5F4 utiliza um segmento VH da linhagem germinal humana VH 4-39, um segmento D da linhagem
25 germinal humana 3-9, e um segmento JH da linhagem germinal humana JH 4b. O alinhamento da sequência 5F4 VH em relação à sequência VH 4-39 de linhagem germinal é mostrado na figura 11. Análise adicional da sequência VH de 5F4 usando o

sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CD3 como mostrado na figuras 7A e 11, e nas SEQ ID NOs: 21, 28 e 35, respectivamente.

5 A comparação da sequência de imunoglobulina da cadeia leve 5F4 em relação às sequências da cadeia leve de imunoglobulina da linhagem germinal humana conhecidas demonstrou que a cadeia leve 5F4 emprega um segmento VL da
10 linhagem germinal humana VK L15 e um segmento JK da linhagem germinal humana JK 1. O alinhamento da sequência 5F4 VL em relação à sequência VK L6 de linhagem germinal é mostrado na figura 12. Análise adicional da sequência 5F4 VL usando o sistema Kabat da determinação da região CDR conduziu ao delineamento das regiões de cadeia leve CDR1, CDR2 e CD3
15 conforme mostrado nas figuras 7B e 12, e na SEQ ID NOs: 42, 49 e 56, respectivamente.

EXEMPLO 3: Caracterização da Especificidade do Ensaio e Cinética do Ensaio de Anticorpos Monoclonais Humanos Anti-PD-1

20 Nesse exemplo, a afinidade de ligação e cinética de ligação dos anticorpos anti-PD-1 foram examinadas por análise Biacore. A especificidade de ligação e competição cruzada foram examinados como citometria de fluxo.

Afinidade e cinética de ligação

25 Anticorpos anti-PD-1 foram caracterizados por afinidades e cinética de ligação por análise Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suécia). A proteína de fusão PD-1 humana recombinante purificada foi covalentemente ligada a

um chip CM5 (chip revestido com carbóxi metil dextrano) através de amins primárias, empregando química de acoplamento de amina padrão e kit fornecido pela Biacore. A ligação foi medida por fluxo de anticorpos no tampão HBS EP (5 provido pela Biacore AB) a uma concentração de 267 nM em uma razão de fluxo de 50 µg/min. A cinética de associação de anticorpo-antígeno foi seguida por 3 minutos e a cinética de dissociação foi seguida por 7 minutos. As curvas de associação e dissociação foram ajustadas para um modelo de 10 ligação 1:1 Langmuir usando software BIAevaluation (Biacore AB). Para minimizar os efeitos de avidéz na estimativa das constantes de ligação, apenas o segmento inicial dos dados correspondendo às fases de associação e dissociação foram usados para ajuste. Os valores K_D , K_{on} e K_{off} que foram 15 determinados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Dados de ligação Biacore para anticorpos monoclonais humanos PD-1.

Número da Amostra	Identificação da Amostra	Afinidade $K_D \times 10^{-9}$ (M)	Razão Aumentada $K_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	Razão diminuída $K_{off} \times 10^{-4}$ 1/s
1	17D8	0,16	2,56	0,45
2	2D3	1,20	3,77	4,52
3	4HI	5,46	3,15	1,72
4	5C4	0,73	4,32	3,15
5	4A11	0,13	0,76	0,099
6	7D3	2,49	18,2	4,54
7	5F4	2,91	8,74	2,54

Especificidade de ligação por citometria de fluxo

Linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) que expressam PD-1 humano recombinante na superfície da célula foram desenvolvidas e usadas para determinar a especificidade dos anticorpos monoclonais humanos PD-1 por citometria de fluxo. Células de CHO foram transfectadas com plasmídeos de expressão contendo formas de transmembrana codificando DNAc de comprimento pleno de PD-1. A ligação de anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 5C4 e 4H1 foi avaliada por incubação das células transfectadas com os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 a uma concentração de 20 µg/mL. As células foram lavadas e a ligação foi detectada com IgG Ab anti-humano marcado com FITC. Análises citométricas de fluxo foram realizadas usando citometria de fluxo FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são ilustrados nas figuras 13A (5C4) e 13B (4H1). Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 ligados às células de CHO transfectaram com PD-1 porém não com relação às células de CHO que não foram transfectadas com PD-1. Esses dados demonstram a especificidade dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 para PD-1.

Especificidade de ligação por ELISA contra outros elementos da família CD28

Uma comparação da ligação de anticorpos anti-PD-1 aos elementos da família CD28 foi realizada por ELISA padrão empregando quatro elementos diferentes da família CD28 para examinar a especificidade de ligação a PD-1.

As proteínas de fusão dos elementos da família

CD28, ICOS, CTLA-4 e CD28 (R&D Biosystems) foram testadas quanto à ligação contra anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 4A11. Os procedimentos ELISA padrão foram realizados. Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 foram adicionados a uma concentração de 20 µg/mL. Anticorpo policlonal de IgG anti-humana de cabra (específico da cadeia κ) conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) foi usado como anticorpo secundário. Os resultados são mostrados na figura 14. Cada um dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 e 5F4 se ligou com alta especificidade ao PD-1, porém não aos outros elementos da família CD28.

EXEMPLO 4: Caracterização de ligação do anticorpo anti-PD-1 ao PD-1 expresso na superfície das células humanas e de macaco

Anticorpos anti-PD-1 foram testados quanto à ligação às células expressando PD-1 em sua superfície de célula por citometria de fluxo.

Células T humanas ativadas, células mononucleares de sangue periférico de macaco (PBMC) e células CHO transfectadas com PD-1 foram testadas cada uma quanto à ligação ao anticorpo. As células T humanas e PBMC de Cynomolgus foram ativadas por anticorpo anti-CD3 para induzir expressão de PD-1 nas células T antes da ligação a um anticorpo monoclonal anti-PD-1 humano. A ligação dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 5C4 e 4H1 foi avaliada por incubação das células transfectadas tanto com IgG1 quanto IgG4 dos anticorpos monoclonais humanos anti-PD-

1 em concentrações diferentes. As células foram lavadas e a
 ligação foi detectada com uma IgG Ab anti-humana marcada com
 FITC. Análises citométricas de fluxo foram realizadas usando
 uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose,
 5 CA). Os resultados são mostrados nas figuras 15A (células T
 humana ativadas), 15B (PBMC de macaco Cynomolgus) e 15C
 (células de CHO transfectadas com PD-1). Os anticorpos
 monoclonais anti-PD-1 5C4 e 4H1 se ligam às células T
 humanas ativadas, PBMCs de macaco ativados e células CHO
 10 transfectadas com PD-1 humano, conforme medido pela
 intensidade fluorescente média (MFI) da coloração. Esses
 dados demonstram que anti-PD-1 de HuMAbs se liga a ambos PD-
 1 de superfície de célula de macaco Cynomolgus e humano.

EXEMPLO 5: Efeito de anticorpos anti-PD-1 humanos
 15 na proliferação celular e produção de citocina em uma Reação
de Linfócito Mista

Uma reação de linfócito mista foi empregada para
 demonstrar o efeito de bloqueio da via de PD-1 às células
 efectoras de linfócito. Células T no ensaio foram testadas
 20 quanto à proliferação, secreção de IFN-gama e secreção de
 IL-2 na presença ou ausência de um anticorpo anti-PD-1 de
 HuMAb.

As células T humanas foram purificadas de PBMC
 usando uma coluna de enriquecimento de célula T humana CD4+
 25 (R&D Systems). Cada cultura continha 10^5 células T
 purificadas e 10^4 células dendríticas alogênicas em um
 volume total de 200 μ L. Anticorpo monoclonal anti-PD-1 5C4,
 4H1, 17D8, 2D3 ou uma porção de fragmento Fab de 5C4 foi

adicionada a cada cultura em concentrações de anticorpo diferentes. Não foi usado anticorpo ou anticorpo de controle de isotipo como um controle negativo. As células foram cultivadas por 5 dias a 37°C. Após o dia 5, 100 µL de meio foram retirados de cada cultura para medição da citocina. Os níveis de IFN-gama e outras citocinas foram medidos usando kits OptEIA ELISA (BD Biosciences). As células foram marcadas com 3H-timidina, cultivadas por mais 18 horas e analisadas quanto à proliferação celular. Os resultados são mostrados na figuras 16A (proliferação de célula T), 16B (secreção de IFN-γ) e 16C (secreção de IL-2). Os anticorpos monoclonais humanos anti-PD-1 promoveram proliferação de célula T, secreção de IFN-gama e secreção de IL-2 em um modo dependente da concentração. O fragmento Fab de 5C4 também promoveu a proliferação da célula T, secreção de IFN-gama e secreção de IL-2 em um modo dependente da concentração. Em contraste, culturas contendo o anticorpo de controle de isotipo não mostraram um aumento na proliferação de célula T, IFN-gama ou secreção de IL-2.

20 EXEMPLO 6: Bloqueio de união de ligante ao PD-1 por anticorpos anti-PD-1 humanos

Anti-PD-1 de HuMAbs foi testado quanto à capacidade de bloquear união dos ligantes PD-L1 e PD-L2 a PD-1 expresso nas células CHO transfectadas por emprego e ensaio de citometria de fluxo.

As células de CHO expressando PD-1 foram suspensas em tampão FACs (PBS com soro bovino fetal a 4%). Várias concentrações de anti-PD-1 de HuMAbs 5C4 e 4H1 foram

adicionadas à suspensão de célula e incubadas a 4°C por 30 minutos. O anticorpo não ligado foi lavado e tanto proteína de fusão PD-L1 marcada com FITC ou proteína de fusão PD-L2 marcada com FITC foi adicionada aos tubos e incubada a 4°C por 30 minutos. Análises citométricas de fluxo foram realizadas usando um citômetro de fluxo FACScan (Bectn Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são ilustrados nas figuras 17A (bloqueio de PD-L1) e 17B (bloqueio de PD-L2). Os anticorpos monoclonais anti-PD-1 5C4 e 4H1 bloquearam a ligação de PD-L1 e PD-L2 às células CHO transfectadas com PD-1 humano, conforme medido pela intensidade fluorescente média (MFI) de coloração. Esses dados demonstram que anti-PD-1 de HuMAbs bloqueia a união do ligante (ambos PD-L1 e PD-L2) em relação ao PD-1 na superfície celular.

EXEMPLO 7: Efeito de anticorpos anti-PD-1 humanos na liberação de citocinas em sangue humano

O anti-PD-1 de HuMAbs foi misturado com sangue integral fresco humano a fim de determinar se o anti-PD-1 de HuMAbs sozinho estimulou a liberação de determinadas citocinas das células sangüíneas humanas.

500 µL de sangue integral humano fresco heparinizado foram adicionados a cada poço. Tanto 10 µg ou 100 µg de anti-PD-1 de HuMAb (4H1 ou 5C4, o último sendo um isotipo IgG1 ou IgG4) foram adicionados a cada poço. Alguns poços foram incubados com o anticorpo anti-CD3 como um controle positivo ou um anticorpo IgG1 humano ou IgG4 como controle negativos combinados com isotipo. As células foram incubadas a 37°C tanto em 6 quanto em 24 horas. As células

foram giradas e o plasma foi coletado para medição das citocinas IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 usando um ensaio de fileira de microesfera citométrica de citocina (BD Biosciences). A concentração de cada citocina (pg/mL) é mostrada nas tabelas 3a, com uma incubação de 6 horas e 3b com uma incubação de 24 horas a seguir. Os resultados mostram que o tratamento com os antibióticos de anti-PD-1 humano, 5C4 e 4H1 sozinhos não estimulou as células sangüíneas humanas a liberarem qualquer uma das citocinas IFN-gama, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12.

Tabela 3a: Produção de citocina seguindo-se incubação de 6 horas

Ab	IFN-gama (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Não Ab	12,3	2	3	5	3,6	1,9
10 mg/ml anti-CD3	5000	530	82,6	510,4	37,2	467,9
100 mg/ml anti-CD3	5000	571	91,3	530	43,9	551,5
10 mg/ml hIgC1	7	1,8	2,8	4,4	2,6	1,5
100 mg/ml hIgG1	0	2,2	2,7	6	2,6	1,4
10 mg/ml hIgG4	5,4	1,4	2,5	4,5	2,1	1,3
100 mg/ml	6,4	2,3	3	32,6	2,9	1,4

hIgG4						
10 mg/ml 4H1	6,2	1,8	2,4	4,1	2,8	1,6
100 mg/ml 4H1	11,8	2	2,6	3,5	2,6	1,7
10 mg/ml 5C4 IgG1	4,2	1,6	2,3	3,9	2,5	1,3
100 mg/ml 5C4 IgG1	0	1,4	2,2	3,6	2,1	1,2
10 mg/ml 5C4 IgG4	8,3	2,5	1,9	4,8	1,6	1,5
100 mg/ml 5C4 IgG4	3,6	1,7	2,4	3,9	2,3	1,5

Tabela 3b: Produção de citocina seguindo-se incubação de 24 horas

Ab	IFN-gama (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Não Ab	11,2	2	6,1	5,9	2,6	1,7
10 mg/ml anti-CD3	5000	565,9	432	5000	64,5	1265,3
100 mg/ml anti-CD3	5000	535	461	5000	73,8	1334,9
10 mg/ml hIgC1	0	0	0	0	0	0
100 mg/ml	11,5	1,7	7,9	60,8	2,9	1,5

hIgG1						
10 mg/ml	24,6	3,1	8,3	63,4	3,1	2,3
hIgG4						
100 mg/ml	11,2	1,8	8	27,7	3,1	2,4
hIgG4						
10 mg/ml	27,3	2,9	8	13,9	5,3	2,6
4H1						
100 mg/ml	17,5	2,5	4,4	7	4	2,1
4H1						
10 mg/ml	9,1	2	7,6	68,5	3,5	1,8
5C4 IgG1						
100 mg/ml	12,9	1,9	6,1	25,3	2,9	1,7
5C4 IgG1						
10 mg/ml	14	1,9	4,4	3,3	2,6	1,9
5C4 IgG4						
100 mg/ml	0	0	0	0	0	0
5C4 IgG4						

EXEMPLO 8: Efeito dos anticorpos anti-PD-1 na apoptose das células T

O efeito dos anticorpos anti-PD-1 na indução da apoptose das células T foi medido usando um teste de coloração com anexina V.

As células foram cultivadas em uma reação de linfócito misto, conforme descrito acima no Exemplo 5. O anticorpo anti-PD-1, 5C4, foi adicionado ao tubo a uma concentração de 25 µg/mL. Um anticorpo não específico foi usado como um controle. Anexina V e iodeto de propídio foram

adicionados de acordo com o protocolo padrão (BD Biosciences). A mistura foi incubada por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente e então analisada quanto ao uso do citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Os resultados são mostrados na figura 18. O anticorpo anti-PD-1, 5C4, não teve efeito na apoptose da célula T.

EXEMPLO 9: Efeito dos anticorpos anti-PD-1 na secreção de citocina por células PBMC estimuladas por vírus de um doador positivo de vírus

Nesse exemplo, as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de um doador positivo para CMV foram isoladas e expostas a um lisado de CMV na presença ou ausência de anticorpos anti-PD-1 para examinar o efeito dos anticorpos na secreção de citocina simulada por antígeno.

2×10^5 PMBCs humanas de um doador positivo de CMV foram cultivadas em um volume total de 200 μ L e adicionadas a cada poça juntamente com um lisado de células infectadas por CMV. Anti-PD-1 de HuMAb 5C4 foi adicionado a cada poça em várias concentrações por 4 dias. Após o quarto dia, 100 μ L de meio foram retirados de cada cultura para medição da citocina. O nível de IFN-gama foi medido usando kits OptEIA ELISA (BD Biosciences). As células foram marcadas com ^3H -timidina, cultivadas por mais 18 horas e analisadas quanto à proliferação celular. A proliferação celular foi analisada usando o reagente Cell Titer-Glo (Promega). Os resultados são mostrados na figura 19. O anti-PD-1 de HuMaB 5C4 aumentou a secreção de IFN gama em uma maneira dependente da

concentração. Esses resultados mostram que anti-PD-1 de HuMAbs pode estimular a liberação de IFN-gama em uma memória de resposta de célula T a partir de células PBMC anteriormente estimuladas contra um antígeno.

5 EXEMPLO 10: Efeito do anticorpo anti-PD-1 na
 resposta de anticorpo secundária ao antígeno

 Camundongos foram imunizados e desafiados novamente com um antígeno T1 (DNP-Ficoll) e também tratados com um anticorpo PD-1 anti-camundongo de rato, ou um
10 anticorpo de controle para examinar o efeito do anticorpo anti-PD-1 nas titulações de anticorpo.

 Fêmeas de camundongos C57BL6 foram divididas em dois grupos com 6 camundongos/grupo. Um grupo foi tratado com uma IgG de rato de controle e o outro com um anticorpo
15 PD-1 anti-camundongo de rato. Os camundongos foram imunizados com 5 µg de DNP-Ficoll (um antígeno T1) em 50 µL de CFA por i.p. no dia 0. Tanto o anticorpo da IgG do rato de controle ou o anticorpo mPD-1 de rato (200 µg/camundongo) foi fornecido por i.p. nos dias -1, 0 e 2. Quatro semanas
20 mais tarde, os camundongos foram desafiados novamente com 5 µg de DNP-Ficoll em 50 µg IFA por i.p. no dia 0. Anticorpo anti-mPD-1 de rato ou anticorpo de controle (200 µg/camundongo) foi fornecido por i.p. nos dias 0 e 1. As titulações de anticorpo foram medidas por ensaio ELISA
25 padrão no dia 7 após o reforço. Os resultados são mostrados na Tabela 4 abaixo. No camundongo tratado com o anticorpo anti-mPD-1, ambos isotipos de IgM e IgG3 mostram o maior aumento na titulação seguindo-se o desafio com o antígeno de

T1, em comparação aos camundongos tratados com um anticorpo de controle. Esses resultados demonstram que o tratamento anti-PD-1 pode aumentar as titulações de anticorpo em resposta ao antígeno T1.

- 5 Tabela 4: Resposta secundária de murino seguindo-se o tratamento com anticorpo anti-PD-1

Isotipo de Anticorpo	Grupo de Controle	Anticorpo PD-1 anti-camundongo de rato	Valor P
IgM	606	1200	0,026
IgG	9	15,55	0,18
IgG1	1,2	1,1	0,83
IgG2b	5,05	9,26	0,18
IgG3	21,9	81,2	0,03

*Os resultados mostrados são a concentração média do isotipo do anticorpo ($\mu\text{g/mL}$).

EXEMPLO 11: Tratamento do modelo tumoral *in vivo* usando anticorpos anti-PD-1

- Os camundongos implantados com um tumor cancerígeno foram tratados *in vivo* com anticorpos anti-PD-1 para examinar o efeito *in vivo* dos anticorpos no crescimento do tumor. Foi usado um anticorpo anti-CTLA-4 como um controle positivo, uma vez que tais anticorpos mostraram inibir o crescimento do tumor *in vivo*.

- 15 Nesse experimento, o anticorpo anti-PD-1 usado era um anticorpo PD-1 anti-camundongo de rato gerado usando

técnicas laboratoriais bem conhecidas. Para gerar o anticorpo anti-PD-1 de rato, os ratos foram imunizados com células de camundongo transfectadas para expressar uma proteína de fusão de PD-1 de camundongo recombinante (R&D Systems número do catálogo 1021-PD) e anticorpos monoclonais foram classificados para ligação ao antígeno PD-1 de camundongo por ensaio ELISA. As regiões V de anticorpo anti-PD-1 de rato foram então ligadas recombinantemente a uma região constante de IgG1 de murino usando técnicas de biologia molecular e reclassificados para ligação ao PD-1 de camundongo por ELISA e FACS. O anticorpo PD-1 anti-camundongo de rato quimérico usado aqui é referido como 4H2.

Para estudos de tumor, camundongos AJ fêmea entre 6-8 semanas de vida (Harlan Laboratories) foram aleatorizados por peso em 6 grupos. Os camundongos foram implantados subcutaneamente no flanco direito com 2×10^6 células de fibrosarcoma SA1/N dissolvidas em 200 μ L de meio os DMEM no dia 0. Os camundongos foram tratados com veículo PBS, ou anticorpos em 10 mg/kg. Os animais foram dosados por injeção intraperitoneal com aproximadamente 200 μ L de anticorpo contendo PBS ou veículo nos dias 1, 4, 8 e 11. Cada grupo continha 10 animais e os grupos consistiam em: i) um grupo veículo, ii) IgG de camundongo controle, iii) IgG de hamster de controle, iv) anticorpo CTLA-4 anti-camundongo de hamster e v) o anticorpo anti-PD-1 quimérico 4H2. Os camundongos foram controlados duas vezes por semana quanto ao crescimento do tumor por aproximadamente 6 semanas. Usando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos

tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor foi calculado. Os camundongos sofreram eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor (1.500 mm³) ou mostraram perda de peso superior a 15%.

5 Os resultados são mostrados na figura 20. O anticorpo anti-PD-1 se estendeu ao tempo médio para alcançar o volume de ponto final de tumor (1.500 mm³) a partir de ~25 dias nos grupos de controle até ~40 dias. Assim, o tratamento com um anticorpo anti-PD-1 tem um efeito inibidor direto *in vivo* no
10 crescimento do tumor.

EXEMPLO 12: Geração do Anticorpo Anti-PD-1 Quimérico 4H2 (Rato-Camundongo)

Os anticorpos PD-1 de camundongo contra anticorpo monoclonal de rato (anti-mPD-1 de rato) foram gerados de
15 ratos imunizados com proteína de fusão mPD-1-hFc usando métodos de produção de hibridoma padrão (vide Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495; e Harlow e Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York). Oito
20 hibridomas foram subclonados e os anticorpos foram isolados e classificados quanto a sua capacidade de bloquear a ligação de PD-L2 de camundongo (mPD-L2) ao mPD-1. Vários anticorpos anti-mPD-1 capazes de bloquear ligação de mPD-L2 ao mPD-1 foram identificados (vide, por exemplo, atividade
25 de 4H2, figura 41) e a afinidade de ligação de vários desses anticorpos à proteína de fusão mPD-1-Fc foi determinada por ELISA (figura 42).

O anticorpo 4H2.B3 foi adicionalmente

caracterizado, sendo referido intercambiavelmente aqui como "4H2". As células CHO expressando PD-1 de camundongo foram construídas e incubadas com anticorpo 4H2 anti-mPD-1 a uma concentração variando de 200 µg/mL a 0,012 µg/mL para
5 determinar a afinidade de ligação de 4H2 ao PD-1. A ligação do anticorpo anti-mPD-1 às células CHO expressando PD-1 foi detectada por incubação com IgG anti-rato de burro, conjugada com FITC e medida por FACS. O anticorpo anti-mPD-1 tinha uma EC₅₀ (concentração 50% eficaz) de cerca de 0,38 µg
10 (figura 43) e uma K_D de $4,7 \times 10^{-9}$ M. Para examinar a inibição da ligação de PD-L1 ao PD-1, o mesmo ensaio foi realizado, exceto que as células foram também incubadas com 0,16 µg de proteína e fusão mPD-L1-hFc, então ligação de PD-L1 às células CHO expressando PD-1 foi detectada por
15 incubação com IgG anti-humana de cabra (específica Fc), conjugada com FITC e medindo o sinal de ligação FACS (MFI, intensidade de fluorescência média). O anticorpo anti-mPD-1 tinha uma EC₅₀ de cerca de 0,72 µg (figura 44).

Para uso nos modelos de tumor de camundongo, anti-
20 mPD-1 de rato 4H2 precisou ser modificado de modo que o sistema imune do camundongo não neutralizasse o anticorpo imunoterapêutico (isto é, de modo que o anticorpo tivesse farmacocinéticas melhores) e evitasse a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) por redução das
25 interações do receptor Fc (isto é, assim bloqueio por anti-PD-1 seria avaliado como sendo comprometido por efeitos ADCC). O anticorpo anti-mPD-1 de rato original, 4H2, foi determinado como sendo um isotipo IgG2a de rato.

Conseqüentemente, a porção Fc do anticorpo 4H2 foi substituída por uma porção Fc de um isotipo IgG1 de camundongo. Usando o ensaio descrito acima, foi verificado que a afinidade de ligação de 4H2 quimérico de camundongo de rato a mPD-1 era comparável a do anticorpo anti-mPD-1 de 4H2.B3 de rato (figura 45). De modo semelhante, a inibição da ligação de PD-L1 para PD-1 era comparável a ambos anticorpos (figura 46). Assim, o anticorpo anti-mPD-1 4H2 quimérico de camundongo de rato foi usado para examinar a eficácia terapêutica de anti-PD-1 em combinação com anti-CTLA-4.

EXEMPLO 13: Eficácia *In vivo* da Terapia de Combinação (Anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-1) no Estabelecimento e Crescimento do Tumor

Células cancerígenas coloretais MC38 (PD-L1⁺) (disponíveis na Dr. N. Restifo, National Cancer Institute, Bethesda, MD; ou Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD) foram implantadas em camundongos C57BL/6 (2×10^6 células/camundongo). No dia 0 (isto é, no dia em que as células MC38 foram implantadas nos camundongos), cada um dos quatro grupos de 10 camundongos recebeu injeção intraperitoneal (IP) com um dos que se seguem: 1) IgG de camundongo (controle), 2) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (CTLA-4 anticamundongo de camundongo, obtida a J. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY), 3) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (anticorpo quimérico onde PD-1 anti-camundongo de rato foi modificado com uma região Fc de camundongo,

conforme descrito no Exemplo 6) ou 4) anticorpo anti-CTLA-4, 9 D9 e anticorpo anti-PD-1, 4H2. As injeções de anticorpos foram então administradas adicionalmente nos dias 3, 6 e 10. Os tratamentos com anticorpo simples foram dosados a 10 mg/kg e a combinação de anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1 foi dosada a 5 mg/kg de cada anticorpo (isto é, 10 mg/kg de anticorpo total). Usando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor foi calculado. Os camundongos sofreram eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor. Os resultados são mostrados na Tabela 5 e figura 21.

Tabela 5: Porcentagem de Camundongos Sem Tumor Seguindo Tratamento com Anti-PD-1 e/ou anti-CTA-4

Tratamento	Total de camundongos estudados	Camundongos sem tumor (%)
mIgG1	10	0
Anti-CTLA-4	10	1 (10)
Anti-PD-1	10	3 (30)
Anti-CTLA-4 + anti-PD-1	10	6 (60)

Oito camundongos no grupo IgG alcançaram o ponto final de tumor por volta do 30° dia e dois camundongos (86066 e 87260) no grupo IgG tiveram tumores ulcerados (figura 21A). No grupo de anticorpo anti-CTLA-4 sozinho, sete camundongos alcançaram o ponto final do tumor por volta do 60° dia, um camundongo teve um tumor ulcerado (84952), um

camundongo teve um tumor com um volume inferior a 1.500 mm^3 (85246) e um camundongo não teve tumor (86057) (figura 21B). No grupo de anticorpo anti-PD-1 sozinho, seis camundongos alcançaram o ponto final de tumor por volta do 60º dia, um
5 camundongo teve um tumor ulcerado (86055) e três camundongos não apresentaram tumor (84955, 85239 e 86750) (figura 21C). No grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1, quatro camundongos alcançaram o ponto final do tumor por volta do 40º dia e seis não apresentaram tumor
10 (84596, 85240, 86056, 86071, 86082 e 86761) (Figura 21D).

A figura 22 mostra que o volume médio do tumor medido no dia 21 era de cerca de 2.955 mm^3 para o grupo de controle de IgG; cerca de 655 mm^3 para o grupo de anticorpo CTLA-4 sozinho, cerca de 510 mm^3 para o grupo do anticorpo PD-1 sozinho e cerca de 280 mm^3 para o grupo de combinação
15 do anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1. A figura 23 mostra que o volume médio de tumor medido no dia 21 era de cerca de 2.715 mm^3 para o grupo IgG; cerca de 625 mm^3 para o grupo de anticorpo CTLA-4 sozinho; cerca de 525 mm^3 para o
20 grupo de anticorpo PD-1 sozinho; e cerca de 10 mm^3 para o grupo de combinação de anticorpo CTLA-4 e PD-1 (e para baixo para 0 mm^3 no dia 32).

Esse estudo indica que, no modelo de tumor de murino, o tratamento com anticorpo CTLA-4 sozinho e
25 tratamento com anticorpo PD-1 sozinho teve um efeito modesto no crescimento do tumor e que o tratamento de combinação de anticorpo CTLA-4 e PD-1 teve um efeito significativamente maior no crescimento do tumor. É interessante observar que o

tratamento de combinação com anticorpo CTLA-4 e anticorpo PD-1 teve um efeitos mais significativo no crescimento do tumor em uma dose de 5 mg/kg de cada anticorpo, em comparação ao efeito de cada anticorpo sozinho, quando cada um é administrado em uma dose maior de 10 mg/kg.

EXEMPLO 14: Eficácia In vivo da Terapia de Combinação (Anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-1) no Crescimento do Tumor Estabilizado

Células cancerígenas coloretais MC38 (PD-L1⁻) foram implantadas em camundongos C57BL/6 (2 x 10⁶ células/camundongo) por um tempo suficiente (cerca de 6 a 7 dias) para permitir a formação dos tumores. No dia 6 após o implante (dia-1), as medições do tumor foram realizadas e os camundongos classificados aleatoriamente, com base no volume médio do tumor (cerca de 250 mm³), em 11 grupos para terapia subsequente com anticorpo. No dia 0 (isto é, uma semana após as células MC38 terem sido implantadas), os camundongos receberam injeção IP com: 1) IgG de camundongo (controle), 2) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9, 3) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2, ou 4) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 e anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2, a uma concentração de 10 mg/kg por camundongo. As injeções de anticorpos foram também administradas adicionalmente nos dias 3, 6 e 10. As composições de anticorpo monoclonal usadas tinham níveis baixos de endotoxina e não agregaram significativamente. Usando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor foi calculado. As

medições foram realizadas no dia 0 (tumores no começo do tratamento tinham um volume de cerca de 125 mm^3) e nos dias 3, 6, 10, 13, 17 e 20 após injeção de anticorpo. Os camundongos sofreram eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor (um volume de tumor específico, tal como, de 1.500 mm^3 e/ou quando os camundongos mostraram perda de peso maior a cerca de 15%).

Todos onze camundongos no grupo IgG alcançaram o ponto final de tumor por volta do 17° (figura 24A). No grupo de anticorpo anti-CTLA-4 sozinho, sete dos onze camundongos alcançaram o ponto final do tumor por volta do 12° dia (figura 24B). No grupo de anticorpo anti-PD-1 sozinho, quatro camundongos alcançaram o ponto final de tumor por volta do 13° dia e dois camundongos não apresentaram tumor (figura 24C). No grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1, um camundongo alcançou o ponto final do tumor por volta do 45° dia e nove camundongos não apresentaram tumor por volta do dia 45 (figura 24D).

A figura 25 mostra que o volume médio do tumor medido no dia 10 era de cerca de 1.485 mm^3 para o grupo de controle de IgG; cerca de 1010 mm^3 para o grupo de anticorpo CTLA-4 sozinho, cerca de 695 mm^3 para o grupo do anticorpo PD-1 sozinho e cerca de 80 mm^3 para o grupo de combinação do anticorpo anti-CTLA-4 e anticorpo anti-PD-1. A figura 26 mostra que o volume médio de tumor medido no dia 10 era de cerca de 1.365 mm^3 para o grupo IgG; cerca de 1060 mm^3 para o grupo de anticorpo CTLA-4 sozinho; cerca de 480 mm^3 para o grupo de anticorpo PD-1 sozinho; e cerca de 15 mm^3 para o

grupo de combinação de anticorpo CTLA-4 e PD-1 (que estava abaixo de 0 mm³ no dia 17).

Esse estudo indica que, em um modelo de tumor de murino, o tratamento com a combinação do anticorpo CTLA-4 com anticorpo PD-1 teve um efeito significativamente maior no crescimento do tumor em relação a cada anticorpo sozinho, mesmo quando o tumor já estava bem estabelecido.

EXEMPLO 15: Titulação de Dose da Terapia de Combinação (Anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-1) no

10 Crescimento do Tumor Estabelecido

Células cancerígenas coloretais MC38 (PD-L1⁺) foram implantadas em camundongos C57BL/6 (2 x 10⁶ células/camundongo) por um tempo suficiente (cerca de 6 a 7 dias) para permitir a formação dos tumores, conforme descrito no Exemplo 3. Grupos de 10 camundongos receberam injeções IP nos dias 0, 3, 6 e 10 como se segue: Grupo (A) IgG de camundongo (controle, 20 mg/kg), Grupo (B) anticorpo monoclonal de anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg) e IgG de camundongo (10 mg/kg), Grupo (C) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (10 mg/kg) e IgG de camundongo (10 mg/kg), Grupo (D) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (10 mg/kg) e anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg), Grupo (E) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (3 mg/kg) e anticorpo monoclonal anti-PD-1 (3 mg/kg) ou Grupo (F) anticorpo monoclonal anti-CLTA-4, 9D9 (1 mg/kg) e anticorpo monoclonal anti-PD-1 (1 mg/kg). Usando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor foi calculado. As medições foram

realizadas no começo do tratamento (isto é, no dia 0 os tumores tinham um volume médio de cerca de 90 mm^3) e nos dias 3, 6, 10, 13, 17 e 20 após tratamento com anticorpo. Os camundongos sofreram eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor (um volume de tumor específico, tal como, de 1.500 mm^3 e/ou quando os camundongos mostraram perda de peso maior a cerca de 15%).

A figura 27A mostra que todos os 10 camundongos de controle alcançaram um ponto final de tumor. A figura 27B mostra que o grupo tratado com 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 (Grupo B) tinha 6 camundongos que alcançaram o ponto final do tumor e 4 camundongos tinham um volume de cerca de 750 mm^3 ou menos. A figura 27C mostra que o grupo tratado com 10 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo C) teve 3 camundongos que alcançaram o ponto final do tumor e 7 camundongos com tumores possuindo um volume de cerca de 1.000 mm^3 ou menos. A figura 27D mostra que o grupo tratado com uma combinação de 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 10 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo D) teve 2 camundongos com tumores possuindo um volume de cerca de 1.000 mm^3 ou menos e 8 camundongos que não apresentaram tumor. A figura 27E mostra que o grupo tratado com uma combinação de 3 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 3 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo E) teve um camundongo que alcançou o ponto final do tumor, 7 camundongos com tumor possuindo um valor de cerca de 500 mm^3 ou menos e 2 camundongos que não apresentaram tumor. A figura 27F mostra que o grupo tratado com uma combinação de 1 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 1 mg/kg de

anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo F) teve 4 camundongos que haviam alcançado o ponto final do tumor, 5 camundongos com tumores possuindo um volume de 1.100 mm^3 e um camundongo que não apresentou tumor.

5 As figuras 27G e 27H mostram os volumes de tumor em camundongos tratados seqüencialmente com anticorpo anti-PD-1 primeiro e anticorpo anti-CTLA-4 em segundo lugar, e vice versa. Os camundongos da figura 27G receberam primeiro 10 mg/kg de anti-CTLA-4 em cada um dos dias 0 e 3, e então
10 receberam 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 em cada um dos dias 6 e 10. Os camundongos da figura 27H receberam primeiro 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 em cada um dos dias 0 e 3, e então receberam 10 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 em cada um dos dias 6 e 10. Para o grupo G no dia 27, 8 camundongos
15 alcançaram o ponto final do tumor, um camundongo teve um tumor muito pequeno (que, após um retardo significativo, eventualmente cresceu) e um camundongo não apresentou tumor. Para o grupo H no dia 27, 8 camundongos alcançaram o ponto final do tumor e 2 não apresentaram tumor.

20 A figura 28 mostra que o volume médio de tumor medido no dia 10 foi de cerca de 1.250 mm^3 para o grupo de controle de IgG; cerca de 470 mm^3 para o anticorpo PD-1 com o controle de IgG; cerca de 290 mm^3 para o anticorpo CTLA-4 com o controle de IgG (medido no dia 6); cerca de 40 mm^3
25 para o grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg) e anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg); cerca de 165 mm^3 para o grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 (3 mg/kg) e anticorpo anti-PD-1 (3 mg/kg); e cerca de 400 mm^3

para o grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 (1 mg/kg) e anticorpo anti-PD-1 (1 mg/kg). A figura 29 mostra que o volume médio do tumor medido no dia 13 foi cerca de 1.680 mm³ para o grupo de controle de IgG; cerca de 400 mm³ para o anticorpo PD-1 com o controle IgG; cerca de 660 mm³ para o anticorpo CTLA-4 com o controle IgG; 0 mm³ para o grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 (10 mg/kg) e anticorpo anti-PD-1 (10 mg/kg); cerca de 90 mm³ para o grupo de combinação de anticorpo anti-CTLA-4 (3 mg/kg) e anticorpo anti-PD-1 (3 mg/kg); e cerca de 650 mm³ para o grupo de combinação anticorpo anti-CTLA-4 (1 mg/kg) e anticorpo anti-PD-1 (1 mg/kg). Para o tratamento de combinação do anticorpo anti-PD-1 com o anticorpo anti-CTLA-4, o número de camundongos por grupo que não apresentaram tumor no dia 27 do estudo foi de 8/10 (10 mg/kg), 2/10 (3 mg/kg) e 1/10 (1 mg/kg) (dados não mostrados).

Esse estudo indica que, no modelo de tumor de murino, o tratamento com a combinação de anticorpo CTLA-4 e anticorpo PD-1 funciona em uma maneira dependente de dose e possui efeito significativamente maior o crescimento do tumor que ambos os anticorpos sozinhos, mesmo em uma dose menor e mesmo quando um tumor já está bem estabelecido. Além disso, os anticorpos podem ser administrados seqüencialmente (anticorpo anti-CTLA-4 primeiro e anticorpo anti-PD-1 em segundo lugar, ou vice versa) e a combinação ainda é superior às monoterapias com anticorpo.

EXEMPLO 16: Eficácia In vivo da Terapia de Combinação (Anticorpos Anti-CTLA-4 e Anti-PD-1) no

Estabelecimento e Crescimento do Fibrosarcoma

Células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁺) (Leach e outros (1996) *Science* 271:1734-1736) foram implantadas subcutaneamente em camundongos A/J (2 x 10⁶ células/camundongo) no dia 0. Nos dias 1, 4, 7 e 11 após implantação, os camundongos receberam injeção IP como se segue: Grupo a) PBS sozinha (referida como o "veículo"); Grupos b) IgG de camundongo (controle, 10 mg/kg por camundongo), Grupo c) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg por camundongo), Grupo d) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (10 mg/kg ou 0,2 mg/kg por camundongo), e Grupo e) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg por camundongo) em combinação com anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (0,2 mg/kg por camundongo). O volume do tumor foi calculado por medição tridimensional dos tumores (altura x largura x comprimento) usando um calibrador eletrônico. Os camundongos sofreram eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor, um volume de 1.500 mm³ e/ou um tumor ulcerado.

As figuras 30A e 30B mostram que 19 dos 20 camundongos de controle (9/10 no Grupo A e 10/10 no Grupo B) tinham alcançado um ponto final de tumor ou haviam desenvolvido tumores ulcerados. A figura 30C mostra que o grupo tratado com 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 (Grupo C) tinha 6 camundongos que alcançaram um ponto final de tumor (2 com um volume superior a 1.500 mm³ e 4 com um tumor ulcerado) e 4 camundongos que não apresentaram tumores. A figura 30D mostra que o grupo tratado com 10 mg/kg de

anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo D) teve 5 camundongos que alcançaram um ponto final de tumor (2 com um volume superior a 1.500 mm³ e 3 com um tumor ulcerado), um camundongo com um tumor menor (volume de cerca de 70 mm³) e 4 camundongos que não apresentaram tumor. A figura 30E mostra que o grupo tratado com 0,2 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo E) tinha 10 camundongos que alcançaram um ponto final de tumor (6 com um volume superior a 1.500 mm³ e 4 com um tumor ulcerado). A figura 30F mostra que o grupo tratado com uma combinação de 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 0,2 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo F) tinha 2 camundongos que alcançaram um ponto final de tumor (um com um volume superior a 1.500 mm³ e um com um tumor ulcerado) e 8 camundongos que não apresentaram tumor.

As figuras 31 e 32 mostram que a média e volume médio de tumor, respectivamente, que se desenvolveram em camundongos tratados e não tratados no curso desse estudo. A inibição do crescimento do tumor em camundongos tratados com esses anticorpos, em comparação aos camundongos tratados com IgG de camundongo de anticorpo de controle é resumida na Tabela 6.

Tabela 6: Inibição do Crescimento do Tumor e Camundongos que não Apresentaram Tumor Seguindo-se Tratamento com Anti-PD-1 e/ou Anti-CTLA-4

Grupo [†]	volume médio do tumor - mm ³ (dia 15)	TGI* (%) (dia 15)	volume médio do tumor - mm ³ (dia 19)	TGI (%) (dia 19)	Número de Camundongos que não apresentaram tumor (dia 41)
A	985	-	1140	-	0/10
B	635	-	1060	-	0/10
C	465	27	310	71	4/10
D	235	63	90	91	4/10
E	600	6	805	24	0/10
F	330	48	90	92	8/10

* TGI = inibição do crescimento do tumor; a média seria calculada apenas quando cerca de 50% dos camundongos alcançassem o ponto final de tumor.

[†] Os grupos são conforme definidos na figura 30. A = veículo (PBS); B = IgG de camundongo; C = anti-PD-1, 10 mg/kg; D = anti-CTLA-4, 10 mg/kg; E = anti-CTLA-4, 0,2 mg/kg; e F = anti-PD-1, 10 mg/kg com anti-CTLA-4, 0,2 mg/kg.

Esses dados indicam adicionalmente que a terapia
5 de combinação compreendendo anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 é substancialmente mais eficaz que o tratamento com cada anticorpo sozinho. Na realidade, a combinação ainda é mais eficaz que os tratamentos com anticorpo sozinho mesmo

quando a terapia de combinação contém uma dose subterapêutica de anticorpo anti-CTLA-4. Esses dados também indicam surpreendentemente que a presença ou ausência de PD-L1 no tumor pode não ter efeito na eficácia do tratamento com essa combinação de anticorpos, embora a presença de PD-L1 possa influenciar o efeito das monoterapias de anticorpo, pelo que a expressão de PD-L1 no tumor pode também conduzir a inibição das respostas da célula T antitumor (vide figura 40).

10 EXEMPLO 17: Eficácia *In vivo* e Titulação da Dose da Terapia de Combinação (Anticorpos anti-CTLA-4 e Anti-PD-1) no Crescimento do Fibrosarcoma PD-L1⁻

Células de fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁻) foram implantadas subcutaneamente em camundongos A/J (2 x 10⁶ células/camundongo) no dia 0 por um período tempo suficiente (cerca de 7 dias) para permitir o estabelecimento do tumor. Nos dias 7, 10, 13 e 16 após implantação, dez grupos de 8 camundongos possuindo um volume médio de tumor de 110 mm³ receberam injeção IP como se segue: Grupo a) PBS sozinha (referida como o "veículo"); Grupo b) IgG de camundongo (controle, 10 mg/kg por camundongo); Grupo c) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (0,25 mg/kg); Grupo d) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (0,5 mg/kg por camundongo); Grupo e) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (5 mg/kg); Grupo f) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (3 mg/kg por camundongo); Grupo (G) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg por camundongo); Grupo (H) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg por camundongo) em combinação com

anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (0,25 mg/kg por camundongo); Grupo (I) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg por camundongo) em combinação com anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (0,5 mg/kg por camundongo); e
 5 Grupo (J) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (3 mg/kg por camundongo) em combinação com anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (0,5 mg/kg por camundongo).

Nos dias 10, 13, 16 e 19 após implantação, dois grupos de 6 camundongos possuindo um volume médio de tumor
 10 de 255 mm³ receberam injeção IP como se segue: Grupo (K) IgG de camundongo (controle, 10 mg/kg por camundongo); e Grupo (L) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 (10 mg/kg por camundongo) em combinação com anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 (1 mg/kg por camundongo). O estudo foi realizado
 15 por 51 dias e as medições do tumor foram realizadas em vários dias através de todo o curso do estudo (vide figuras 33-38). O volume do tumor foi calculado por medição tridimensional dos tumores (altura x largura x comprimento) usando um calibrador eletrônico. Os camundongos sofreram
 20 eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor, um volume de 1.500 mm³ e/ou um tumor ulcerado.

A figura 33 mostra a resposta ao tratamento imunoestimulador com anticorpo em camundongos com tumores possuindo um volume inicial de cerca de 110 mm³ (isto é, na
 25 época do primeiro tratamento com anticorpo). As figuras 33A e 33B mostram que todos os 16 camundongos de controle (Grupos A e B) alcançaram um ponto final de tumor (15 com um volume de tumor superior a 1.500 mm³ e 1 com um tumor

ulcerado). As figuras 33C-33E mostram que o camundongo portanto tumor responde ao tratamento com anticorpo anti-CTLA-4 em uma maneira dependente da dose (por exemplo, Grupo C recebendo 0,25 mg/kg tinha 7/8 camundongos que alcançaram o ponto final de tumor e um camundongo com um volume de tumor inferior a 200 mm³, considerando-se que o Grupo E que recebeu 5 mg/kg tinha 6/8 camundongos que alcançaram o ponto final de tumor e dois camundongos que não apresentaram tumor). As figuras 33F e 33G mostram que os camundongos responderam de forma igual da dosagem de anticorpo anti-PD-1 (Grupo F recebeu 3 mg/kg e Grupo G recebeu 10 mg/kg). Em contraste, os camundongos recebendo um tratamento de combinação contendo 10 ou 3 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 0,25 ou 0,5 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupos H, I e J) mostraram uma redução significativa no crescimento do tumor. Por exemplo, a figura 33J mostra que o grupo tratado com uma combinação de 3 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 0,5 mg/kg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo J) possui 2 camundongos que possuíam tumores ulcerados, 2 camundongos com um volume de tumor inferior a 500 mm³ e 4 camundongos que não apresentaram tumor. O efeito sinérgico inesperado de um anticorpo anti-PD-1 combinado com um anticorpo anti-CTLA-4, juntamente com a eficácia surpreendente dos níveis subterapêuticos do anticorpo anti-CTLA-4 em combinação, são mostrados nas figuras 34 (volume médio de tumor) e 35 (volume médio numérico de tumor).

A figura 36 mostra a resposta ao tratamento imunoestimulador com anticorpo em camundongos com tumores

maiores, aqueles possuindo um volume inicial de cerca de 250 mm³ (isto é, à época do primeiro tratamento com anticorpo). A figura 36A mostra que todos os 6 camundongos de controle (Grupo K) alcançaram um ponto final de tumor (4 com um volume de tumor superior a 1.500 mm³ e 2 com um tumor ulcerado). A figura 36B mostra que o grupo tratado com uma combinação de 10 mg/kg de anticorpo anti-PD-1 com 1 mg de anticorpo anti-CTLA-4 (Grupo L) tinha um camundongo com um tumor ulcerado, 4 camundongos com um volume de tumor superior a 1.500 mm³ e um camundongo não apresentou tumor. Os volumes de tumor médio e médio numérico são mostrados nas figuras 37 e 38.

A inibição do crescimento do tumor em camundongos tratados com esses anticorpos, em comparação aos camundongos tratados com a IgG de camundongo de anticorpo de controle é resumida na Tabela 7 e figura 39.

Tabela 7: Inibição do Crescimento do Tumor Seguindo-se Tratamento com Anti-PD-1 e/ou Anti-CTLA-4

Grupo	volume médio do tumor - mm ³ (dia 23)	TGI* (média)	volume médio do tumor - mm ³ (dia 23)	TGI (média)	Camundongos que não apresentaram tumor (dia 51)	Nº de camundongos no ponto final de tumor
A	700	-	1.380	-	-	-
B	1.710	-	1.360	-	-	-
C	1.050	39%	925	32	-	-
D	770	55%	505	63	-	-

E	155	91%	100	93	2/8	6/8
F	1.050	39%	675	50	-	7/8
G	1.070	37%	1.145	16	-	6/8
H	85	95%	25	98	4/8	3/8
I	75	96%	60	95	4/8	1/8
J	80	95%	5	99	4/8	0/8
K	1.900	-	2.125	-	-	-
L	1.115	41	1.090	49	1/6	-

* TGI = inibição do crescimento do tumor; a média seria calculada apenas quando cerca de 50% dos camundongos alcançassem o ponto final de tumor.

† Os grupos são conforme definidos nas figuras 33 e 36. Para o tumor inicial menor: A = veículo (PBS); B = IgG de camundongo, 10 mg/kg; C = anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg; D = anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg; E = anti-CTLA-4, 5 mg/kg; F = anti-PD-1, 3 mg/kg; G = anti-PD-1, 10 mg/kg; H = anti-PD-1, 10 mg/kg com anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg; I = anti-PD-1, 10 mg/kg com anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg; e J = anti-PD-1, 3 mg/kg com anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg. Para tumor inicial maior: K = IgG de camundongo, 10 mg/kg; e L = anti-PD-1, 10 mg/kg com anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg.

Em conjunto esses dados indicam que a terapia de combinação compreendendo anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 é substancialmente mais eficaz que o tratamento com os anticorpos separadamente. Além disso, surpreendentemente, a dose de cada anticorpo pode ser reduzida sem afetar a eficácia sinérgica dessa combinação de anticorpos imunoestimuladores terapêuticos. A terapia de combinação parece ser eficaz mesmo quando a massa de tumor está mais madura (isto é, maior).

EXEMPLO 18: Imunidade ao Tumor em Camundongos
Seguindo-se o Tratamento com Anticorpo Anti-PD-1 e Novo
Desafio com Células de Fibrosarcoma PD-L1⁻

Os camundongos que sobreviveram não apresentando
5 tumor de um desafio com células tumorais e tratamento com
anticorpo anti-PD-1 (isto é, tratamento semelhante aos
estudos de eficácia descritos nos Exemplos 5 e 6) foram
então desafiados novamente com células tumorais para
investigar imunidade à formação de tumor após tal
10 tratamento. Em resumo, no desafio inicial, células de
fibrosarcoma SA1/N (PD-L1⁻) foram implantadas
subcutaneamente em camundongos A/J (1 x 10⁶ células/
camundongo). Nos dias 1, 4, 7, 10, 14, 17 e 20 após
implantação, grupos de camundongos receberam injeção IP
15 tanto com IgG de camundongo (controle, 10 mg/kg por
camundongo) ou com uma das várias doses de anticorpo
monoclonal anti-PD-1, 4H2 (30, 10, 3, 1 e 0,3 mg/kg por
camundongo). A formação e o volume do tumor foram
monitorados com um calibrador eletrônico de precisão, duas
20 vezes por semana, até o estudo estar completo. Um grupo de 8
camundongos não apresentaram tumor após tratamento com
anticorpo anti-PD-1 (4 que haviam sido tratados com 30
mg/kg, 2 com 3 mg/kg, um com 1 mg/kg e um com 0,3 mg/kg).

Os oito camundongos A/J tratados que não
25 apresentaram tumor foram desafiados novamente por
implantação subcutânea de 1 x 10⁶ SA1/N células de
fibrosarcoma/camundongo. Como um controle, nove camundongos
não previamente desafiados ou tratados foram subcutaneamente

implantados com 1×10^6 SA1/N células de fibrosarcoma/camundongo. A formação e volume de tumor foram monitorados com um calibrador eletrônico de precisão duas vezes por semana até o dia 62 após implantação. Todos os nove camundongos não previamente desafiados ou tratados (controle) alcançaram o ponto final de tumor por volta do dia 22 após a implantação das células de fibrosarcoma. Em contraste, os oito camundongos que não apresentaram tumor desafiados novamente com células de fibrosarcoma não desenvolveram tumores até 62 dias após implantação. A figura 47 mostra o volume médio do tumor para camundongos não previamente desafiados ou tratados e camundongos desafiados novamente. Esses resultados demonstram que o tratamento com um anticorpo imunoestimulador, tal como, anti-PD-1, fornece ao indivíduo tratado a imunidade para formação adicional de tumor, mesmo na presença de células capazes de formarem um tumor.

EXEMPLO 19: Imunidade ao Tumor em Camundongos Seguindo-se Terapia com Anticorpo Simples (anti-PD-1) ou Terapia de Anticorpo de Combinação (Anti-CTLA-4 e Anti-PD-1) Desafiados Novamente com Células Cancerígenas Coloretais PD-L1⁺

Os camundongos que sobreviveram sem apresentarem tumor de um desafio com células tumorais e tratamento com anticorpo anti-PD-1 sozinho ou anticorpo anti-PD-1 combinado com anticorpo anti-CTLA-4 (isto é, tratamento semelhante aos estudos de eficácia descritos nos Exemplos 2-4) foram então desafiados novamente com células tumorais para investigar a

imunidade à formação do tumor após tais tratamentos. Em resumo, no desafio inicial, células cancerígenas coloreticais MC38 (PD-L1⁺) foram implantadas nos camundongos C57BL/6 (2×10^6 células/camundongo) no dia 0. Nos dias 0, 3, 6 e 10 após
5 implantação, os grupos de camundongos receberam injeção IP com um dos seguintes tratamentos: 1) IgG de camundongo (controle, 10 mg/kg por camundongo), 2) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 ou 3) combinação de anticorpo monoclonal PD-1, 4H2 e anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9. O
10 crescimento do tumor foi monitorado com um calibrador eletrônico de precisão, conforme descrito no Exemplo 15. Onze camundongos de um grupo não apresentaram tumor após tratamento com anticorpo anti-PD-1 (2 total) ou a combinação de tratamento de combinação com anticorpo anti-PD-1/anti-
15 CTLA-4 (9 total).

Os onze camundongos C57BL/6 tratados e que não apresentaram tumor foram desafiados novamente por implantação de 2×10^7 células cancerígenas MC38 coloreticais/camundongo (isto é, uma dose de células 10 vezes
20 maior que o desafio inicial). Foram usados como controle, sete camundongos não previamente desafiados ou tratados com 2×10^7 células cancerígenas MC38 coloreticais/camundongo. A formação e volume do tumor foram monitorados com um calibrador eletrônico de precisão pela duração do
25 experimento de novo desafio (pelo menos 20 dias). A figura 48 mostra que todos os sete camundongos não previamente desafiados ou tratados (controle) desenvolveram um tumor e alcançaram o ponto final de tumor por volta do dia 18 após

implantação das células cancerígenas coloretais. Em contraste, todos os onze camundongos que não apresentaram tumor e desafiados novamente com células cancerígenas coloretais não desenvolveram tumores até 18 dias após
 5 implantação. A figura 49 mostra o volume médio de tumor para os camundongos não previamente desafiados ou tratados e os camundongos desafiados novamente. Esses dados indicam que, semelhante à monoterapia com anticorpo, a terapia de combinação de anticorpos resultando em bloqueio com PD-1 e
 10 CTLA-4 produz uma imunidade persistente a reincidência do tumor.

EXEMPLO 20: Eficácia *In vivo* da Terapia de Combinação (Anticorpos anti-CTLA-4 e Anti-PD-1) no Crescimento de Tumores Estabelecidos

15 Células cancerígenas coloretais CT26 foram implantadas em camundongos BALB/C (2×10^6 células/camundongo) por um período suficiente (cerca de 10 dias) para permitir a formação dos tumores. No dia 10 após
 20 implantação, as medições do tumor foram realizadas e os camundongos foram classificados aleatoriamente em 5 grupos, com base no volume médio do tumor (cerca de 250 mm³) para terapia subsequente com anticorpo. No dia 0 (isto é, 10 dias após as células CT26 terem sido implantadas), os camundongos receberam injeção IP com 1) IgG do camundongo (controle), 2)
 25 anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9, 3) anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 ou 4) anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, 9D9 e anticorpo monoclonal anti-PD-1, 4H2 em uma concentração de 10 mg/kg por camundongo. As injeções de

anticorpo foram também administradas nos dias 3, 6 e 10. As composições de anticorpo monoclonais usadas tinham níveis baixos de endotoxina e não agregaram significativamente. Empregando um calibrador eletrônico, os tumores foram medidos tridimensionalmente (altura x largura x comprimento) e o volume do tumor foi calculado. As medições de tumor foram realizadas no dia 0 (tumores no começo do tratamento tinham um volume de cerca de 125 mm^3) e nos dias 3, 6, 10, 13, 17 e 20 após injeção de anticorpo. Os camundongos sofreram eutanásia quando os tumores alcançaram o ponto final do tumor (um volume de tumor específico, tal como, 1.500 mm^3 e/ou quando os camundongos mostraram perda de peso superior a 15%). Os resultados são mostrados na figura 50. Esse estudo indica que, no modelo de tumor de murino, o tratamento com anticorpo CTLA-4 sozinho e tratamento com anticorpo PD-1 sozinho teve um efeito significativamente maior no crescimento do tumor que o anticorpo sozinho, mesmo quando o tumor já está bem estabelecido.

EXEMPLO 21: Efeito do Anticorpo Anti-PD-1 Humano na Função das Células Reguladoras T

As células reguladoras T são linfócitos que suprimem a resposta imune. Nesse exemplo, as células reguladoras T foram testadas quanto a sua função inibidora na proliferação a secreção de IFN-gama das células T CD4+CD25-, na presença ou ausência de um anticorpo monoclonal humano anti-PD-1.

As células reguladoras T foram purificadas de PBMC usando um kit de isolamento de célula T regulador CD4+CD25+

(Miltenyi Biotec). As células reguladoras T foram adicionadas a uma reação de linfócito misto (vide acima) contendo células T CD4+CD25- purificadas e células dendríticas alogênicas em uma razão 2:1 de CD4+CD25- para células reguladoras T. O anticorpo monoclonal anti-PD-1, 5C4 foi adicionado a uma concentração de 10 µg/mL. Nenhum anticorpo ou um anticorpo de controle de isotipo foi usado como um controle negativo. Os sobrenadantes da cultura foram colhidos no dia 5 para medição da citocina usando um sistema de detecção de citocina Beadlyte (Upstate). As células foram marcadas com ³H-timidina, cultivadas por mais 18 horas e analisadas quanto à proliferação celular. Os resultados são mostrados nas figuras 51A (proliferação de célula T) e 51B (secreção de IFN-gama). A adição do anticorpo monoclonal humano anti-PD-1, 5C4 liberou parcialmente a inibição imposta pelas células Treg na proliferação e secreção de IFN-gama das células T CD4+CD25-, indicando que os anticorpos anti-PD-1 tinham um efeito nas células reguladoras T.

20 EXEMPLO 22: Efeito de Anticorpo Anti-PD-1 Humano na Ativação da Célula T

Nesse exemplo, foi examinado o efeito do bloqueio da via PD-1 pelo anticorpo anti-PD-1, 5C4 na ativação da célula T. Células T CD4+ humanas, purificadas (kit de purificação de célula T CD4 Dynal) foram ativadas com 1 µg/mL de anticorpo anti-CD3 solúvel (BD) na presença de monócitos autólogos ou células dendríticas derivadas de monócito (DCs). Os monócitos foram purificados usando kit de

purificação de monócito CD14 Miltenyi e DCs foram geradas *in vitro* após cultivo dos monócitos com GM-CSF e IL-4 (PeproTech) por 7 dias. Após três dias de ativação na presença ou ausência de anticorpo anti-PD-1 titulado ou controle mAb de isotipo irrelevante, os sobrenadantes da cultura foram colhidos por análise ELISA de secreção IFN γ , enquanto timidina tritiada foi adicionada durante as 18 horas finais do ensaio a fim de medir a proliferação da célula T. Os resultados mostrados nas figuras 52A e 53B demonstram que o bloqueio de PD-1 pelo anticorpo anti-PD1 resultou em proliferação de célula T melhorada e secreção de IFN- γ . Foi também observado que o efeito sinérgico pelo anticorpo anti-PD-1 e anticorpo anti-CTLA-4 na ativação da célula T (especificamente na secreção IFN- γ) na presença de monócitos.

EXEMPLO 23: Avaliação da Atividade de ADCC do Anticorpo Anti-PD-1

Nesse exemplo, um ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) foi realizado para avaliar se o anticorpo anti-PD-1 induziria ADCC nas células alvo. Duas versões de 5C4, uma com uma região Fc de IgG1 humana (5C4-IgG1) e a outra com a região Fc da IgG4 humana (5C4-IgG4), foram testadas no ensaio. O kit de Citotoxicidade de Célula Delfia da Perkin Elmer foi usado para o ensaio. Em resumo, as células T CD4 humanas purificadas (kit de purificação de célula T CD4 da Dynal) foram ativadas por anticorpo anti-CD3 ligado a placa (BD) para induzir expressão de PD-1. As células T CD4 foram adicionadas a uma placa de 96 poços de

fundo em V, seguido por adição de PBMC humana (uma efetora para razão celular alvo (E/T) de 50:1) e anticorpo designado. Após incubação por 1 hora a 37°C, a placa foi girada. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96
5 poços de fundo plano e a placa foi lida usando um leitor de placa RubyStar. Os resultados mostraram que 5C4-IgG4 não mediaram ADCC nas células T CD4 ativadas, enquanto 5C4-IgG1 mediam ADCC nas células T CD4 ativadas (figura 53), indicando que a atividade de ADCC está relacionada a sua
10 região Fc do anticorpo anti-PD-1.

EXEMPLO 24: Avaliação da Citotoxicidade Dependente de Complemento de Anticorpo Anti-PD-1

Nesse exemplo, foi examinada a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) de anticorpo anti-PD-1. Duas
15 versões de 5C4, uma com região Fc da IgG1 humana (5C4-IgG1) e outra com região Fc de IgG4 humana (5C4-IgG4), foram testadas no ensaio. Em resumo, células T CD4 humanas purificadas (kit de purificação de célula T CD4 Dynal) foram ativadas por anticorpo anti-CD3 de ligação a placa (BD) para
20 induzir expressão de PD-1. As diluições em série de anticorpo anti-PD-1 (5C4) e anticorpos de controle de 50 µg/mL para 640 pg/mL foram testadas quanto a CDC na presença de complemento humano (Quidel-A113). Alamar blue (Biosource International) foi usado para medir a citotoxicidade. A
25 placa foi lida em um leitor de placa fluorescente (EX530 EMS590). Contagens de células viáveis são proporcionais à unidades de fluorescência. Os resultados mostraram que nem 5C4-IgG1 ou 5C5-IgG4 mediou CDC nas células T CD4 ativadas,

enquanto o anticorpo de controle (anticorpo anti-HLA-ABC) mediu (figura 54).

EXEMPLO 25: Avaliação da Expressão de PD-1 nas Células T Humanas

5 Nesse exemplo, PBMCs humanas de doadores diferentes foram examinadas quanto a expressão de PD-1 nos vários subconjuntos celulares por FACS. Foi empregado no ensaio anticorpo anti-PD-1 biotinilado que revelou uma sensibilidade muito maior que o anticorpo anti-PD-1
10 disponível comercialmente na detecção das moléculas de PD-1 na superfície celular. Anticorpo de ligação foi detectado usando uma estreptavidina conjugada com PE. Análise citométrica de fluxo foi realizada usando uma citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson) e software Flowjo (Tree
15 Star). A expressão de PD-1 foi detectada em algumas células T humanas, porém não nas células B ou monócitos. O exame adicional dos subconjuntos de célula T indica que PD-1 é expresso na memória de CD4 e CD8 e células T efectoras, porém ausente nas células T CD4 ou CD8 dos não previamente
20 desafiados ou tratados.

A presente invenção não está limitada em seu escopo às modalidades específicas descritas aqui. Na realidade, várias modificações da invenção, além daquelas descritas aqui, ficarão claras aos versados na técnica a
25 partir da descrição precedente e figuras anexas. Tais modificações se encontram dentro do escopo das reivindicações apenas. A invenção, portanto, deve ser limitada apenas pelos termos das reivindicações apenas,

juntamente com o escopo pleno dos equivalentes aos quais as reivindicações se referem.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Medarex, Inc.

<110> Ono Pharmaceutical Co., LTD.

<120> "ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA MORTE PROGRAMADA 1 (PD-1) E
MÉTODOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER USANDO ANTICORPOS ANTI-PD-1
SOZINHOS OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS IMUNOTERAPÊUTICOS"

<130> GEOP-50

<150> US 60/679, 466

<151> 09-05-2005

<150> US 60/738, 434

<151> 21-11-2005

<150> US 60/748, 919

<151> 08-12-2005

<160> 74

<170> Versão PatentIn 3.1

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ala Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 3

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Leu	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50						55				60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90				95	
Ala	Ser	Asn	Val	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
		100						105					110		
Ser															

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Asp	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser	Asn	Ser
			20						25				30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30
 Ser Phe Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Val Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Ala Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Glu Thr Tyr Phe Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
          20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35             40             45
Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
          65             70             75             80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
          85             90             95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100             105

```

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
          20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35             40             45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50             55             60

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 107

<212> PRI

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Tyr Gly Met His

1

5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asn Tyr Gly Phe His

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asn Tyr Gly Met His

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Asn Ser Gly Met His

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Ser Ser Phe Phe Trp Gly

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Gly Phe His

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRI

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Ser Ser Tyr Phe Trp Gly

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Glu Thr Tyr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1

5

10

15

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Asn Asp Asp Tyr

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Asp Asp Tyr

1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Asn Val Asp His

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asn Asp Asp Tyr

1

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr

1

5

10

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Asp Asp Tyr

1

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr

1

5

10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1

5

10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1

5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr

1

5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1

5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 57

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 57

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac gtg gtc cag cct ggg ggg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga gtc gcc ttc agt aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ala Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca gtt atc tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac atg ctc tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct atg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg agg aac gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Arg Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

<210> 58

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 58

cag gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga gac gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga tta acc ttc act aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
ggc ttc cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gct gtt ata tgg tat gat gga agt aag aaa tat tat gca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac aac ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg act ggg gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

<210> 59

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 59

cag gtg tac ttg gta gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca ctt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg	192
Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg acc agt ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tat tgt	288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg agc aac gtt gac cat tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Ser Asn Val Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

<210> 60

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 60

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt aac tct	96
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	336
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
tca	339
Ser	

<210> 61

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 61

cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc oca gga ctg gtg aag cct tcg gag	48
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc ctc agc agg agt	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser	
20 25 30	
agt ttc ttc tgg ggc tgg atc cgt cag ccc cca ggg aag gga ctg gag	144
Ser Phe Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg att ggg agt atc tat tat agt ggg agc acc tac tac aac ccg tcc	192
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
50 55 60	
ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc	240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
65 70 75 80	
tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac	288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gtg aga gat tac gat att ttg act ggc gac gag gac tac tgg ggc	336
Cys Val Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly	
100 105 110	
cag gga acc ctg gtc acc gtg tcc tca	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 62

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 62

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5						10					15	
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	aca	acg	tct	gga	atc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20						25					30	
ggc	ttt	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	oca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg	144
Gly	Phe	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
				35						40					45	
gca	gtg	ata	tgg	tat	gat	gga	agt	aaa	aaa	tac	tat	gca	gac	tcc	gtg	192
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
				50						55					60	
aag	ggc	cga	ttc	acc	ctc	tcc	aga	gac	gat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
				65						70					75	
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
										85					90	
gtt	act	ggg	gat	gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	336
Val	Thr	Gly	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
										100					105	
															110	
tca																339
Ser																

<210> 63

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 63

cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc oca gga ctg gtg aag cct tcg gag	48
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc tct gtc tct ggt ggc tcc ctc agc agg agt	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser	
20 25 30	
agt tac ttc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag	144
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg att gcg agt atc ttt tat agt ggg gaa acc tac ttc aat ccg tcc	192
Trp Ile Ala Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Glu Thr Tyr Phe Asn Pro Ser	
50 55 60	
ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc agg aac cag ttc	240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe	
65 70 75 80	
tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac	288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt gcg aga gat tac gat att ttg act ggc gac gag gac tac tgg ggc	336
Cys Ala Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly	
100 105 110	
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 64

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 64

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1             5             10             15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
             20             25             30
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc atc atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile
             35             40             45
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
             50             55             60
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
             65             70             75             80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
             85             90             95
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
             100             105

```

<210> 65

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 65

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1             5             10             15
gaa aga gcc acc ctg tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
          20             25             30
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc     144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35             40             45
tat gat aca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc     192
Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50             55             60
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
  65             70             75             80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg ctc     288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
          85             90             95
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa                        321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100             105

```

<210> 66

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 66

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg	48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac	96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
20 25 30	
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc	192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg	288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg	
85 90 95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 67

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 67

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg	48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac	96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
20 25 30	
tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc	192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg	288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg	
85 90 95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 68

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 68

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gtg gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1             5             10             15
gac aga gtc tcc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
      20             25             30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35             40             45
tat gct gca tcc aat tta cga agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50             55             60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65             70             75             80
gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat tat agt tac cct agg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
      85             90             95
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa      321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100             105

```

<210> 69

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 69

```

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg      48

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 70

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 70

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat tat agt tac cct agg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 71

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> 72

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Ile	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	
				85					90					95	

<210> 73

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg

<210> 74

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano isolado ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 e onde o anticorpo exibe
5 pelo menos uma das seguintes propriedades:

a) se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos;

b) não se liga substancialmente ao CD28, CTLA-4 ou ICOS humano;

10 c) aumenta a proliferação da célula T em um ensaio de Reação de Linfócito Misto (MLR);

d) aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio de MLR; ou

e) aumenta a secreção de interleucina-2 (IL-2) em
15 um ensaio de MRL.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é o anticorpo de comprimento pleno de um isotipo de IgG1 ou IgG4.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que é um fragmento de anticorpo ou anticorpo de cadeia simples.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 5×10^{-8} M ou menos.

25 5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-8} M ou menos.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 5×10^{-9} M ou menos.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D entre 1×10^{-8} M e 1×10^{-10} M.

8. Anticorpo monoclonal humano isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compete em cruzamento para ligação ao PD-1 com um anticorpo de referência compreendendo:

a) uma região variável de cadeia pesada humana compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

b) uma região variável de cadeia leve humana compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

9. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:8.

10. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:2 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:9.

11. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia

pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:3 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:10.

12. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8,
5 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:4 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11.

13. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8,
10 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:5 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:12.

14. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8,
15 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:6 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:13.

15. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8,
20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:7 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

16. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de
25 ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene V_H 3-33 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

17. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene V_H 4-39 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

18. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto ou derivada de um gene V_K L6 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

19. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto ou derivada de um gene V_K L15 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

20. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-33 humano; e

b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6 humano;

onde o anticorpo se liga especificamente ao PD-1.

21. Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-39 humano; e

b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L15 humano;

onde o anticorpo se liga especificamente ao PD-1.

22. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que consiste nas seqüências CDR1, CDR2 e CDR3; e uma região variável de cadeia leve que compreende as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

10 a) a seqüência CDR3 de região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35 e modificações conservadoras das mesmas;

b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia 15 leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56 e modificações conservadoras das mesmas; e

c) o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

23. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 22, 20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a seqüência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 e modificações conservadoras das mesmas, e a seqüência CDR2 da 25 região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49 e modificações conservadoras das mesmas.

24. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 17, 18, 19, 20 e 21 e modificações conservadoras das mesmas, e a sequência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas sequências de aminoácido das SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 e modificações conservadoras das mesmas.

25. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

15 a) a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7;

20 b) a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14;

c) o anticorpo se liga ao PD-1 humano com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menos; e

25 d) o anticorpo substancialmente não se liga ao CD28, CTLA-4 ou ICOS humano.

26. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende, adicionalmente, pelo menos uma das seguintes propriedades:

a) o anticorpo aumenta a proliferação da célula T
5 em um ensaio de Reação de Linfócito Misto (MLR);

b) o anticorpo aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio de MLR; ou

c) o anticorpo aumenta a secreção de interleucina-2 (IL-2) em um ensaio de MRL.

10 27. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do
15 grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 17, 18, 19, 20 e 21;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e
20 28;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35;

25 d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

28. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

10 a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:15;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:22;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada
15 compreendendo a SEQ ID NO:29;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:36;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:43; e

20 f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:50.

29. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada
25 compreendendo a SEQ ID NO:16;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:23;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:30;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:37;

5 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:44; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:50.

10 30. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:17;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:24;

15 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:31;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:38;

20 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:45; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:52.

31. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

25 a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:18;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:25;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:32;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:39;

5 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:46; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:53.

10 32. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:19;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:26;

15 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:33;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:40;

20 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:47; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:54.

33. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

25 a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:20;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:27;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:34;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:41;

5 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:48; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:55.

10 34. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:21;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:28;

15 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:35;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:42;

20 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:49; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:56.

25 35. Anticorpo monoclonal isolado ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13a e 14;

onde o anticorpo se liga especificamente ao PD-1.

5 36. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1, e

10 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:8.

37. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:2, e

15 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:9.

38. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

20 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:3, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:10.

39. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

25 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11.

40. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:5, e

5 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:11.

41. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

10 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:6, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:13.

42. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

15 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:7, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

20 43. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1-36 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

25 44. Imunoconjugado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, ligado a um agente terapêutico.

45. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 44 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

46. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente terapêutico é uma citotoxina.

47. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 46 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

48. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente terapêutico é um isótopo radioativo.

49. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 48 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

50. Molécula biespecífica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, ligado a uma segunda fração funcional possuindo uma especificidade de ligação diferente que a do anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo.

51. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a molécula biespecífica, de acordo com a reivindicação 50, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

52. Molécula de ácido nucléico isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que codifica o anticorpo ou uma porção de ligação ao antígeno da mesma, de acordo com uma das reivindicações 1-36.

53. Vetor de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 52.

54. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de
5 que compreende o vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 53.

55. Camundongo transgênico compreendendo transgenes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o camundongo expressa o anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36.
10

56. Híbridoma preparado de camundongo, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o híbridoma produz o anticorpo.

57. Método para modular uma resposta imune em um
15 indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administração ao indivíduo do anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, tal que, a resposta imune no indivíduo é modulada.

20 58. Método para inibir o crescimento das células tumorais em um indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo.

25 59. Método, de acordo com a reivindicação 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico.

60. Método, de acordo com a reivindicação 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humanizado.

61. Método, de acordo com a reivindicação 58, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo plenamente humano.

62. Método, de acordo com a reivindicação 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células tumorais constituem um câncer selecionado do grupo consistindo em melanoma, **10** câncer renal, câncer da próstata, câncer de mama, câncer de cólon e câncer de pulmão.

63. Método, de acordo com a reivindicação 58, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células tumorais são de um câncer selecionado da lista consistindo em câncer ósseo, **15** câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma cutâneo ou maligno intra-ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma das trompas falopianas, carcinoma do endométrio, carcinoma do cerviz, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, **20** doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma do tecido mole, **25** câncer da uretra, câncer do pênis, leucemias crônicas ou agudas incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, tumores sólidos de infância, linfoma linfocítico, cân-

cer da bexiga, câncer dos rins ou uretra, carcinoma da pél-
vis renal, neoplasmo do sistema nervoso central (CNS), lin-
foma primário do CNS, angiogênese de tumor, tumor do eixo da
espinha, glioma do tronco encefálico, hipofisário, sarcoma
5 de Kaposi, câncer epidermóide, câncer da célula escamosa,
linfoma da célula T, canceres induzidos ambientalmente in-
cluindo aqueles induzidos por asbestos e combinações de can-
ceres.

64. Método para inibir o crescimento das células
10 tumorais em um indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que
compreende administração ao indivíduo do anticorpo ou porção
de ligação ao antígeno do mesmo, de qualquer uma das reivin-
dicações 1-36, em uma quantidade eficaz para inibir o cres-
cimento das células tumorais.

15 65. Método para tratar uma doença infecciosa em um
indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende admi-
nistração ao indivíduo do anticorpo ou porção de ligação ao
antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindi-
cações 1-36, tal que o indivíduo é tratado de uma doença in-
20 fecciosa.

66. Método, de acordo com a reivindicação 65,
CARACTERIZADO pelo fato de que a doença infecciosa é sele-
cionada da lista consistindo em HIV, Influenza, Herpes, Gi-
ardia, Malária, Leishmaniose, a infecção patogênica pelo ví-
rus da Hepatite (A, B e C), herpesvírus (por exemplo, VZV,
25 HSV-1, HAV-6, HSV-II e CMV, vírus Epstein Barr), adenovírus,
vírus influenza, flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus Cox-
sackie, cornovírus, vírus sincicial respiratório, vírus da

cachumba, rotavírus, vírus do sarampo, vírus da rubéola,
 parvovírus, vírus da vacínia, vírus HTLV, vírus da dengue,
 papilomavírus, vírus de molusco, vírus da pólio, vírus da
 raiva, vírus JC e vírus da encefalite arboviral, infecção
 5 patogênica pela bactéria *chlamydia*, bactéria Riquetsial, *my-*
cobacteria, *staphylococci*, *streptococci*, *pneumococci*, *me-*
ningococci e *conococci*, *klebsiella*, *Proteus*, *serratia*, *Pseu-*
domonas, *legionella*, difteria, salmonela, bacilos, cólera,
 tétano, botulismo, antrax, peste, leptospirose e bactéria da
 10 doença de Lyme, infecção patogênica por fungos *Candida* (*al-*
bicans, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus*
neoforman, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Gênero Mu-
 corales (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*,
Blastomyces dermatitidis, *Paracoccidioides brasiliensis*,
 15 *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* e infecção pa-
 togênica por parasitas *Entamoeba histolytica*, *Balantidium*
coli, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*,
Cryptosporidium sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*,
Babesia microti, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Lei-*
 20 *shmania donovani*, *Toxoplasma gondi* e *Nippostrongylus brasi-*
liensis.

67. Método para melhorar uma resposta imune a um
 antígeno em um indivíduo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que
 compreende administração ao indivíduo de: (i) antígeno; e
 25 (ii) anticorpo ou porção de ligação ao anticorpo do mesmo,
 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, tal que,
 uma resposta imune ao antígeno no indivíduo é melhorada.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o antígeno é um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antígeno de um agente patogênico.

5 69. Método para tratamento de uma doença hiperproliferativa, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) administração de um anticorpo anti-PD-1 ao indivíduo, e

(b) administração de um anticorpo anti-CTLA-4 ao
10 indivíduo.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é administrado em uma dose subterapêutica.

71. Método, de acordo com a reivindicação 69,
15 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 é administrado em uma dose subterapêutica.

72. Método, de acordo com a reivindicação 69, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são independentemente administrados em
20 uma dose subterapêutica.

73. Método, de acordo com a reivindicação 69, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são administrados sequencialmente.

74. Método, de acordo com a reivindicação 73,
25 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é administrado antes do anticorpo anti-CTLA-4.

75. Método, de acordo com a reivindicação 73, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 é administrado antes do anticorpo anti-PD-1.

76. Método, de acordo com a reivindicação 73, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são administrados concorrentemente.

77. Método, de acordo com a reivindicação 73, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são misturados como uma composição simples e administrados concorrentemente.

78. Método, de acordo com a reivindicação 73, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administração a um indivíduo de (a) uma composição compreendendo o anticorpo anti-PD-1 e um veículo e (b) uma composição compreendendo o anticorpo anti-CTLA-4 e um veículo farmacologicamente aceitável.

79. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 78, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença hiperproliferativa é câncer.

80. Método, de acordo com a reivindicação 79, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer é câncer de cólon.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 79, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 79, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é um anticorpo de sequência humana.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

84. Método, de acordo com a reivindicação 83,
5 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo monoclonal anti-PD-1 da sequência humana é 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4.

85. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 79, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo
10 anti-CTLA-4 é um anticorpo de sequência humana.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86,
15 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 da sequência humana é 10D1 (MDX-010).

88. Método para alterar um evento adverso associado ao tratamento de uma doença hiperproliferativa com um agente imunoestimulador, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:
20

(a) administração de um anticorpo anti-PD-1 a um indivíduo, e

(b) administração de uma dose terapêutica do anticorpo anti-CTLA-4 ao indivíduo.

25 89. Método, de acordo com a reivindicação 86, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é administrado em uma dose subterapêutica.

90. Método, de acordo com a reivindicação 88, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são administrados sequencialmente.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é administrado antes do anticorpo anti-CTLA-4.

92. Método, de acordo com a reivindicação 90, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 é administrado antes do anticorpo anti-PD-1.

10 93. Método, de acordo com a reivindicação 88, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são administrados concorrentemente.

94. Método, de acordo com a reivindicação 88, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são misturados como uma composição simples e administrados concorrentemente. 15

95. Método, de acordo com a reivindicação 88, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administração a um indivíduo de (a) uma composição compreendendo um anticorpo anti-PD-1 e um veículo farmacologicamente aceitável e (b) uma composição compreendendo o anticorpo anti-CTLA-4 e um veículo farmacologicamente aceitável. 20

96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 95, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença hiperproliferativa é câncer. 25

97. Método, de acordo com a reivindicação 96, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer é câncer de cólon.

98. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 95, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

99. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 95, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é um anticorpo de sequência humana.

100. Método, de acordo com a reivindicação 99, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

101. Método, de acordo com a reivindicação 100, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 da sequência humana é 17D8, 2D3, 5H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4.

102. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 95, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 é um anticorpo da sequência humana.

103. Método, de acordo com a reivindicação 102, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

104. Método, de acordo com a reivindicação 103, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 da sequência humana é 10D1 (MDX-010).

105. Método para preparação de um anticorpo anti-PD-1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) provisão de: (i) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20a e 21, uma sequência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25,

26, 27 e 28; e uma sequência de CDR3 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35; ou (ii) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, uma sequência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49 e uma sequência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

10 (b) alteração de pelo menos um resíduo de aminoácido dentro de pelo menos uma sequência de anticorpo da região variável, a sequência sendo selecionada da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e a sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve, de modo a
15 criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e

 (c) expressando a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

VH de Anti-PD1 17D8

Segmento V : 3-33
 Segmento D : unknown
 Segmento J : JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  D  V  V  Q  P  G  G  S  L
1   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     -----
      R  L  S  C  A  A  S  G  V  A  F  S  N  Y  G  M  H  W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA GTC GCC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  W  Y  D
109 GTC CGC CAG GCT CCC GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATC TGG TAT GAT

      CDR2
      -----
      G  S  N  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA

      D  N  S  K  N  M  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ATG CTC TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

      CDR3
      -----
      T  A  M  Y  Y  C  A  R  N  D  D  Y  W  G  Q  G  T  L
271 ACG GCT ATG TAT TAC TGT GCG AGG AAC GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

                                     L → JH4b

      V  T  V  S  S
325 GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Fig. 1A

VH de Anti-PD1 17D8

Segmento V: L6

Segmento J: JK4

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   I   I   Y   D   A   S   N   R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC ATC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R   S   N   W   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```



Fig. 1B

VH de Anti-PD-1 2D3

Segmento V: 3-33

Segmento D: 7-27

Segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  D  V  V  Q  P  G  R  S  L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R  L  S  C  A  A  S  G  L  T  F  T  N  Y  G  F  H  W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTA ACC TTC ACT AAC TAT GGC TTC CAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  W  Y  D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCT GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                -----
      G  S  K  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R
163 GGA AGT AAG AAA TAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  N  L  R  A  E  D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AAC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T  A  V  Y  Y  C  A  T  G  D  D  Y  W  G  Q  G  T  L
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GGG GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

      V  T  V  S  S
325 GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 2A

VH de Anti-PD-1 2D3

Segmento V: L6

Segmento J: JK4

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTG TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D T S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT ACA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P L T F G G G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

Fig. 2B

VH de Anti-PD-1 4H1

Segmento V: 3-33
 Segmento D: indeterminado
 Segmento J: JH4b

```

1   Q V Y L V E S G G G V V Q P G R S L
   CAG GTG TAC TTG GTA GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     -----
55  R L S C A A S G F T F S N Y G M H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
109 V R Q A P G K G L E W V A L I W Y D
   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA TGG TAT GAT

                                     CDR2
                                     -----
163 G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
   GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

                                     CDR3
                                     -----
217 D N S K N T L Y L Q M T S L R V E D
   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG ACC AGT CTG AGA GTC GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
271 T A V Y Y C A S N V D H W G Q G T L
   ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGC AAC GTT GAC CAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325 V T V S S
   GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 3A

VK de Anti-PD-1 4H1

Segmento V: L6

Segmento J: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGT AGT TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      S S N W P R T F G Q G T K V E I K
271 AGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Fig. 3B

VH de Anti-PD1 5C4

Segmento V: L6

Segmento J: JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGT AGT TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      S   S   N   W   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 AGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```



Fig. 4B

VH de Anti-PD-1 4A11

Segmento V : 4-39

Segmento D : 3-9

Segmento J : JH4b

```

1      Q  L  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L
      CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                         CDR1
                                         -----
55     S  L  T  C  T  V  S  G  G  S  L  S  R  S  S  F  F  W
      TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC CTC AGC AGG AGT AGT TTC TTC TGG

      CDR1
      -----
109    G  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  S  I  Y
      GGC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT

                                         CDR2
                                         -----
163    Y  S  G  S  T  Y  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S
      TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC

                                         CDR2
                                         -----
217    V  D  T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A
      GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

                                         CDR3
                                         -----
271    D  T  A  V  Y  Y  C  V  R  D  Y  D  I  L  T  G  D  E
      GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTG AGA GAT TAC GAT ATT TTG ACT GGC GAC GAG

      CDR3
      -----
325    D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
      GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTG TCC TCA

```

Fig. 5A

VH de Anti-PD-1 4A11

Segmento V : L15
Segmento J : JK1

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55     V S I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC TCC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S N L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AAT TTA

      CDR2
      -----
163    R S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CGA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
271    Y Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT TAT AGT TAC CCT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Fig. 5B

VH de Anti-PD-1 7D3

Segmento V : 3-33

Segmento D : 7-27

Segmento J : JH4b

```

1      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
55      R L S C T T S G I T F S S Y G F H W
      AGA CTC TCC TGT ACA ACG TCT GGA ATC ACC TTC AGT AGC TAT GGC TTT CAC TGG

                                CDR2
109     V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
      GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTG ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
163     G S K K Y Y A D S V K G R F T L S R
      GGA AGT AAA AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC CTC TCC AGA

217     D D S K N T L Y L Q M N S L R A E D
      GAC GAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
271     T A V Y Y C V T G D D Y W G Q G T L
      ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTT ACT GGG GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325     V T V S S
      GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 6A

VH de Anti-PD-1 7D3

Segmento V.: L6

Segmento J.: JK4

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
271    R S N W P L T F G G G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

```

Fig. 6B

VH de Anti-PD-1 5F4

Segmento V : 4-39

Segmento D : 3-9

Segmento J : JH4b

```

1      Q  L  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L
      CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55     S  L  T  C  S  V  S  G  G  S  L  S  R  S  S  Y  F  W
      TCC CTC ACC TGC TCT GTC TCT GGT GGC TCC CTC AGC AGG AGT AGT TAC TTC TGG

      CDR1
      ---
109    G  W  I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  A  S  I  F
      GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GCG AGT ATC TTT

                                CDR2
                                -----
163    Y  S  G  E  T  Y  F  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S
      TAT AGT GGG GAA ACC TAC TTC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC

                                CDR2
                                -----
217    V  D  T  S  R  N  Q  F  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A
      GTA GAC ACG TCC AGG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

                                CDR3
                                -----
271    D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  Y  D  I  L  T  G  D  E
      GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GAT ATT TTG ACT GGC GAC GAG

      CDR3
      -----
325    D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
      GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 7A

VH de Anti-PD-1 5F4

Segmento V : L15

Segmento J : JK1

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55     V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
163    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
271    Y Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT TAT AGT TAC CCT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

Fig. 7B

Região VH de anti-PD1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 e 7D3, linhagem germinal 3-33

3-33 Germline:	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	<u>CDR1</u>	S	Y	G	M	H	V	R	Q
17D8 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	A	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-		
2D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	T	N	-	-	F	-	-	-	-		
4H1 VH:	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-		
5C4 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	K	-	-	I	-	-	N	S	-	-	-	-	-	-	-	
7D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	I	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	

3-33 Germline:	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T
17D8 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	
2D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4H1 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5C4 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	D	-	-	-		

3-33 Germline:	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	<u>CDR3</u>																	
JH4b germline:																																					
17D8 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-	-	-	-	(JH4b)
2D3 VH:	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JH4b)		
4H1 VH:	-	-	-	T	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	S	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JH4b)	
5C4 VH:	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JH4b)	
7D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	T	G	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JH4b)

Fig. 8

Região VK de anti-PD-1 17D8, 2D3 e 7D3

L6 germline:	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
17D8 VK:	- - - - -
2D3 VK:	- - - - -
7D3 VK:	- - - - -

L6 germline:	W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G
17D8 VK:	- - - - -
2D3 VK:	- - - - -
7D3 VK:	- - - - -

L6 germline:	T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P
JK4 germline:	- - - - -
17D8 VK:	- - - - -
2D3 VK:	- - - - -
7D3 VK:	- - - - -

JK4 germline:	K V E I K
17D8 VK:	- - - - - (JK4)
2C3 VK:	- - - - - (JK4)
7D3 VK:	- - - - - (JK4)

Fig. 9

Região VK de anti-PD-1 4H1 e 5C4 VK

L6 germline:	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A
4H1 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C4 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L6 germline:	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G
4H1 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C4 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L6 germline:	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	C	Q	Q	R	S	N	W	P							
JK1 germline:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
4H1 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	T	F	G	Q	G	T	
5C4 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

JK1 germline:	K	V	E	I	K
4H1 VK:	-	-	-	-	-
5C4 VK:	-	-	-	-	-

Fig. 10

Regiões VH de anti-PD-1 4A11 e 5F4

4-39 germline: Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S S Y Y W
 4A11 VH: - - - - - - - - - - - - - - - L - R - - F F -
 5F4 VH: - - - - - - - - - - - - - - - L - R - - F -

CDR1

4-39 germline: G W I R Q P P G K G L E W I G S I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V T I S
 4A11 VH: -
 5F4 VH: - - - - - - - - - - - - - - - E - - F - - - -

CDR2

4-39 germline: V D T S K N H F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
 4A11 VH: - - - - - Q - - - - - - - - - - - - - - - D Y D I L T G D E
 5F4 VH: - - - - - R - - - - - - - - - - - - - - - D Y D I L T G D E

CDR3

JH4b germline: D Y W G Q G T L V T V S S
 4A11 VH: - - - - - - - - - - - - - - - (JH4b)
 5F4 VH: - - - - - - - - - - - - - - - (JH4b)

Fig. 11

Região VK de anti-PD-1 4A11 e 5F4

L15 germline: D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
 4A11 VK: -
 5F4 VK1: -

CDR1

L15 germline: W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
 4A11 VK: - - - - - - - - - - - - - - - N - R - - - - - - - - -
 5F4 VK1: -

CDR2

L15 germline: S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
 4A11 VK: -
 5F4 VK1: -

CDR3

L15 germline: Y P
 JK1 germline: T F G Q G T K V E I K
 4A11 VK: - - R - - - - - - - - - - (JK1)
 5F4 VK1: - - R - - - - - - - - - - (JK1)

Fig. 12

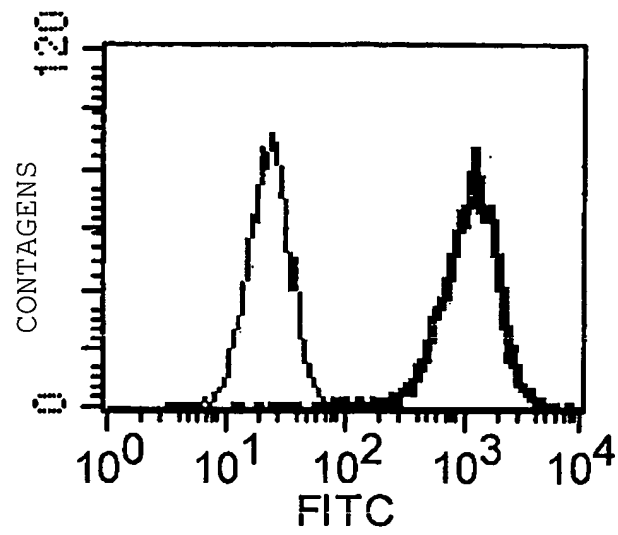


Fig. 13A

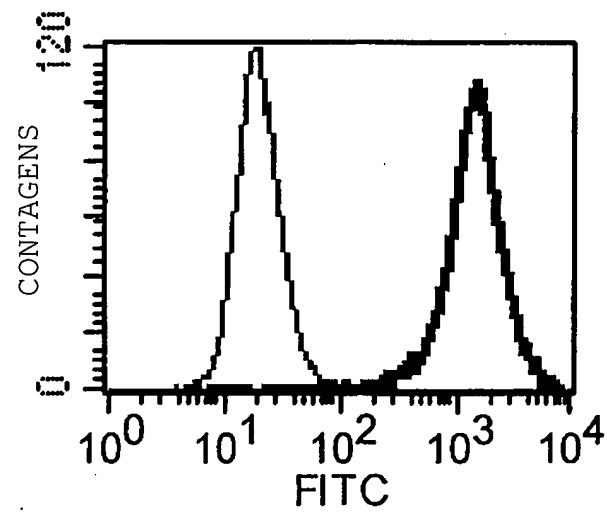


Fig. 13B

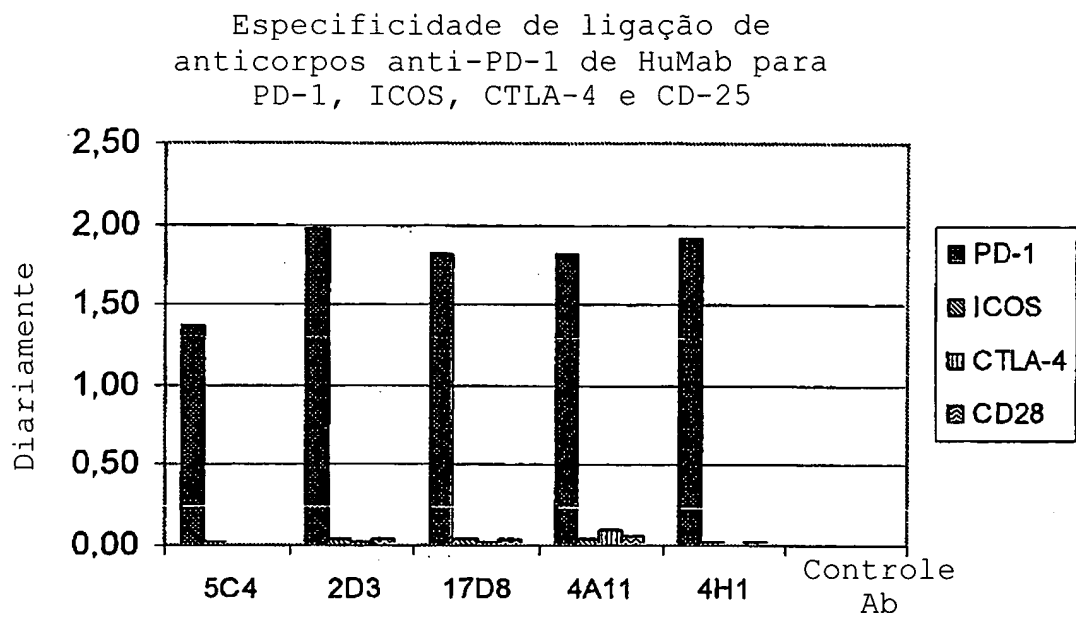


Fig. 14

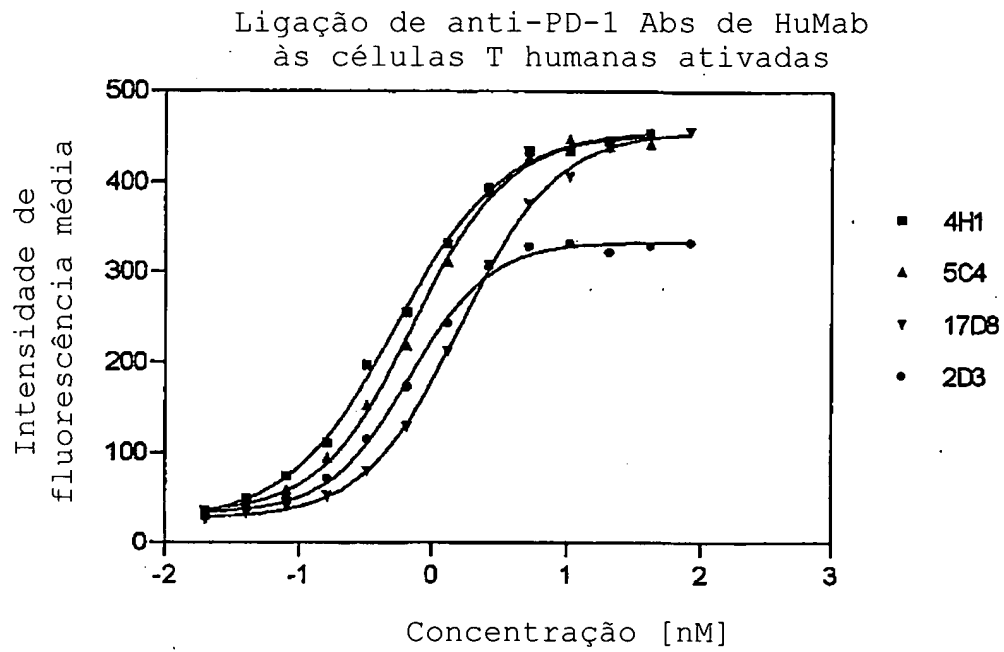


Fig. 15A

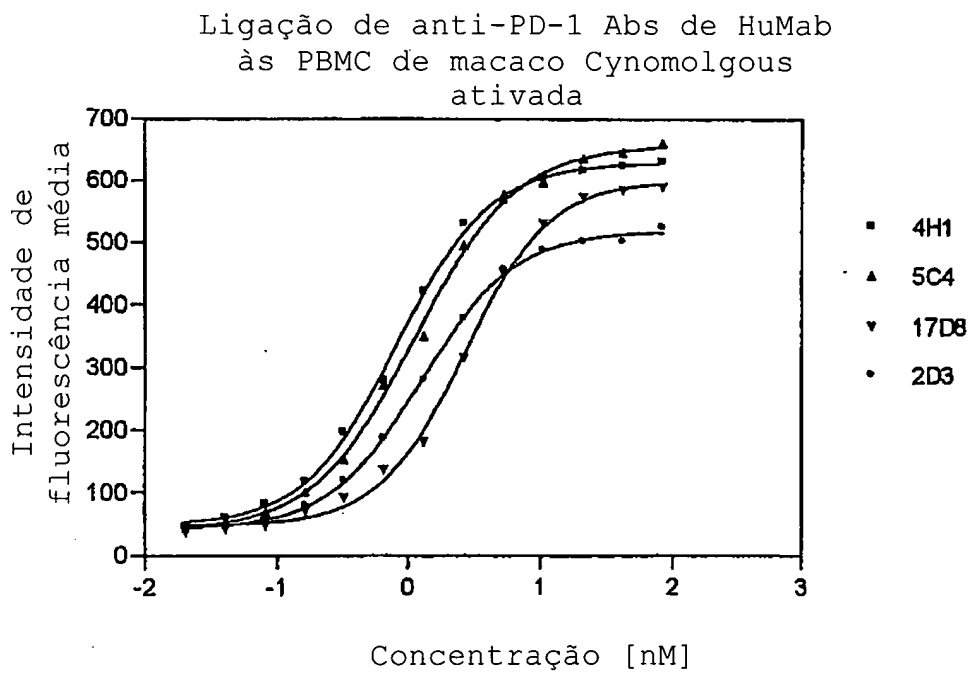


Fig. 15B

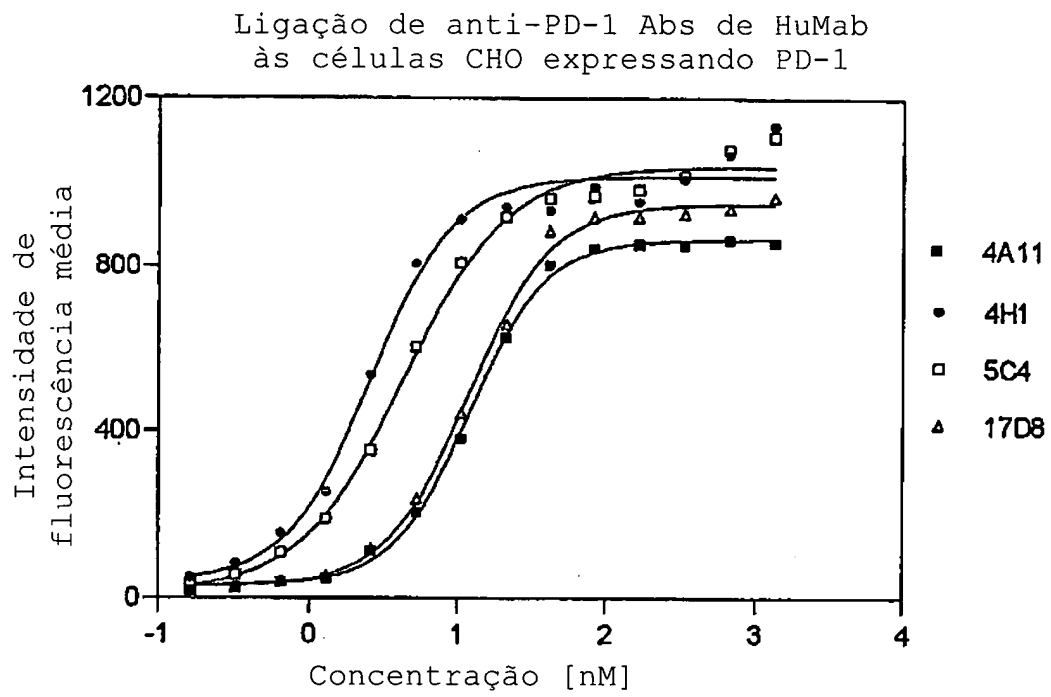


Fig. 15C

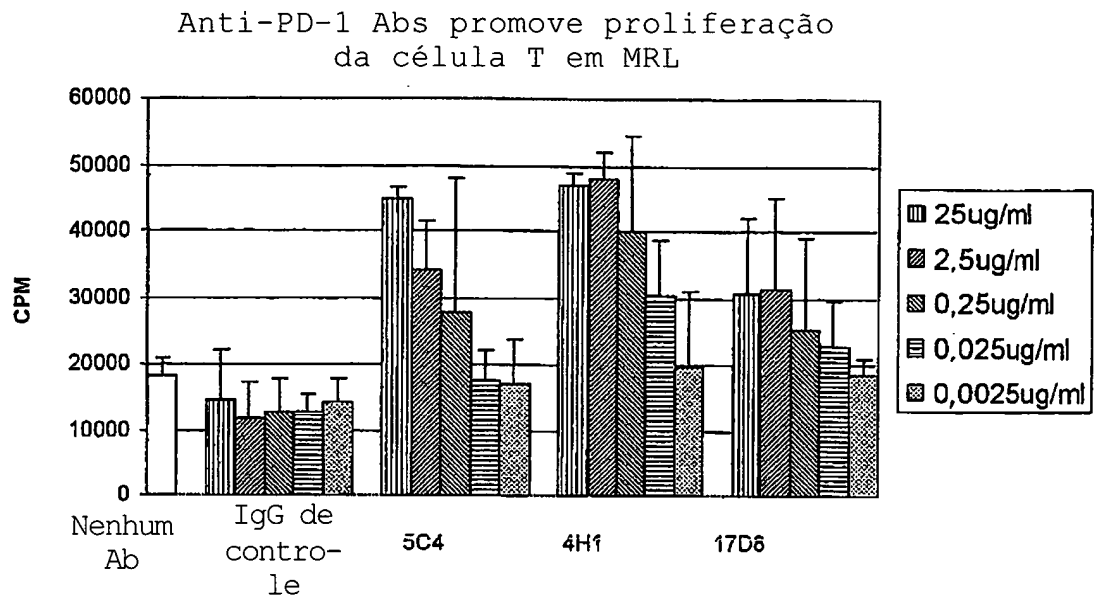


Fig. 16A

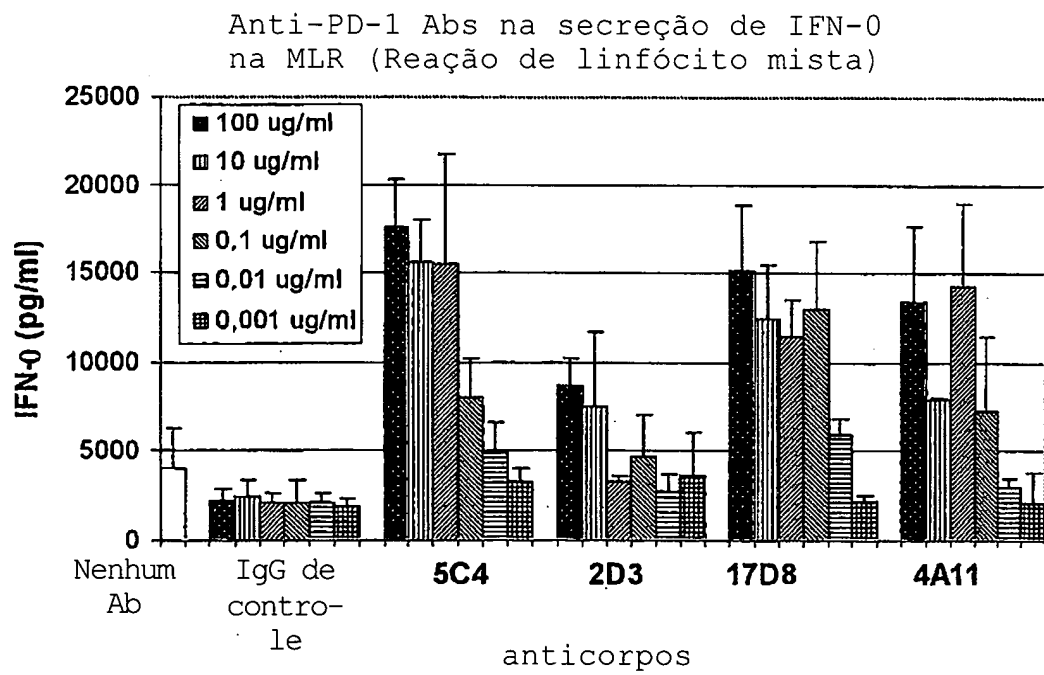


Fig. 16B

Anti-PD-1 Abs na secreção de IL-2
em MRL

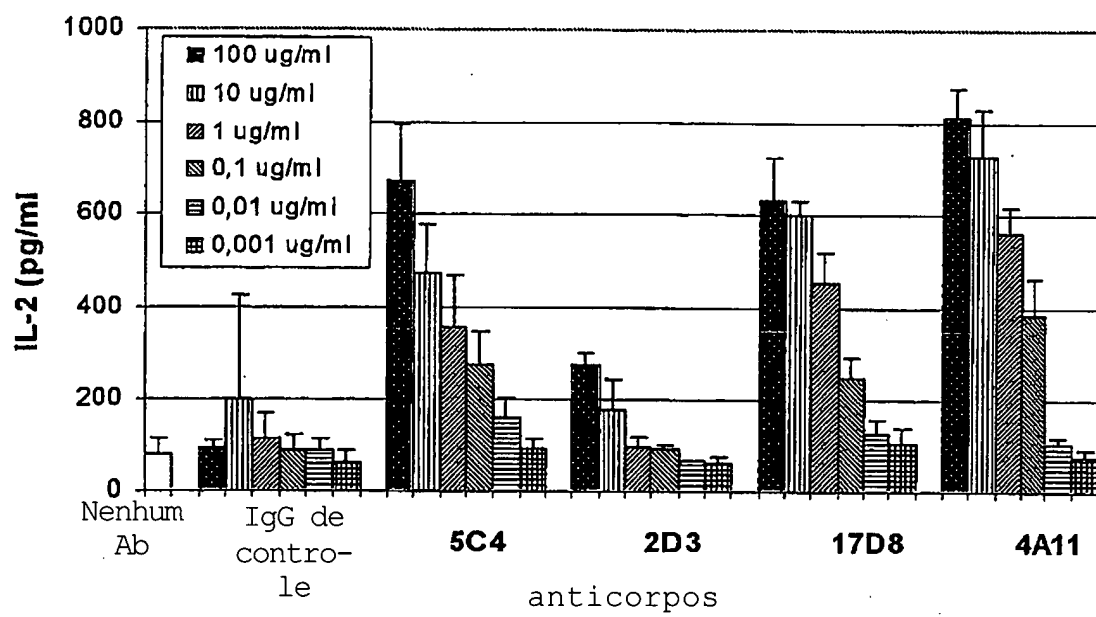


Fig. 16C

Absorção de anti-PD-1 de HuMab bloqueia a ligação de PD-L1 às células CHO/Hpd-1

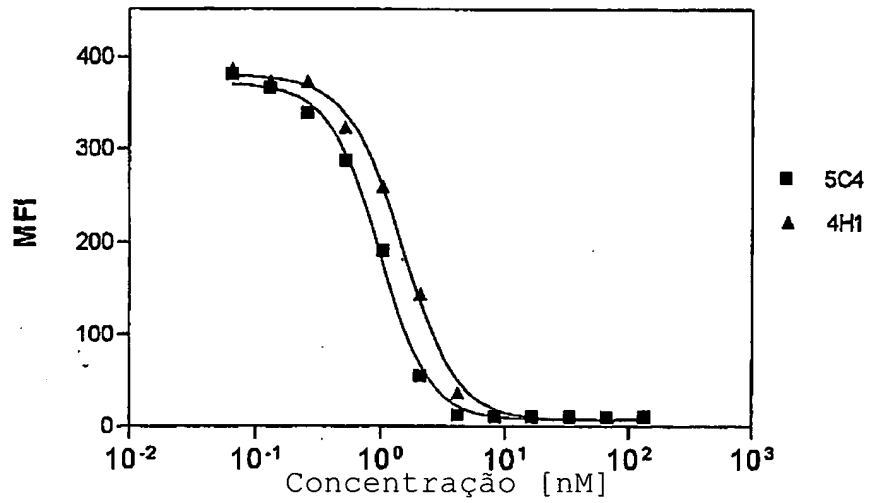


Fig. 17A

Anti-PD-1 Abs de HuMab bloqueia a ligação de PD-L2 às células CHO/PD-1

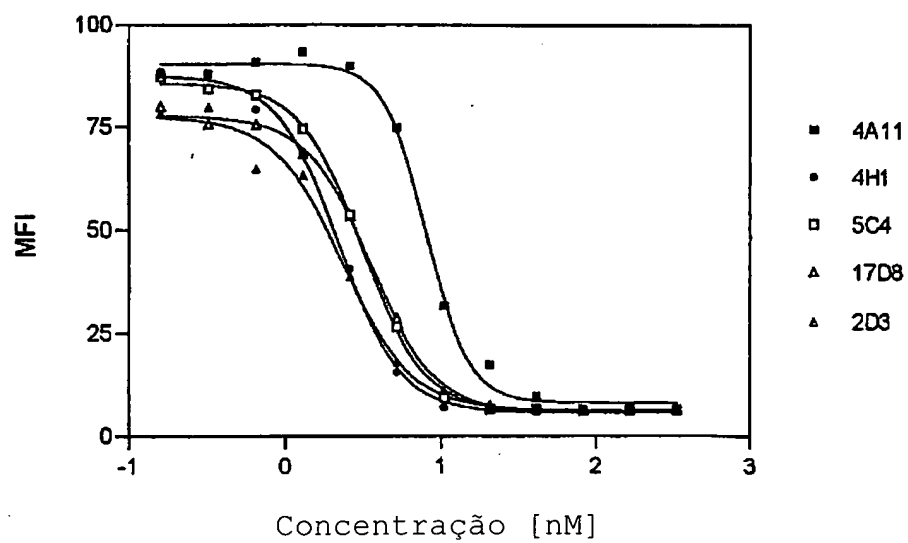


Fig. 17B

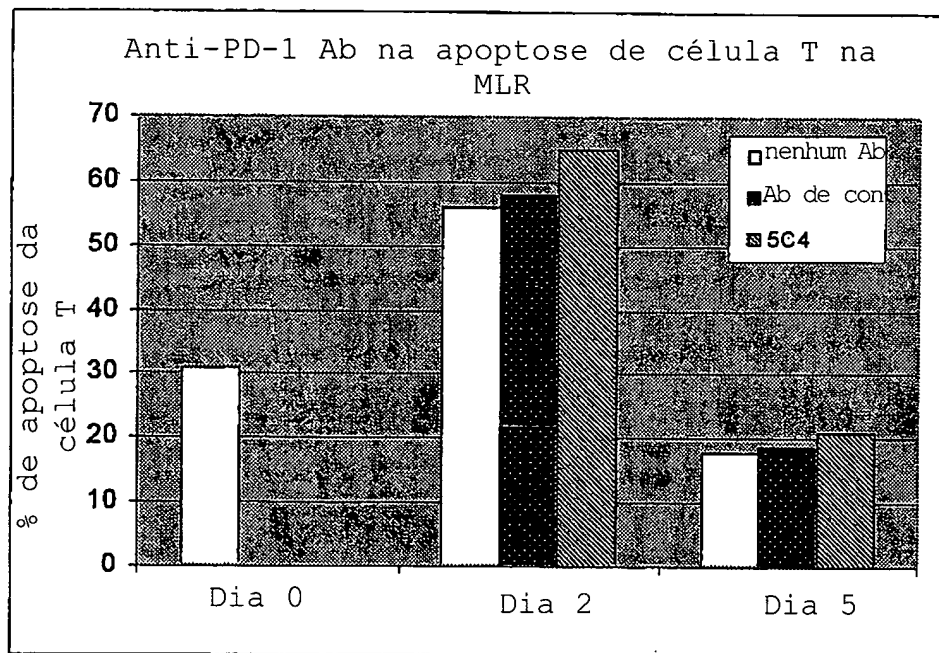


Fig. 18

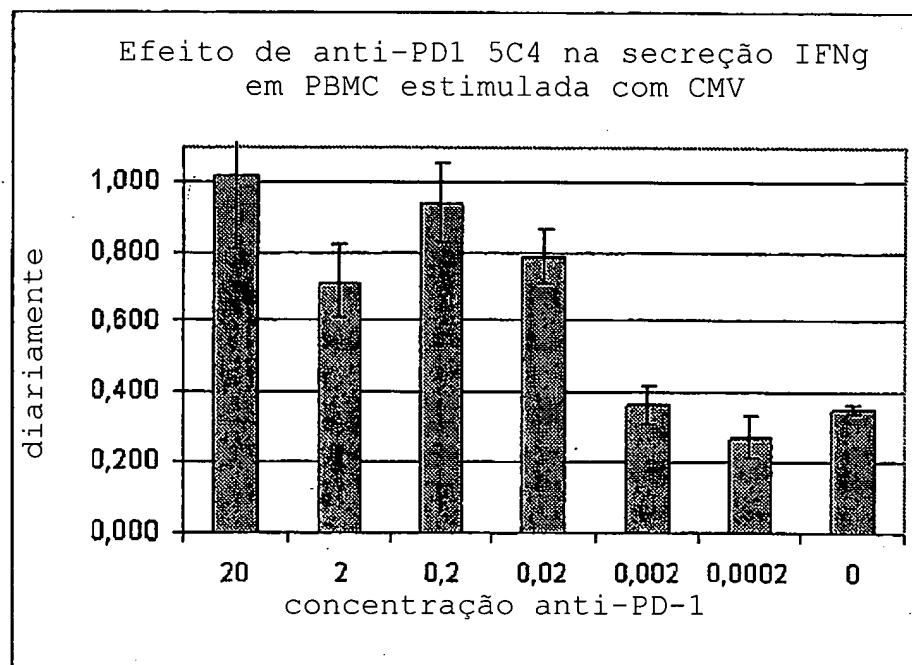


Fig. 19

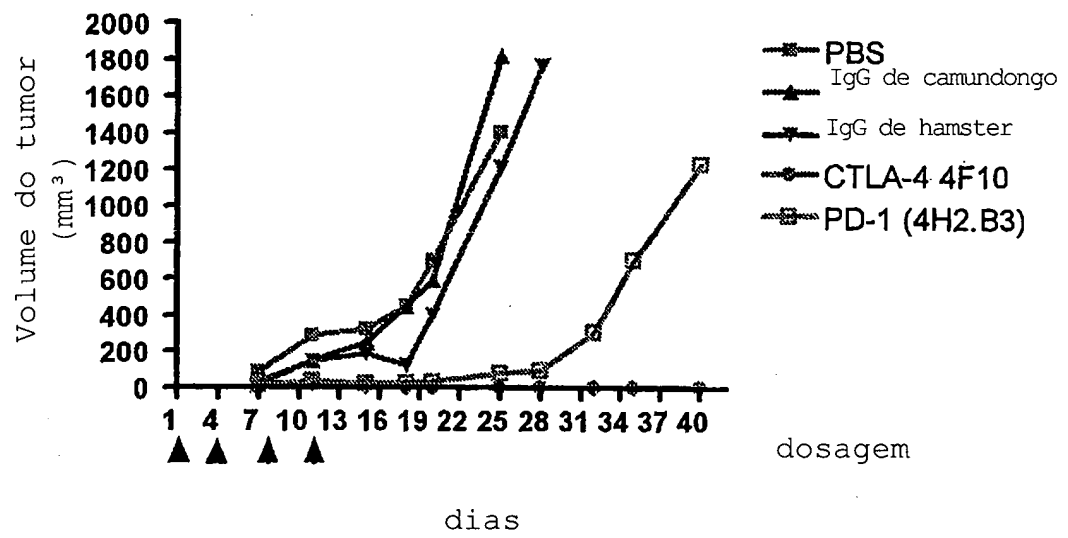


Fig. 20

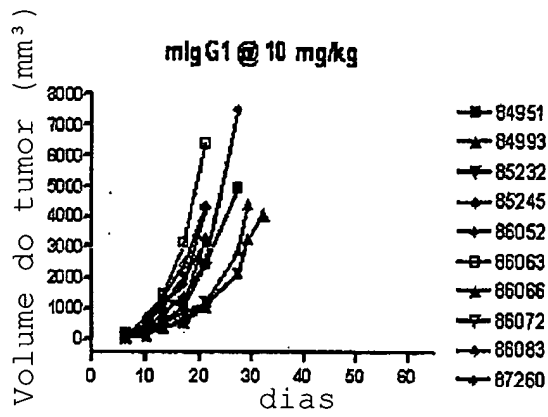


Fig. 21A

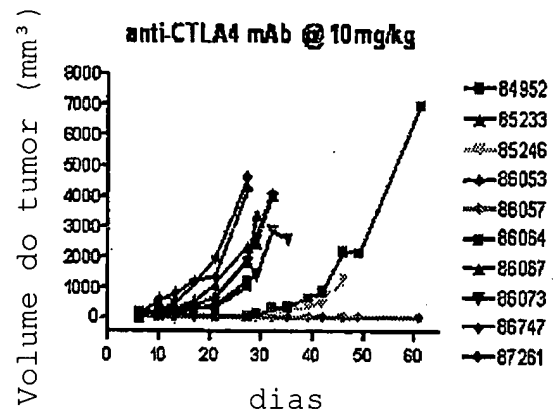


Fig. 21B

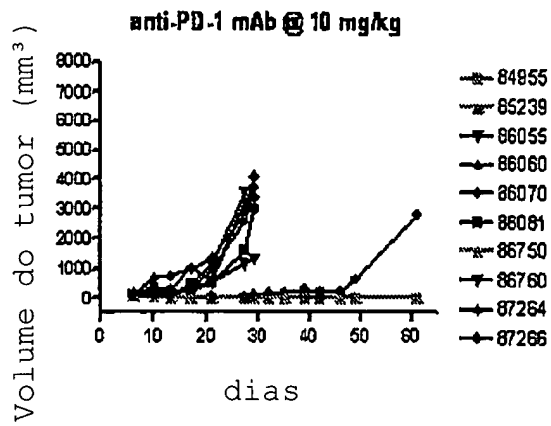


Fig. 21C

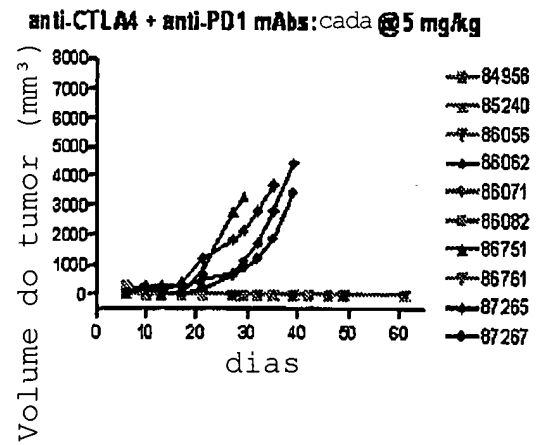


Fig. 21D

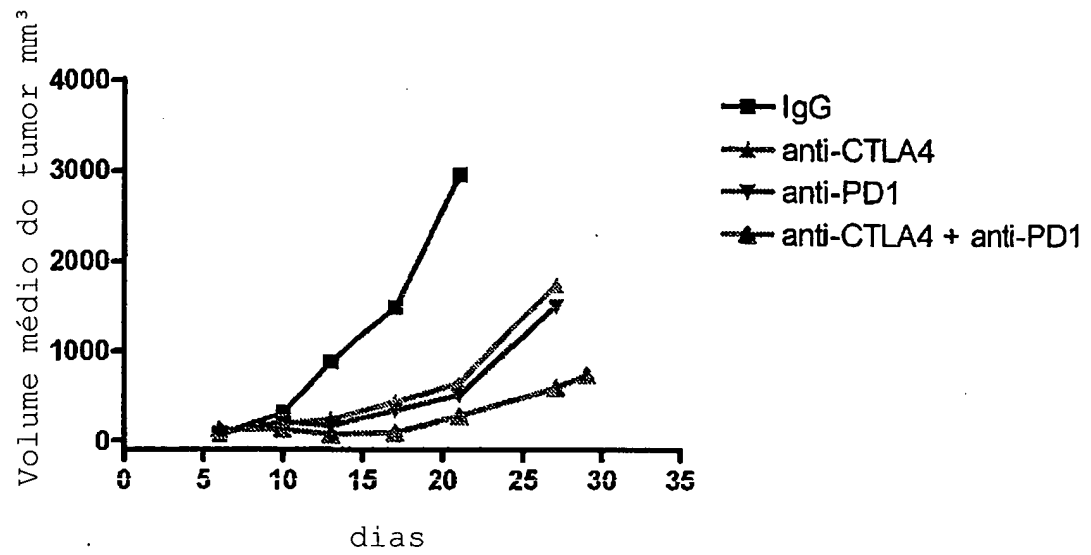


Fig. 22

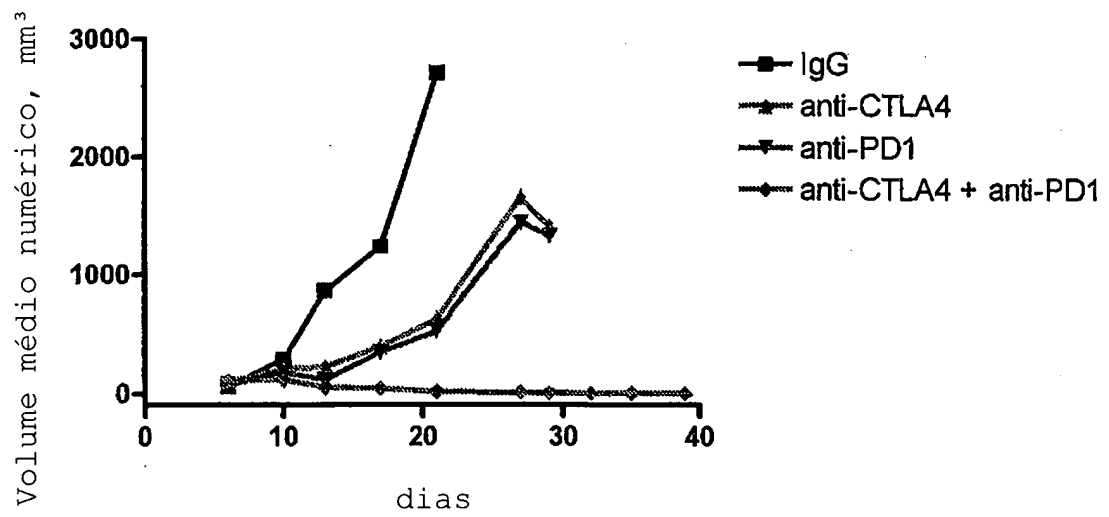


Fig. 23

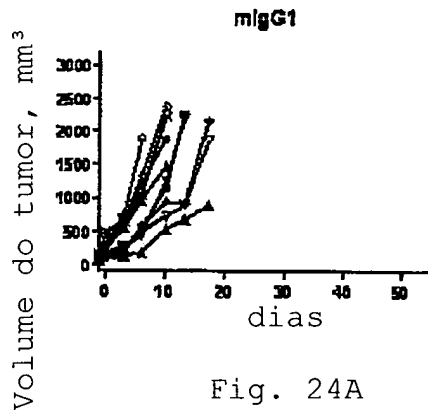


Fig. 24A

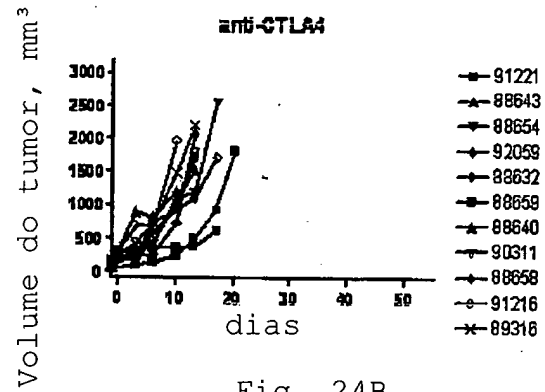


Fig. 24B

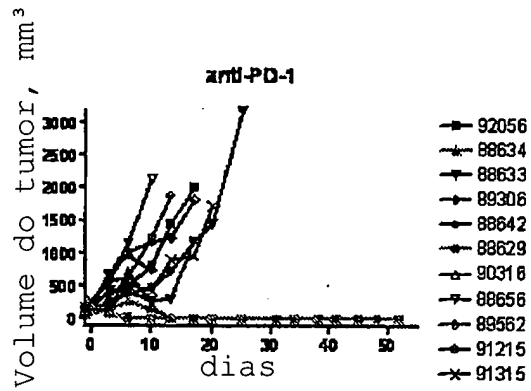


Fig. 24C

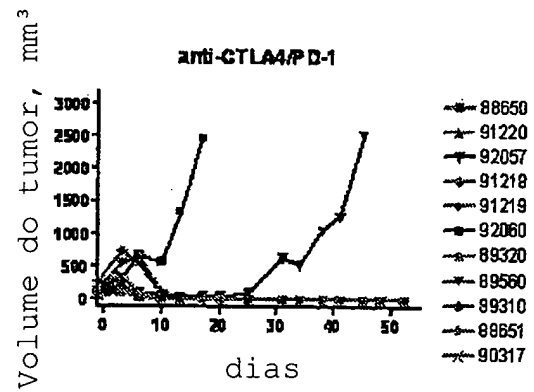


Fig. 24D

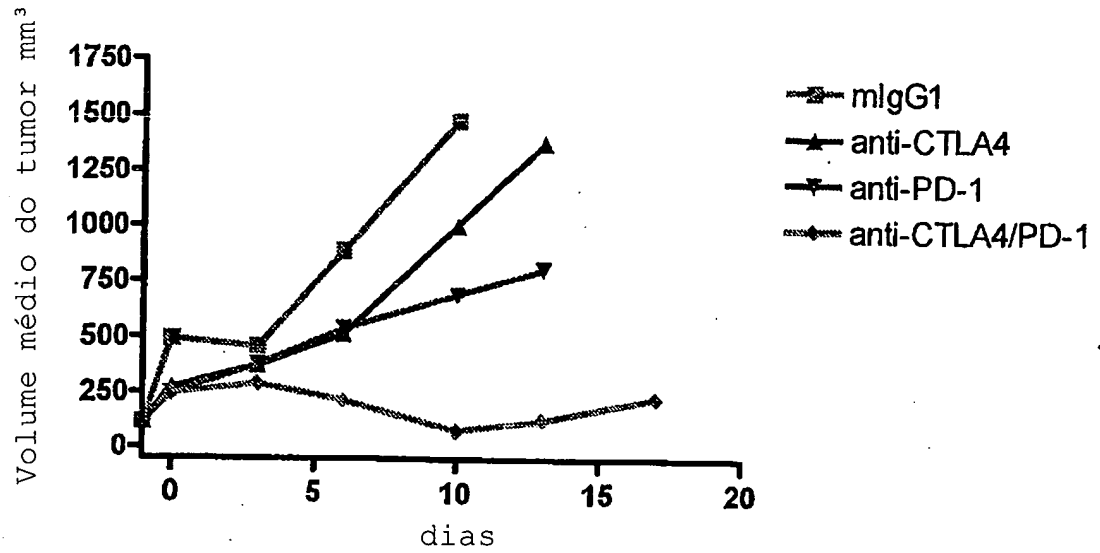


Fig. 25

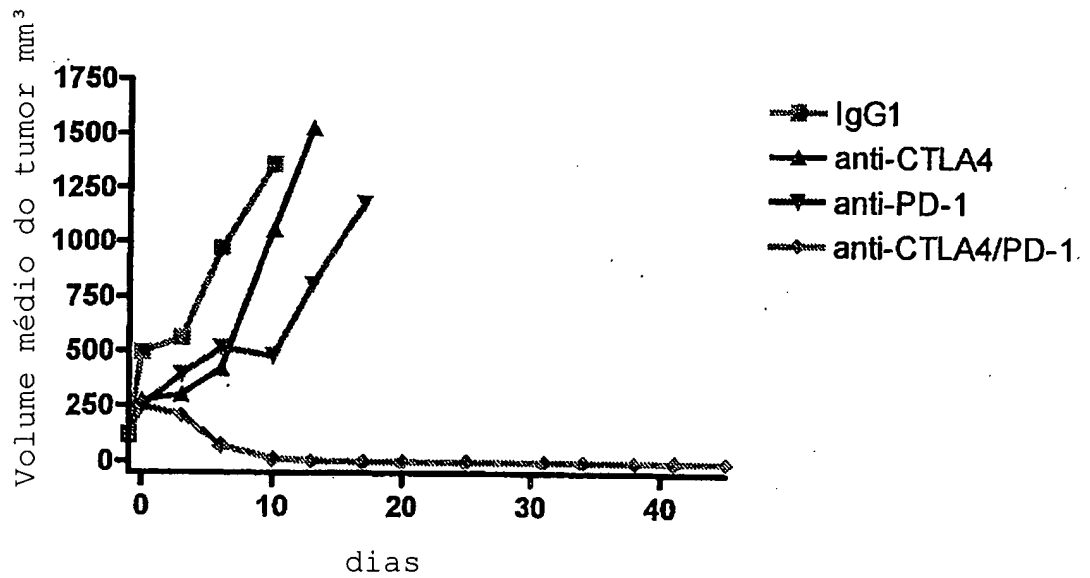


Fig. 26

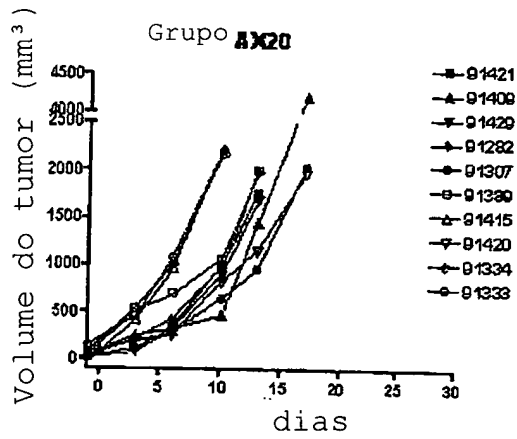


Fig. 27A

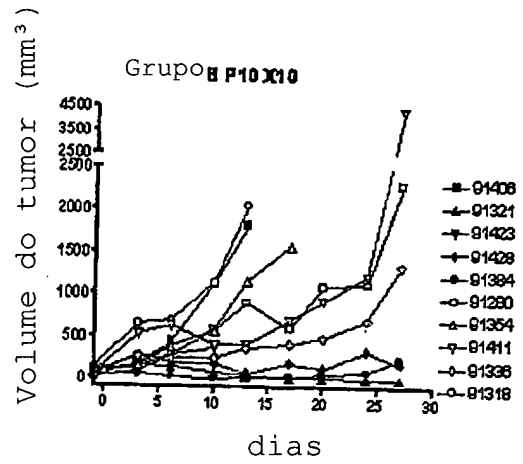


Fig. 27B

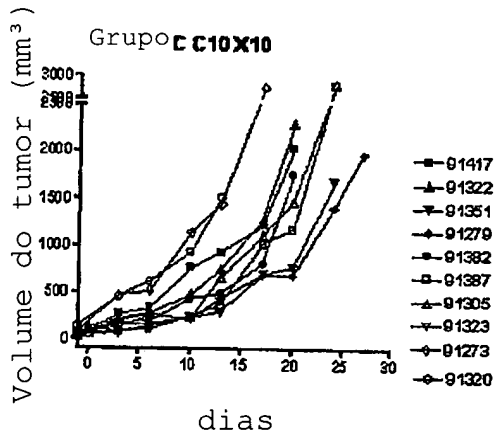


Fig. 27C

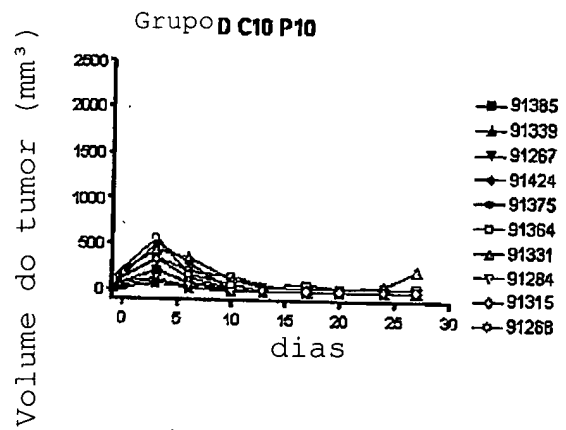


Fig. 27D

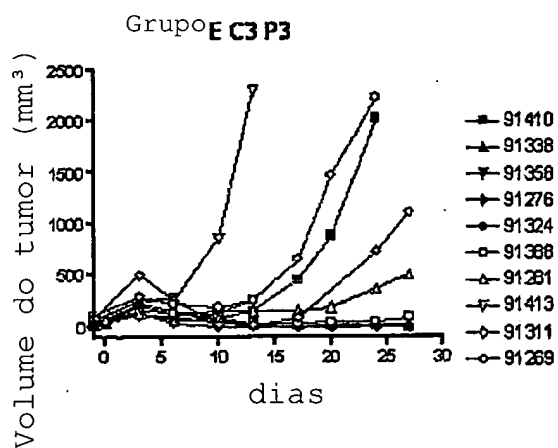


Fig. 27E

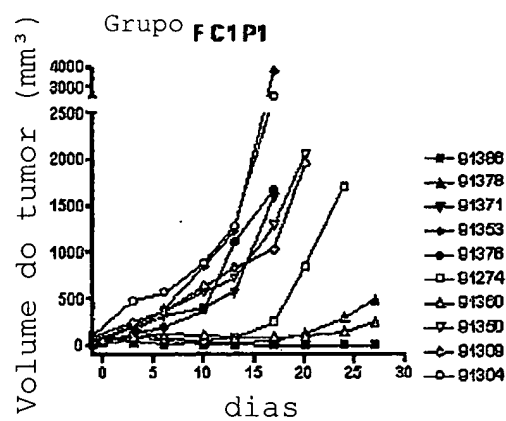


Fig. 27F

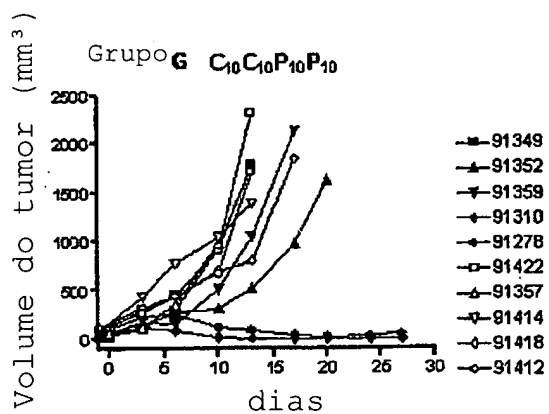


Fig. 27G

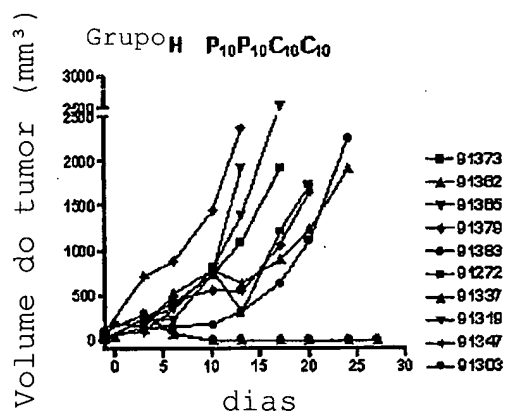


Fig. 27H

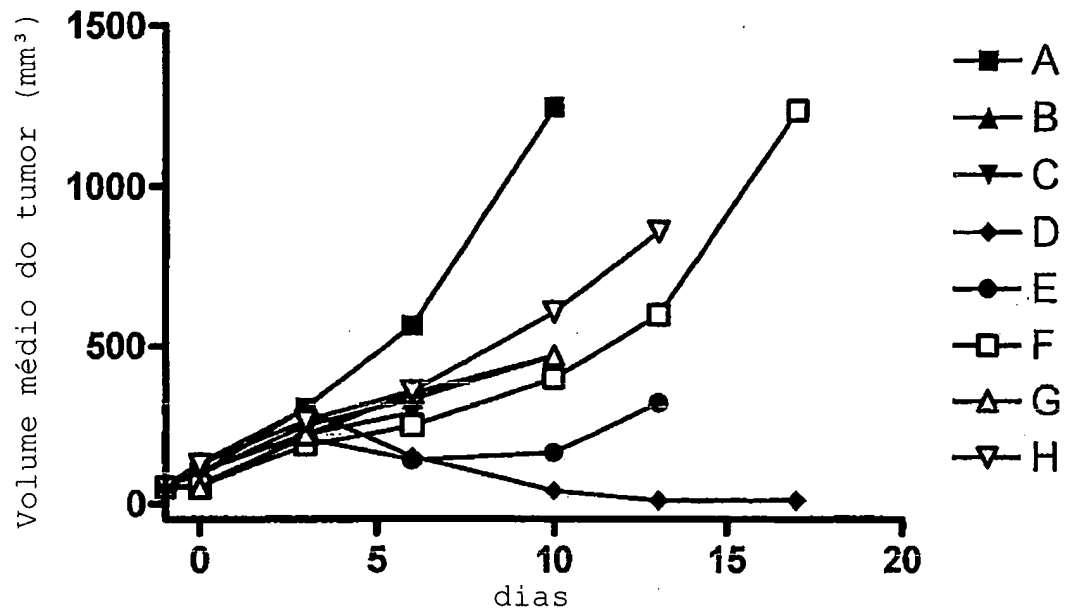


Fig. 28

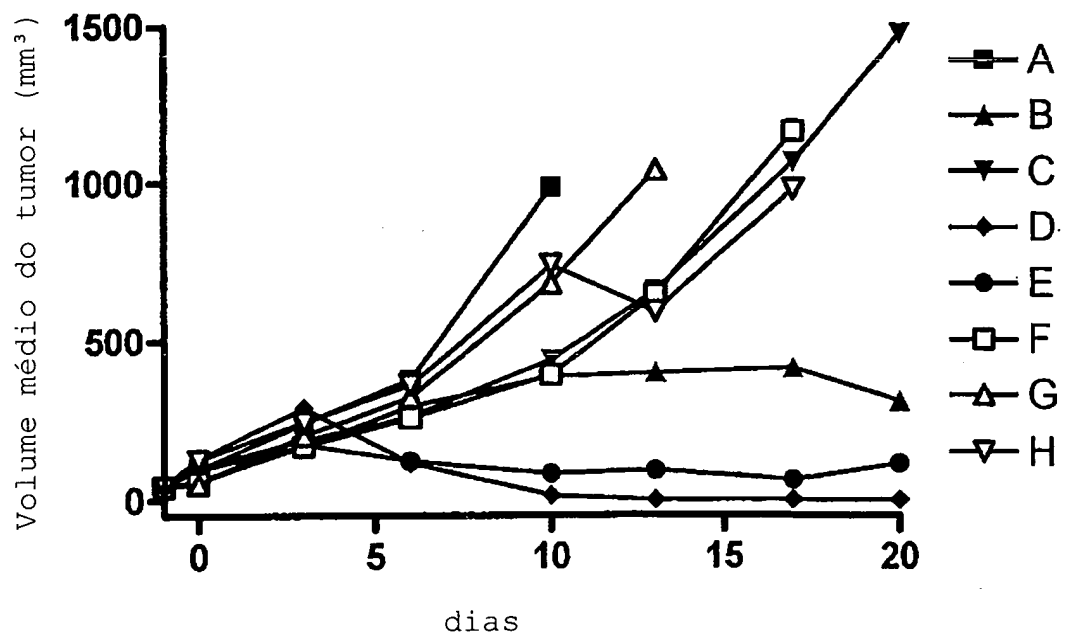


Fig. 29

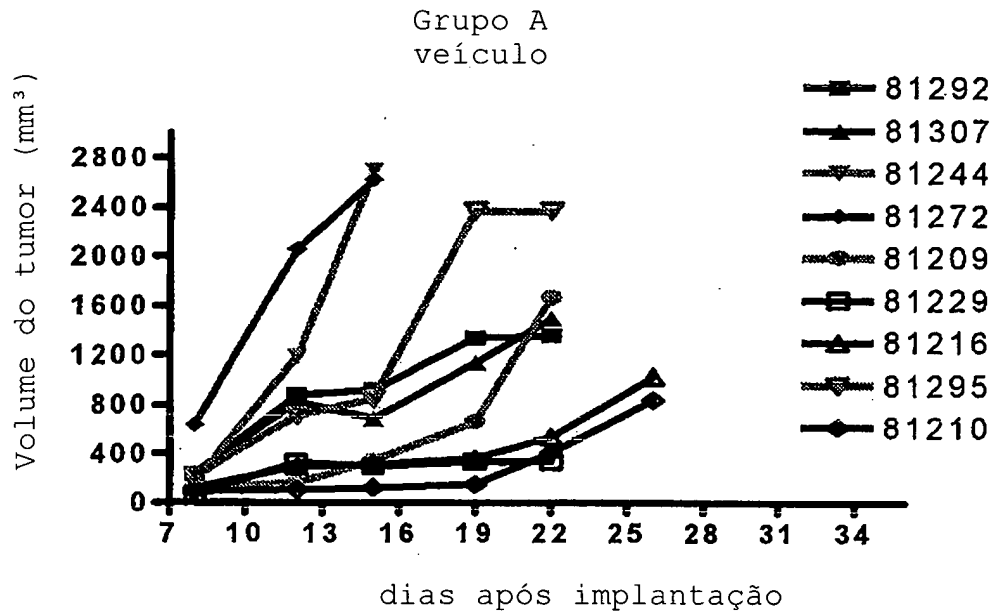


Fig. 30A

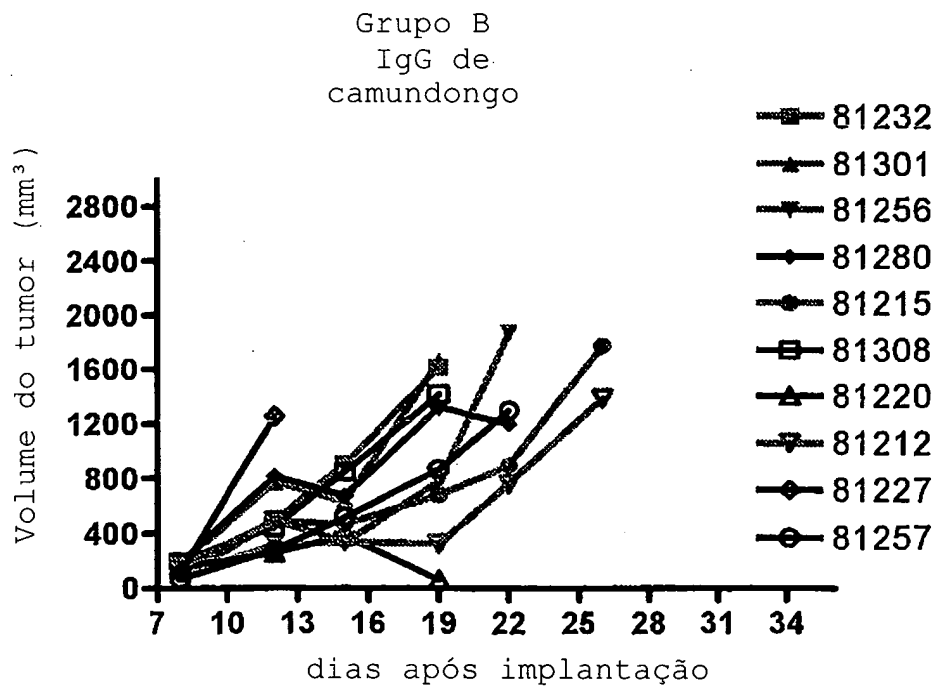


Fig. 30B

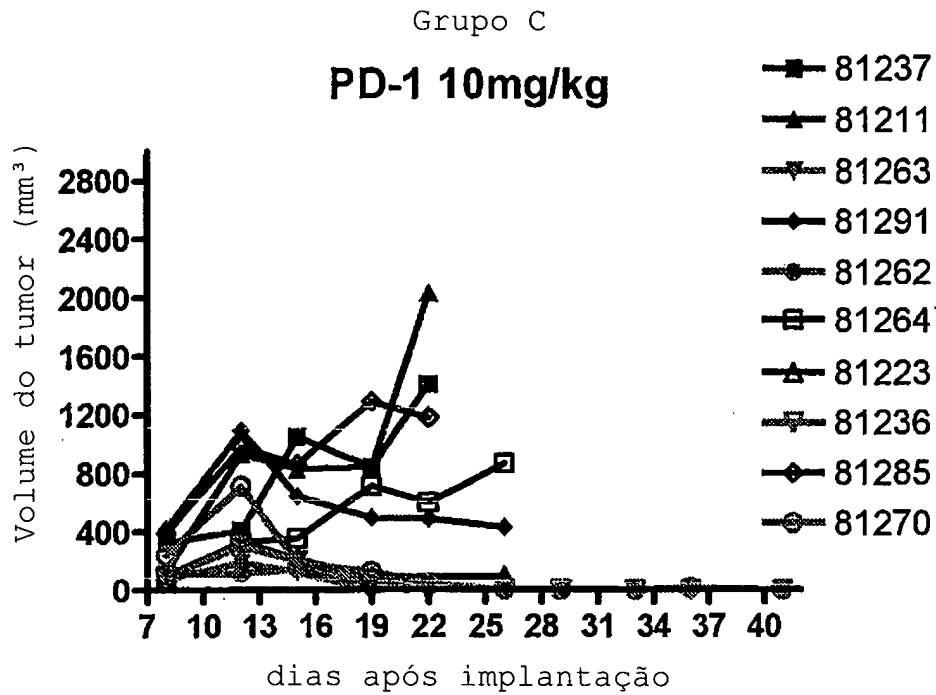


Fig. 30C

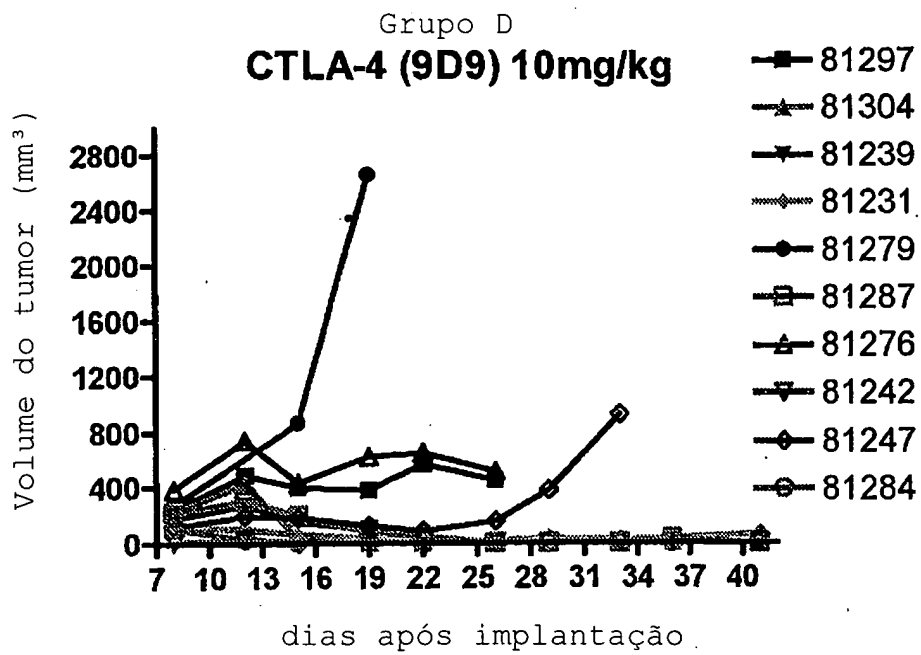


Fig. 30D

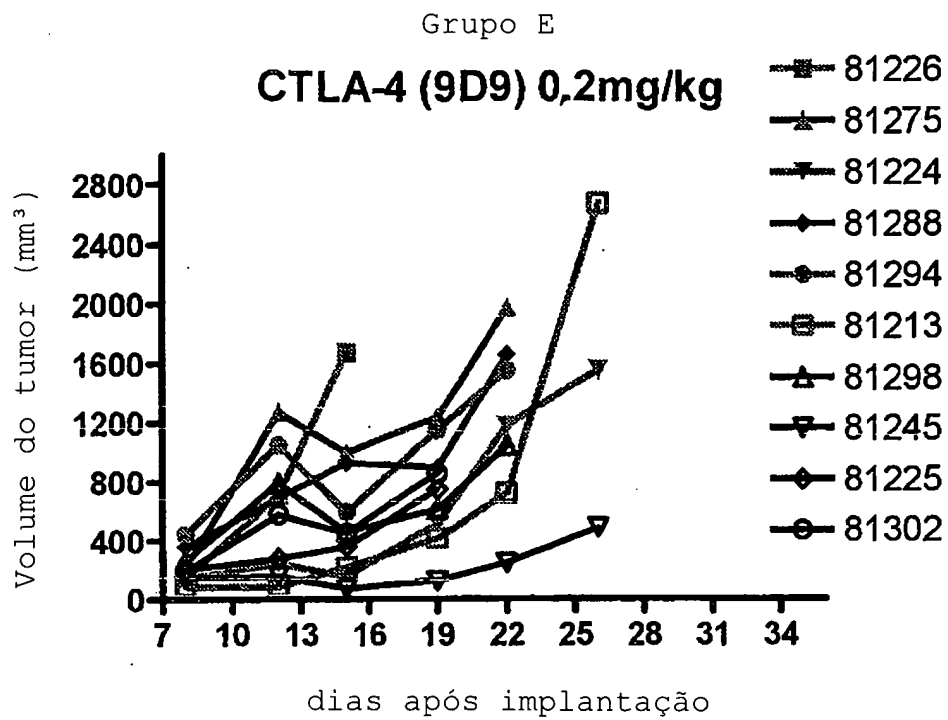


Fig. 30E

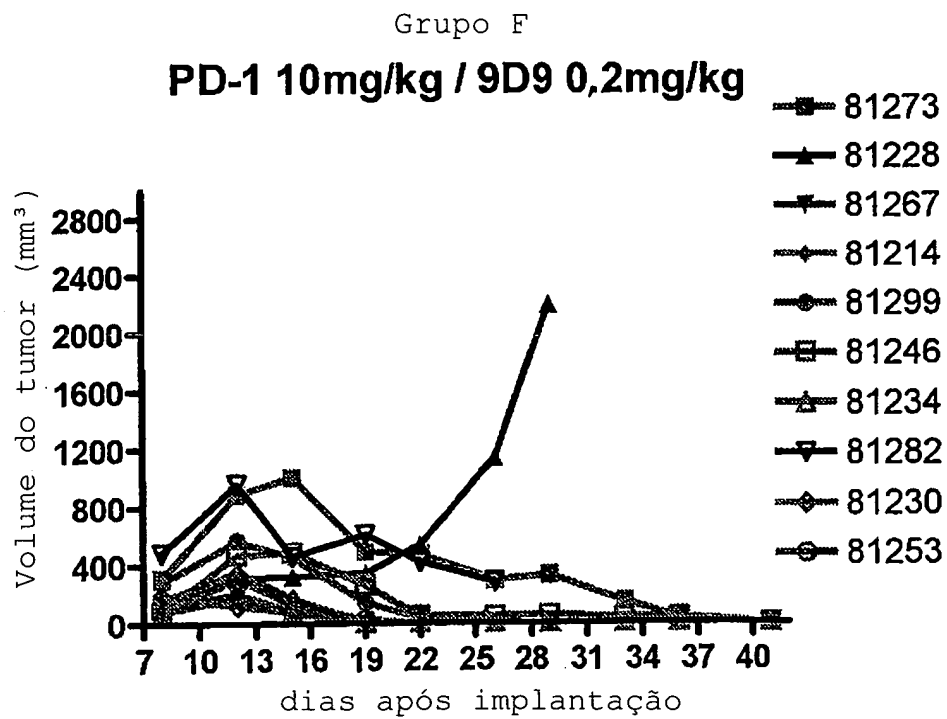


Fig. 30F

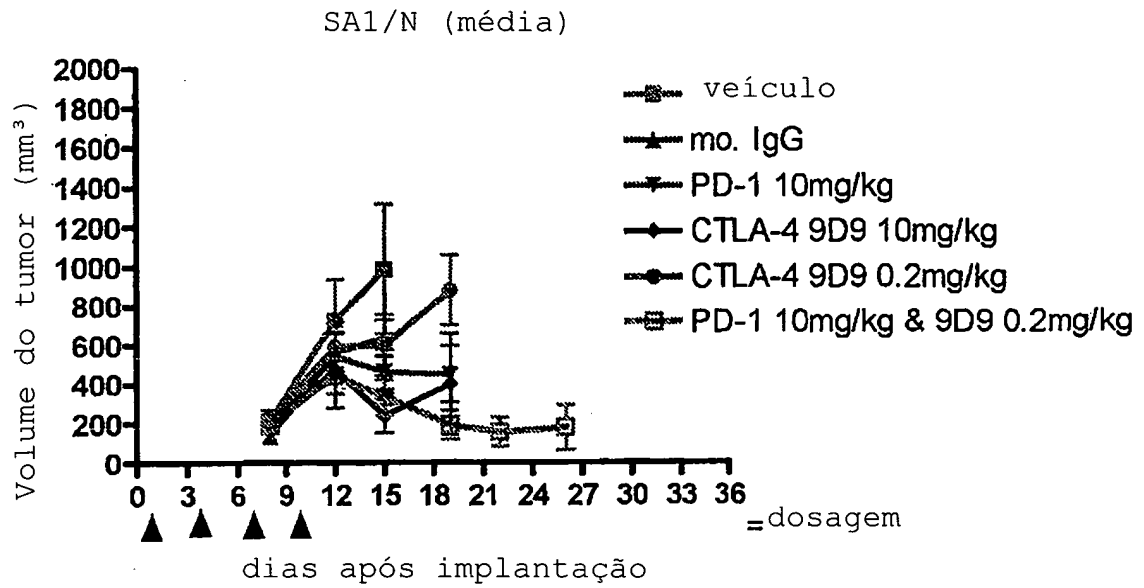


Fig. 31

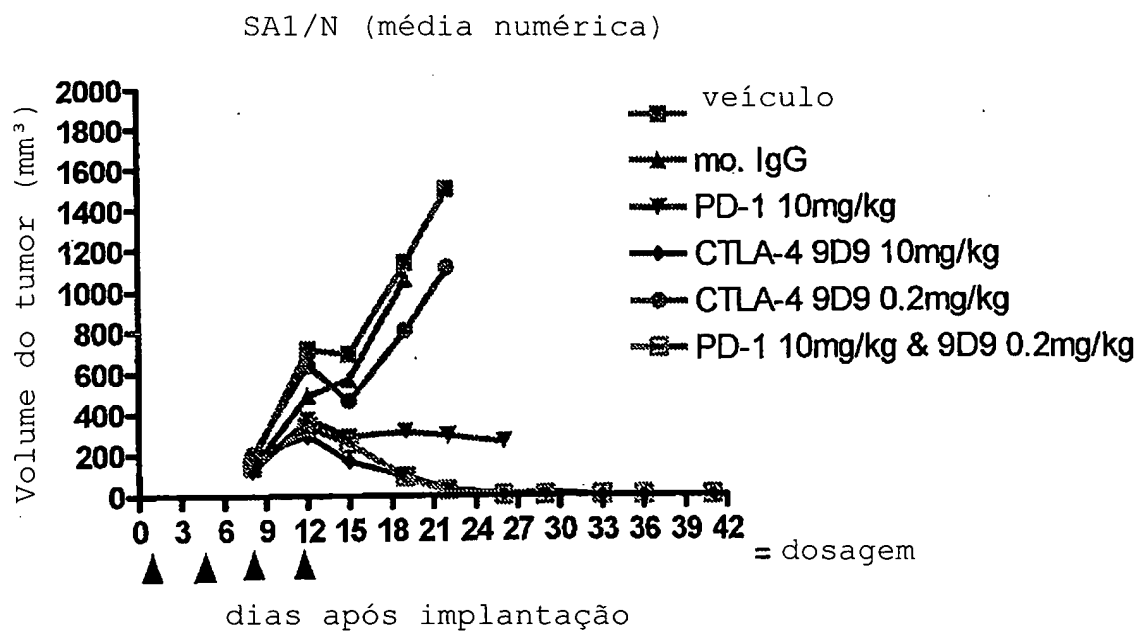


Fig. 32

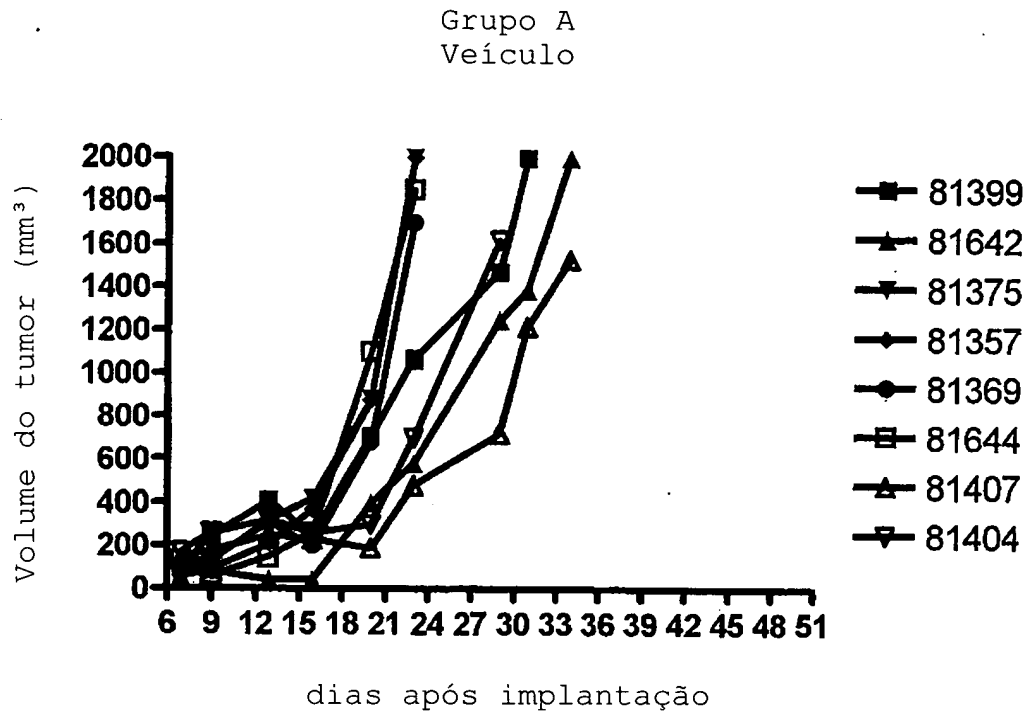


Fig. 33A

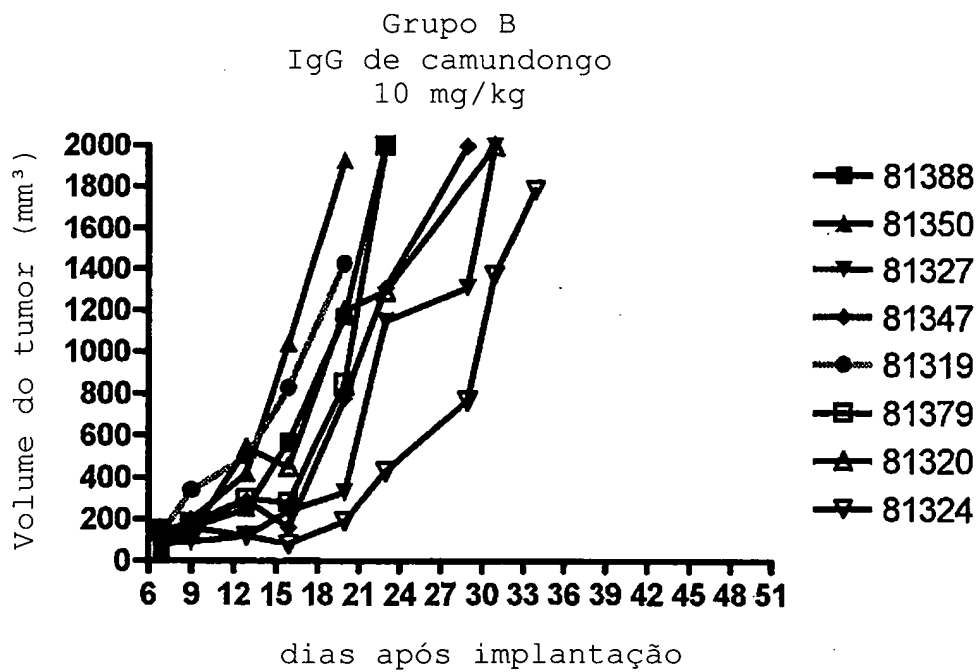


Fig. 33B

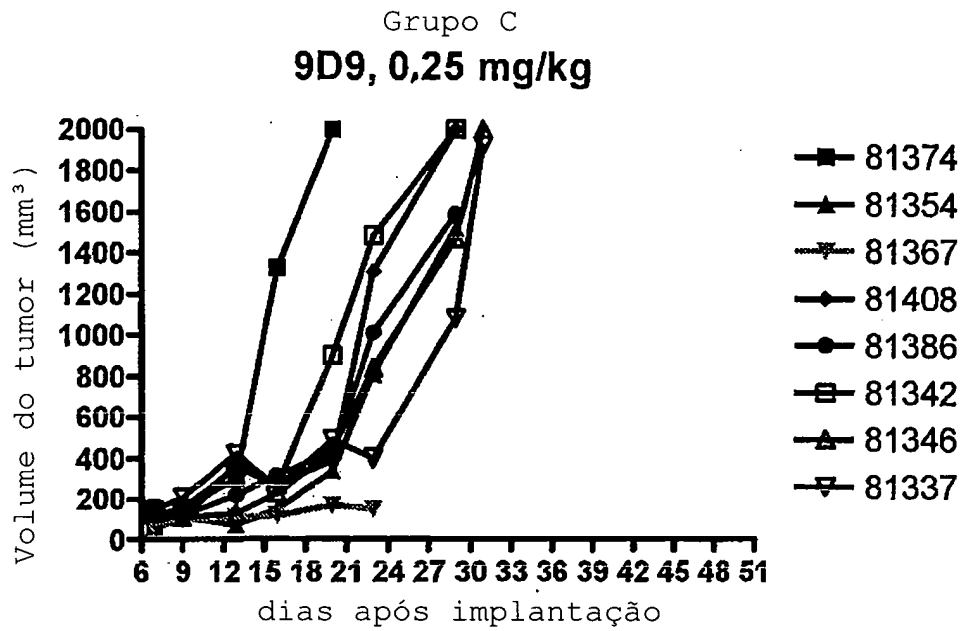


Fig. 33C

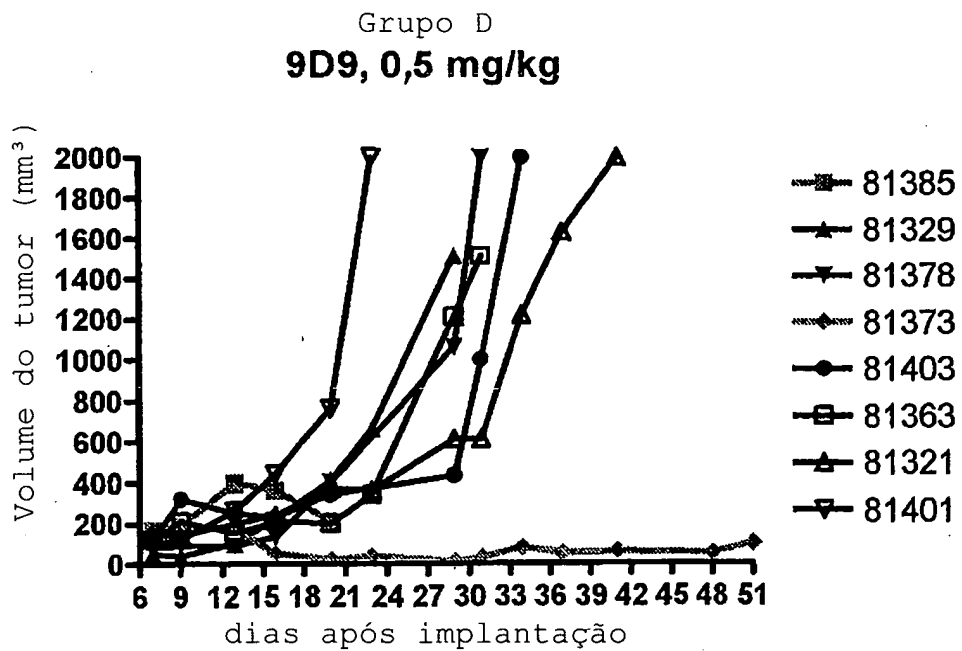


Fig. 33D

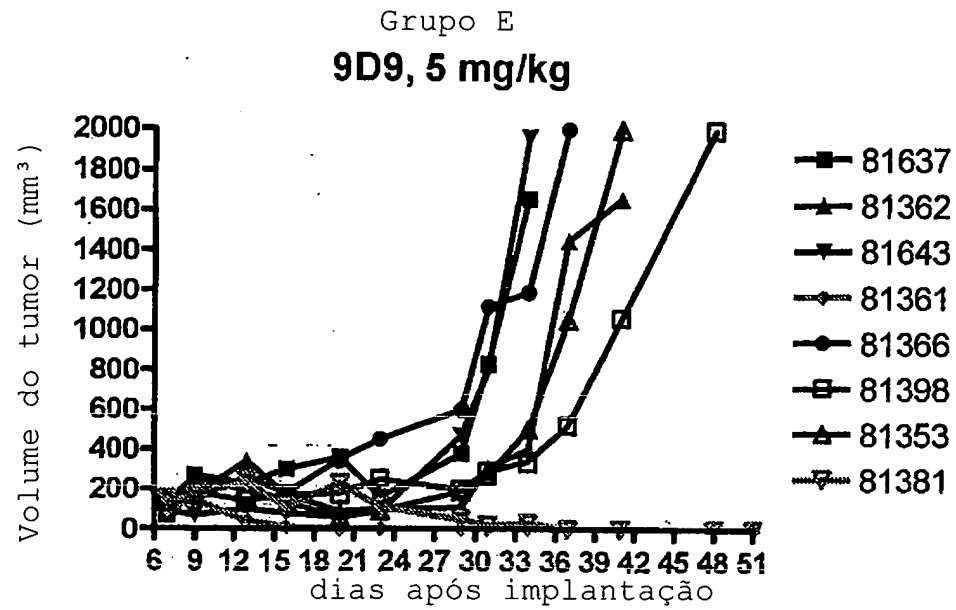


Fig. 33E

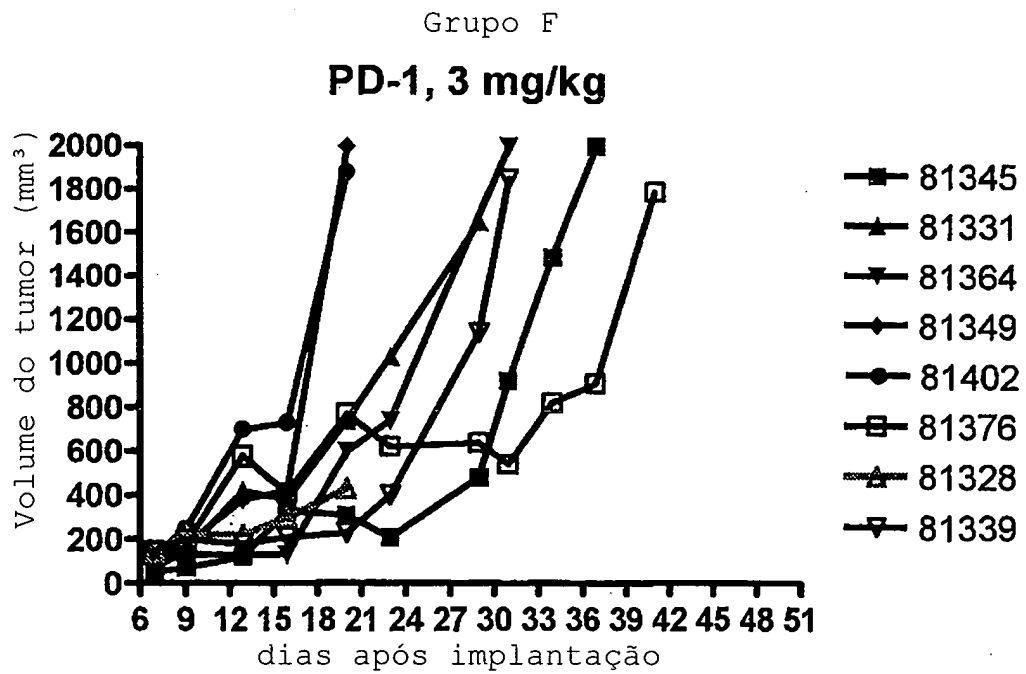


Fig. 33F

Grupo G

PD-1, 10 mg/kg

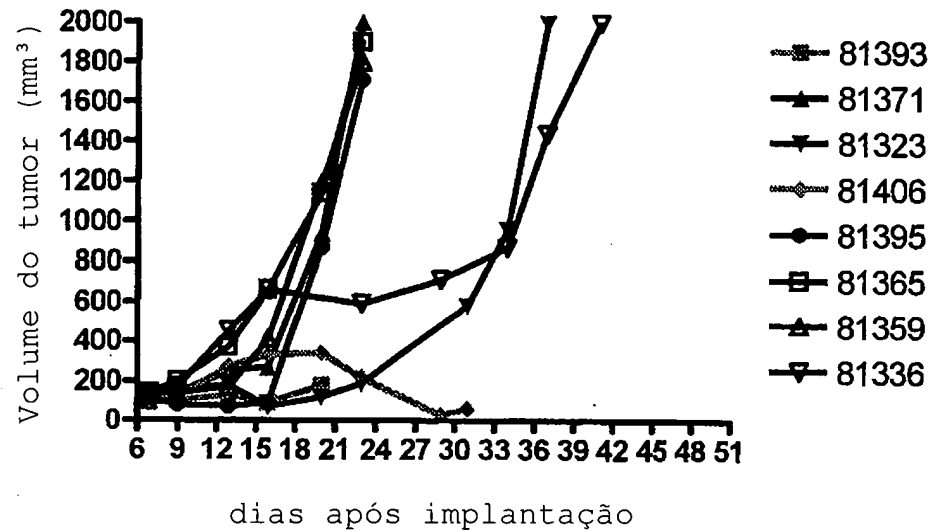


Fig. 33G

Grupo H

PD-1+9D9, 10+0,25 mg/kg

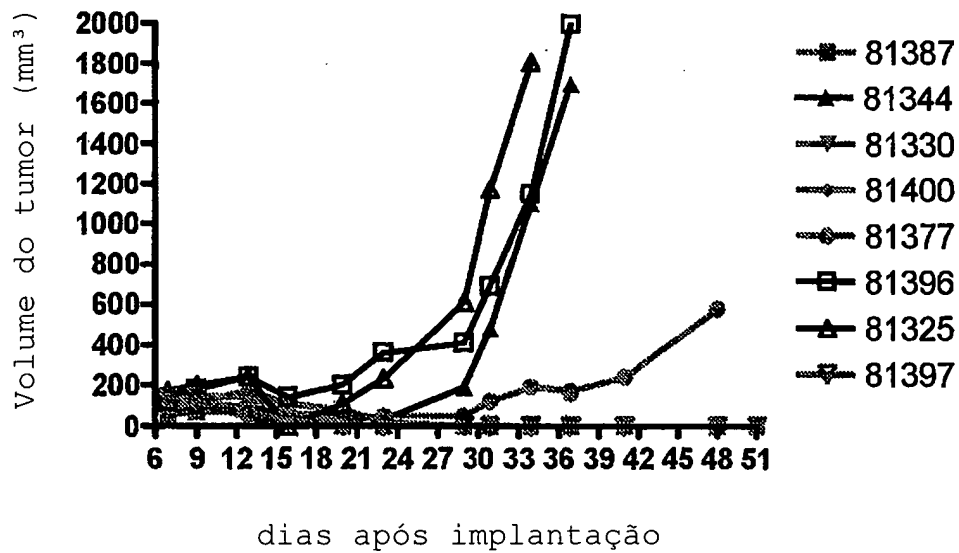


Fig. 33H

Grupo I

PD-1+9D9, 10+0,5 mg/kg

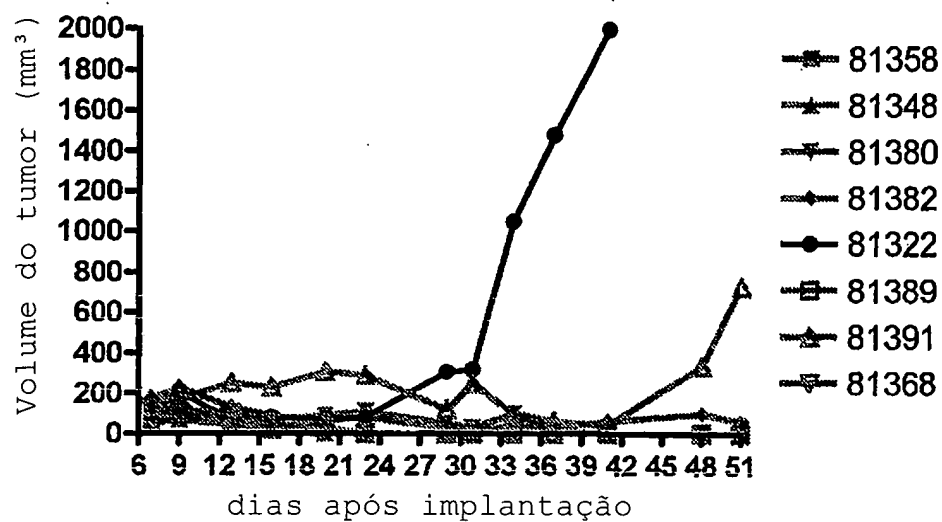


Fig. 33I

Grupo J

PD-1+9D9, 3+0,5 mg/kg

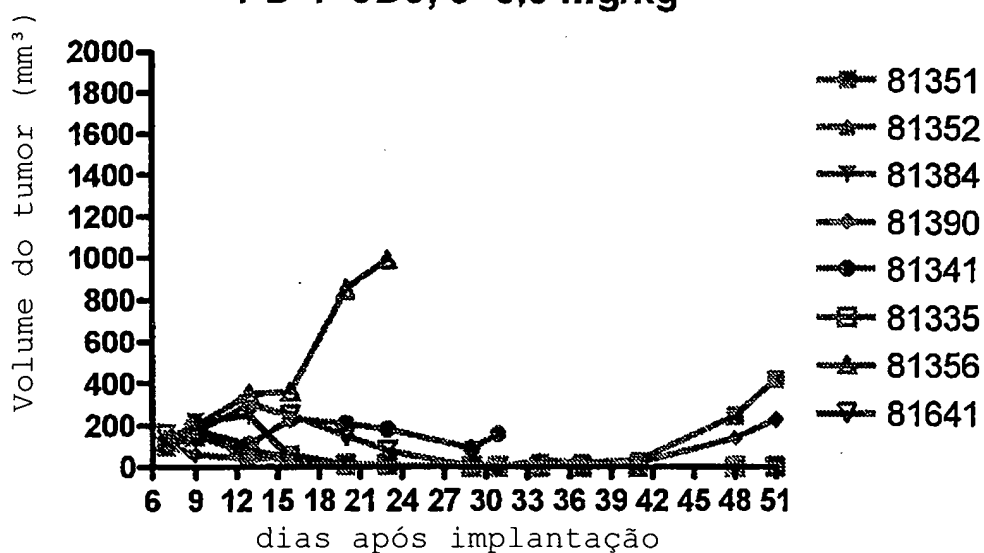


Fig. 33J

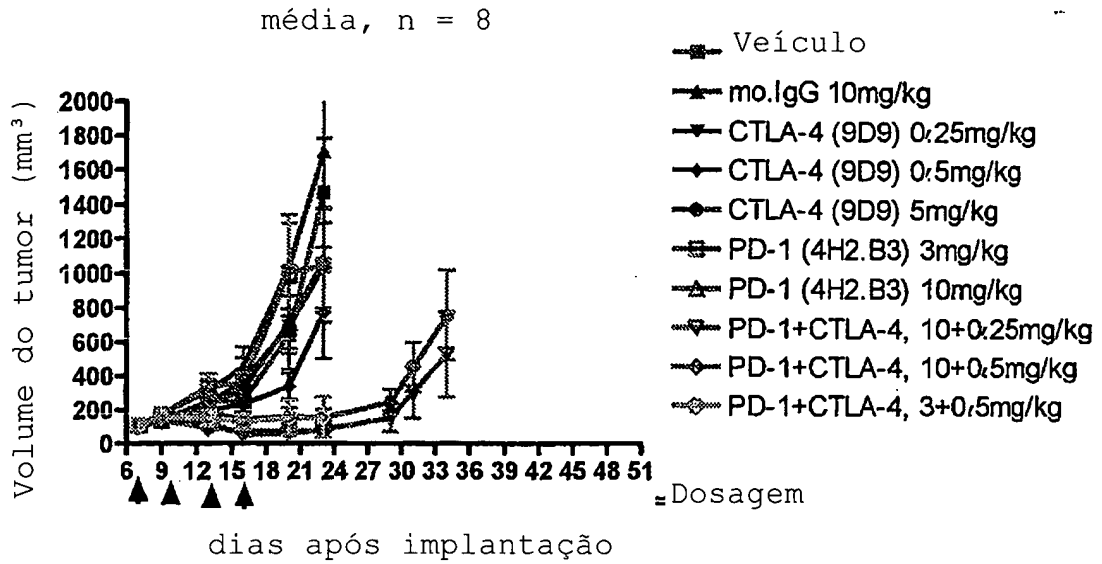


Fig. 34

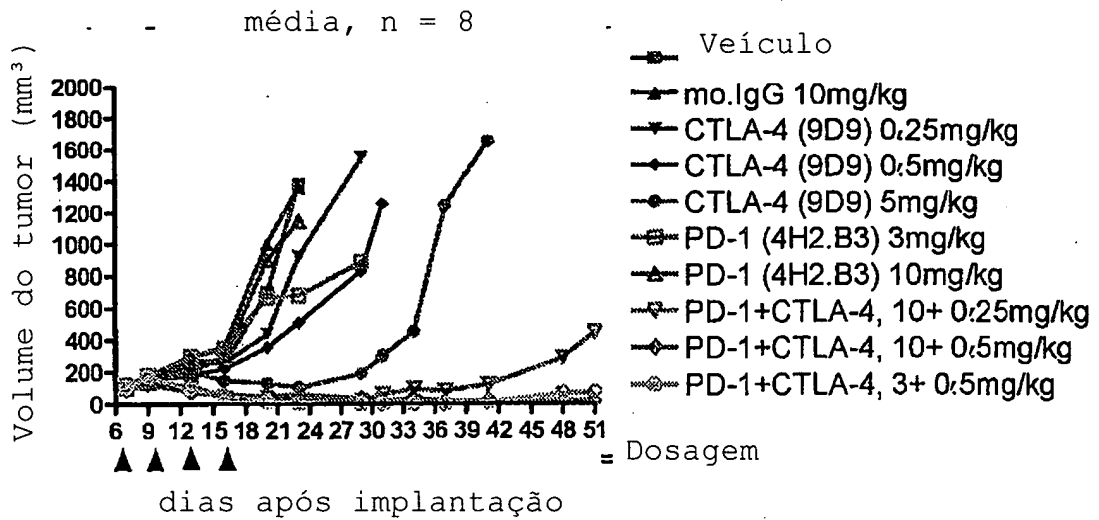


Fig. 35

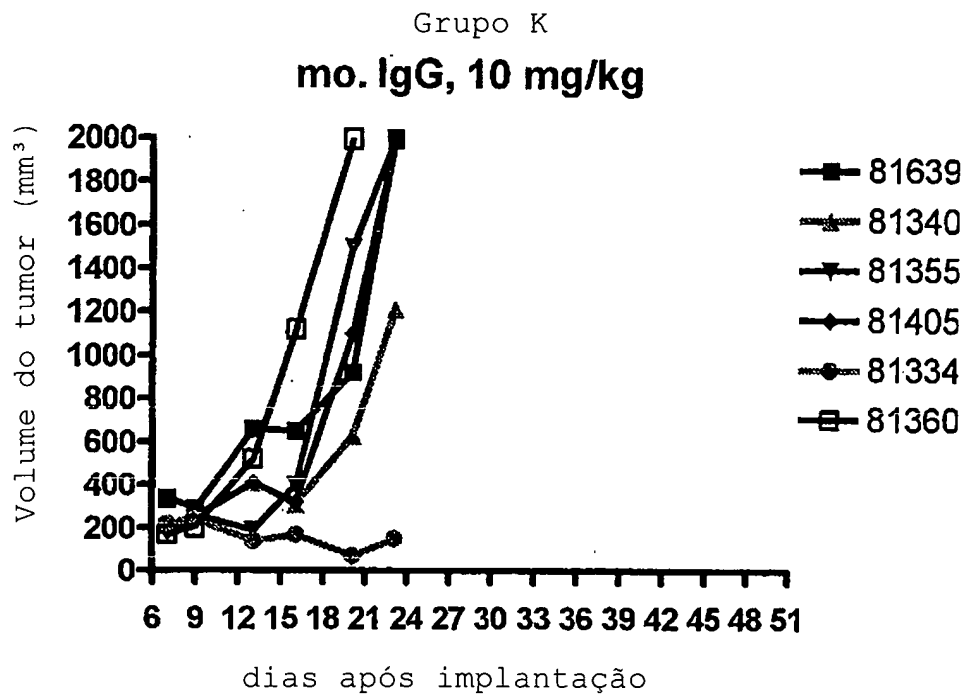


Fig. 36A

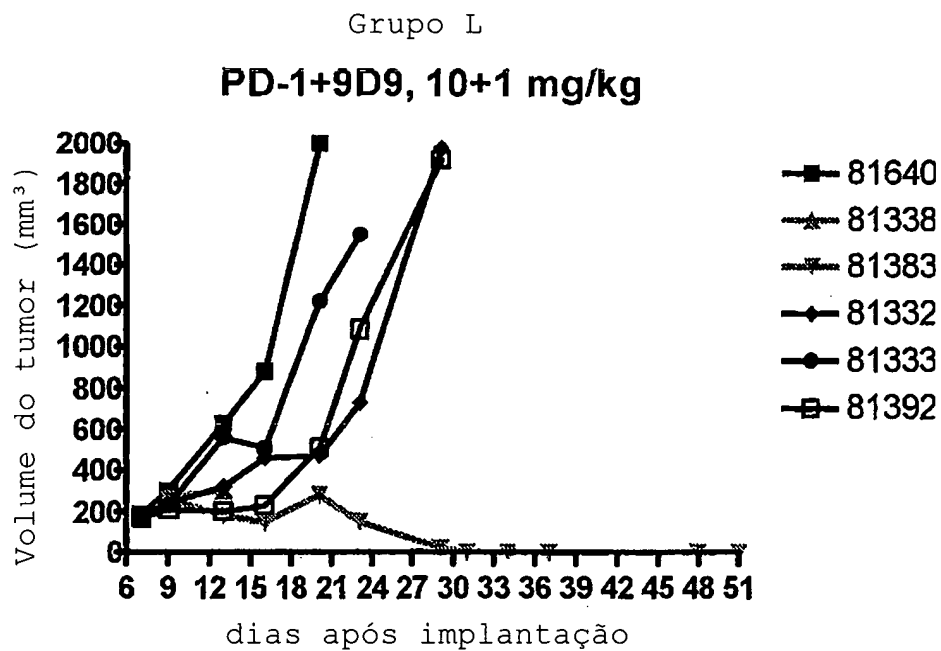


Fig. 36B

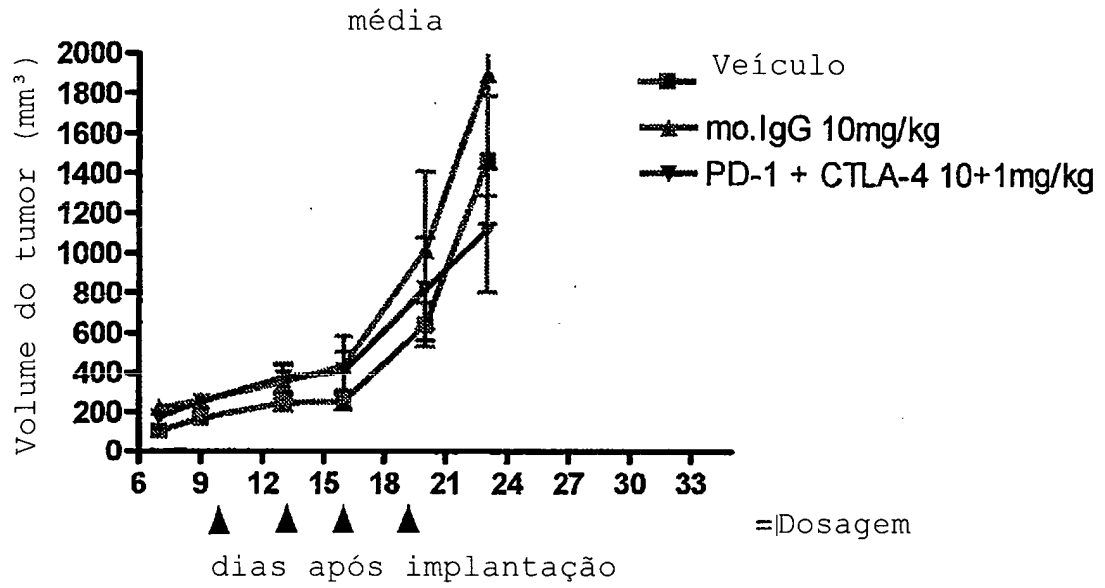


Fig. 37

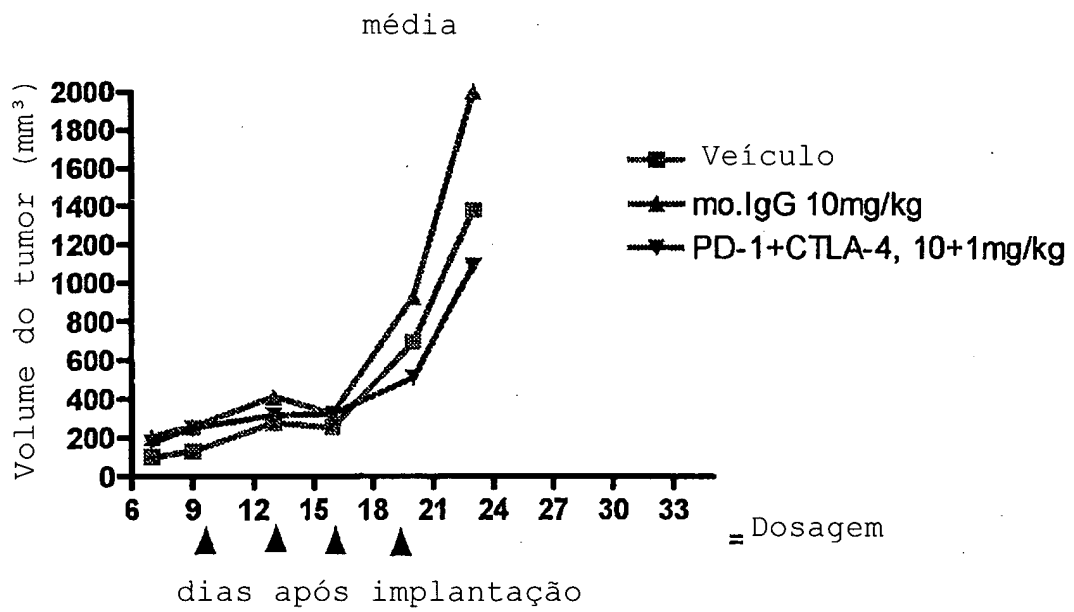


Fig. 38

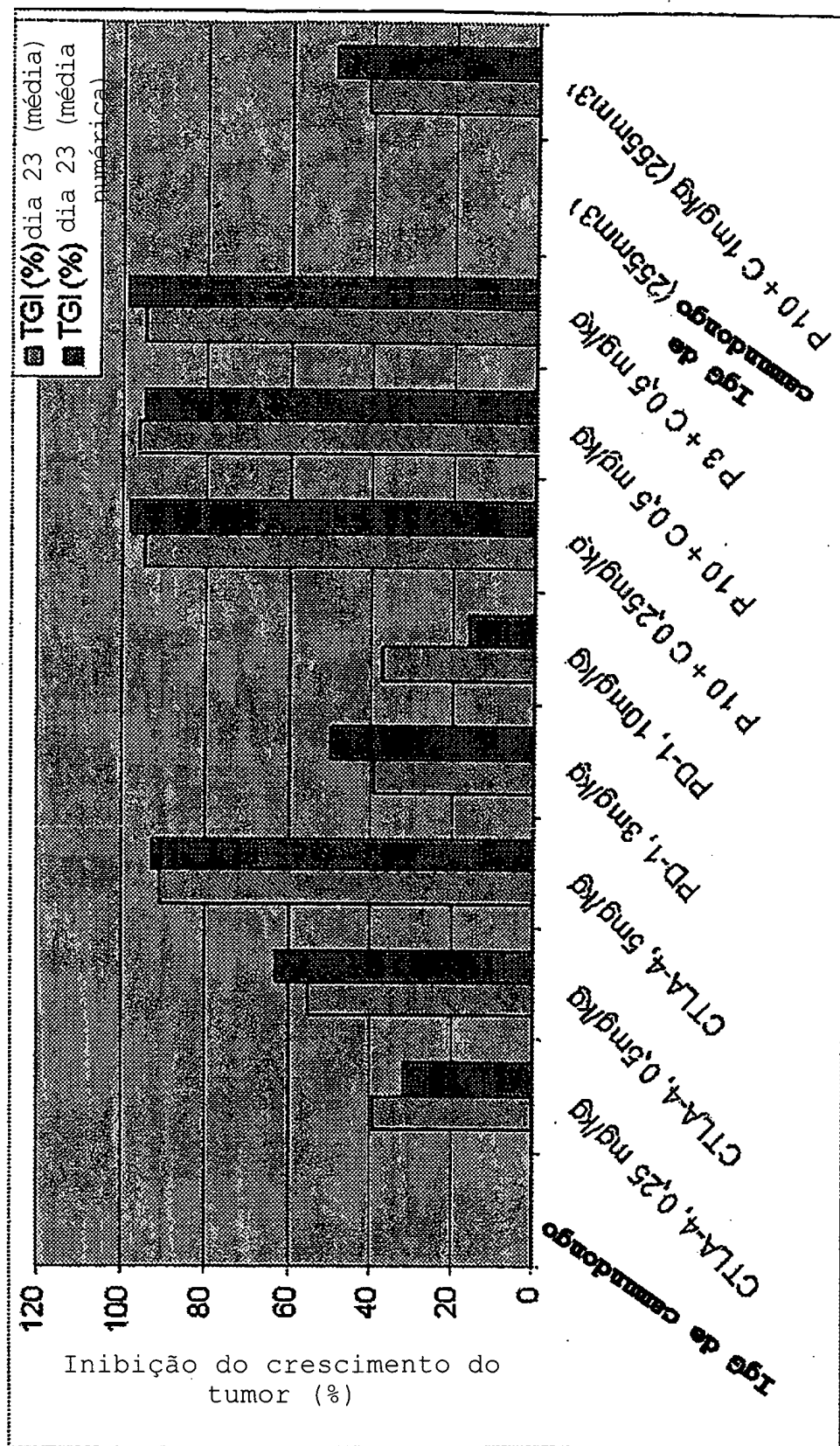
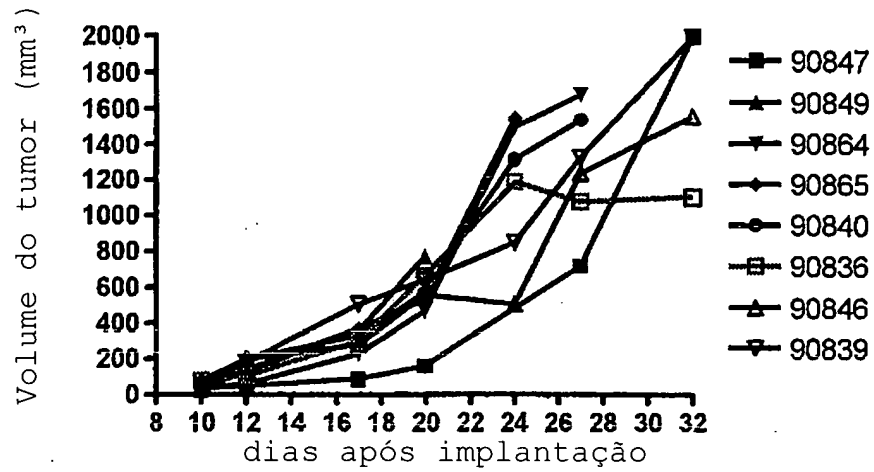


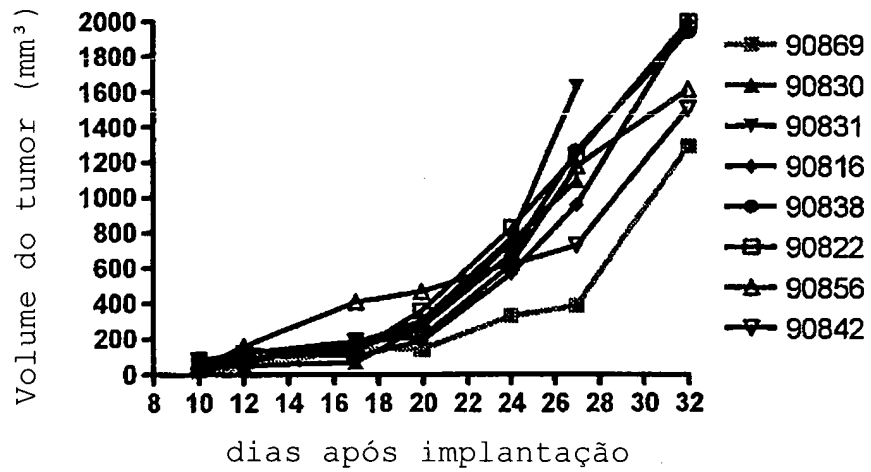
Fig. 39

Grupo B
IgG de
camundongo



Grupo C

PD-1 (4H2.B3) 10mg/kg



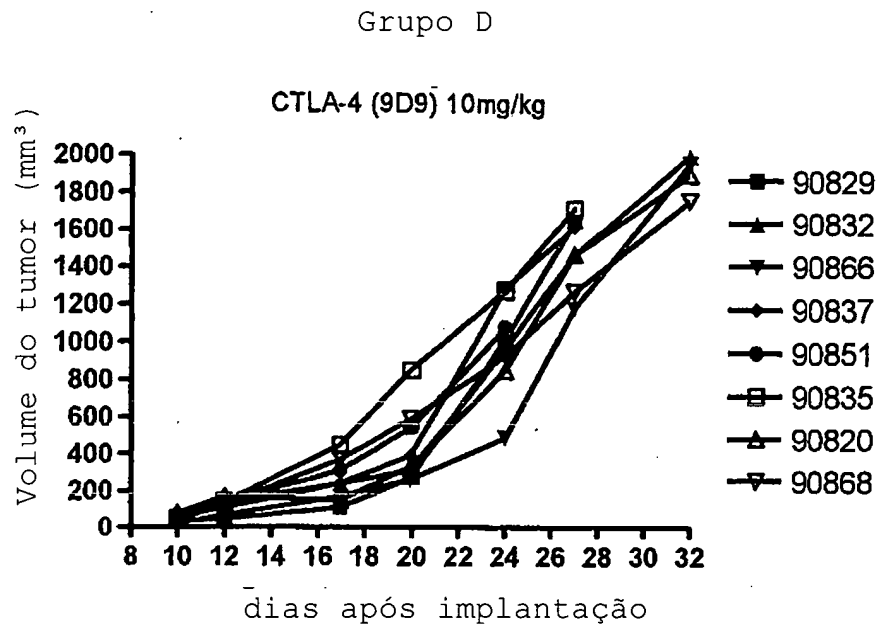


Fig. 40C

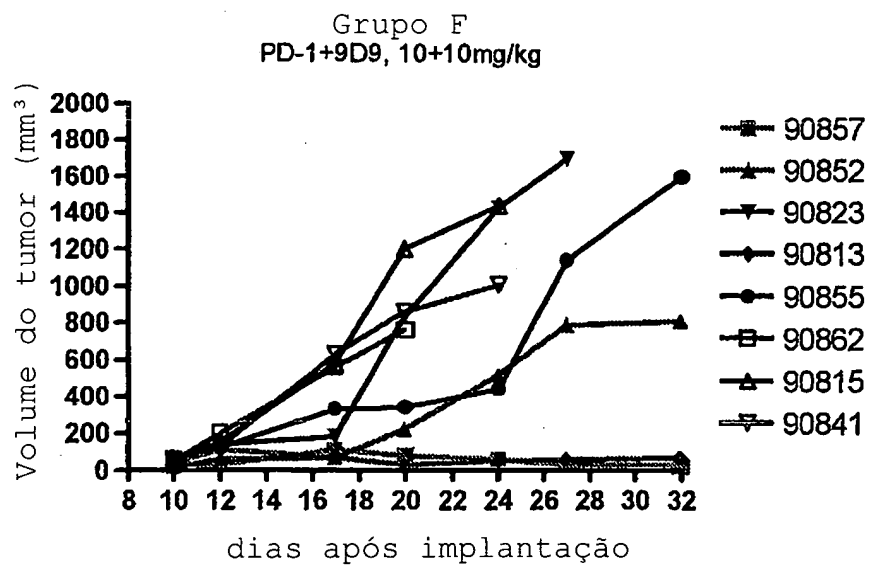


Fig. 40D

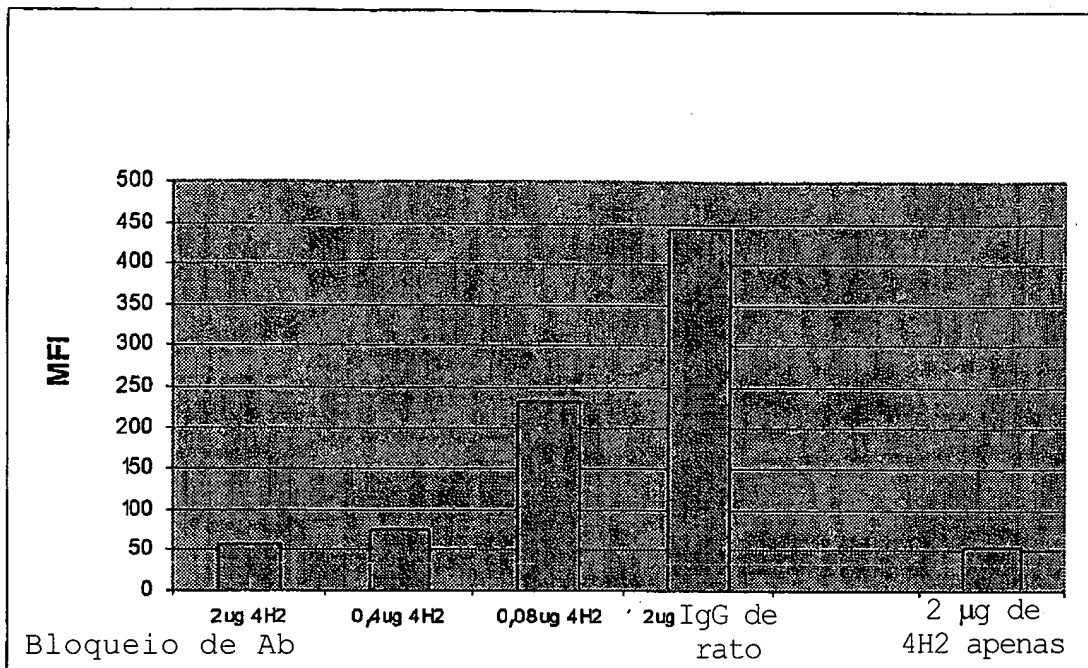


Fig. 41

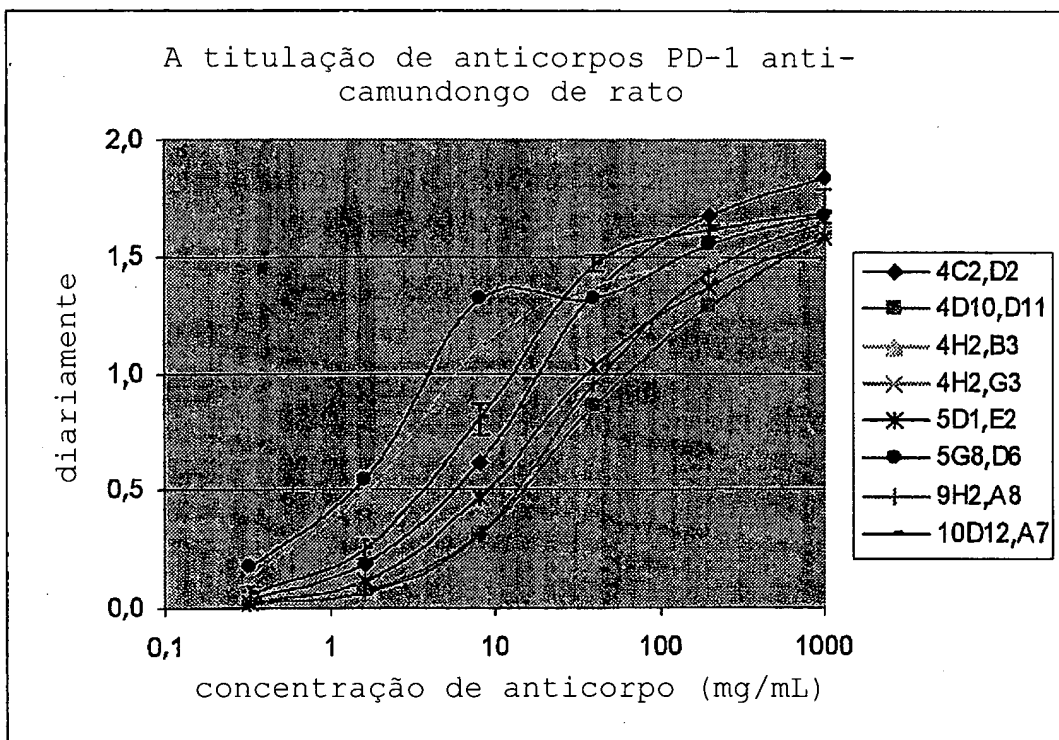


Fig. 42

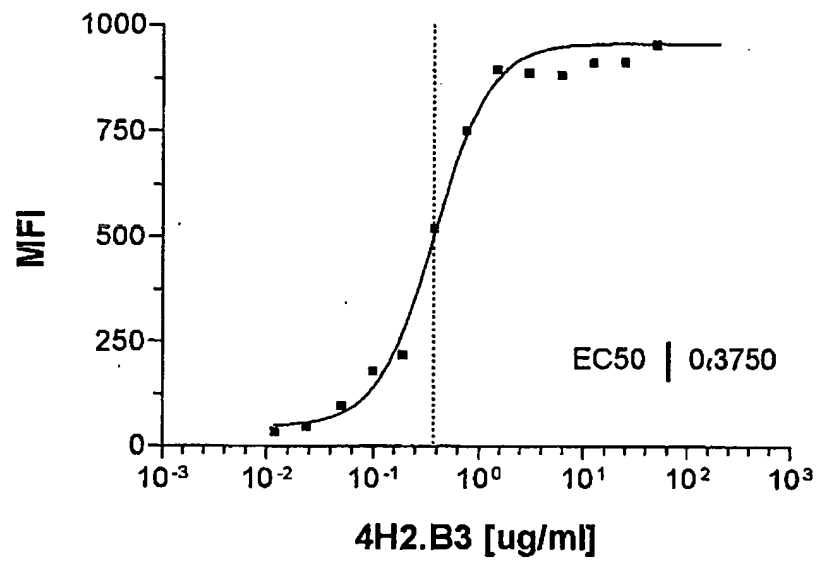


Fig. 43

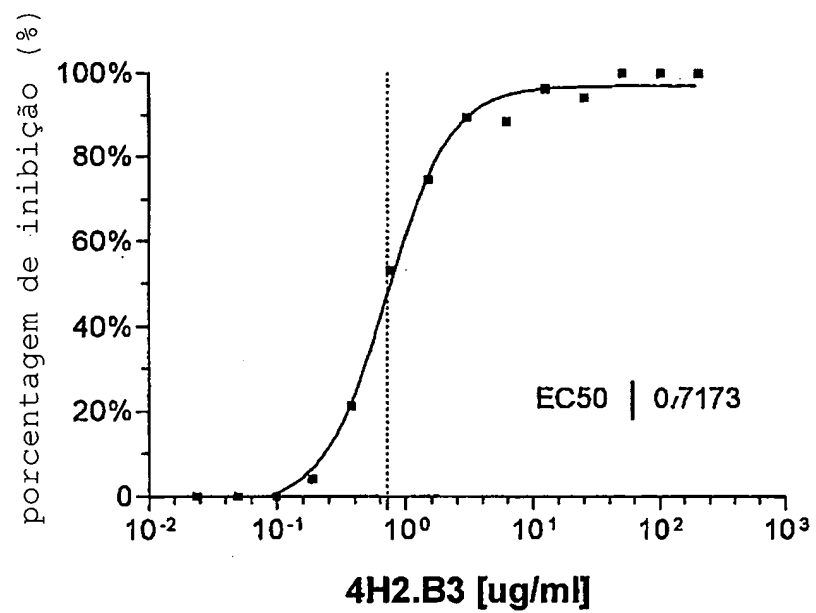


Fig. 44

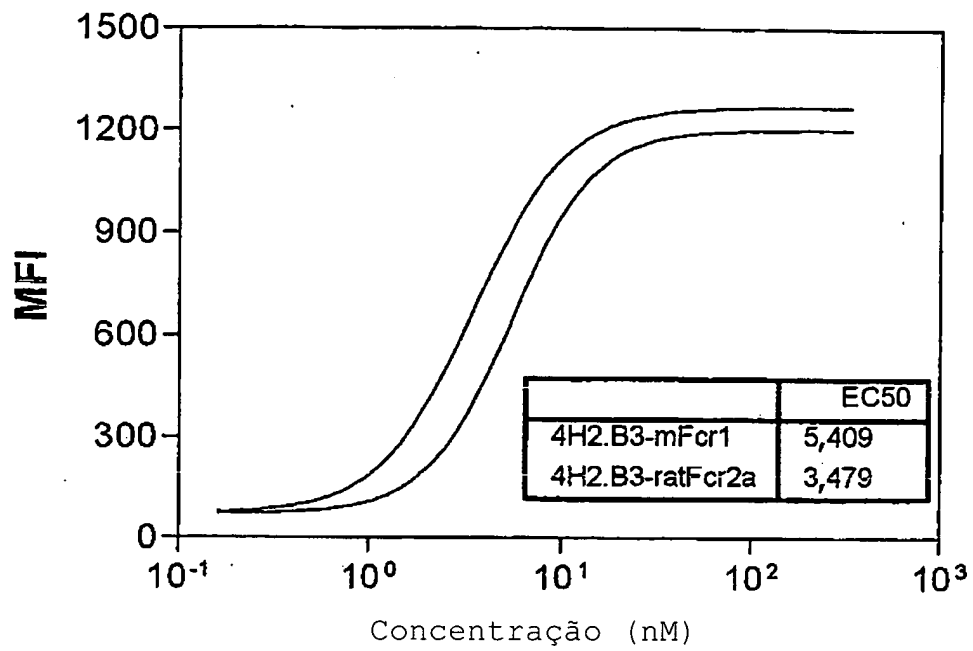


Fig. 45

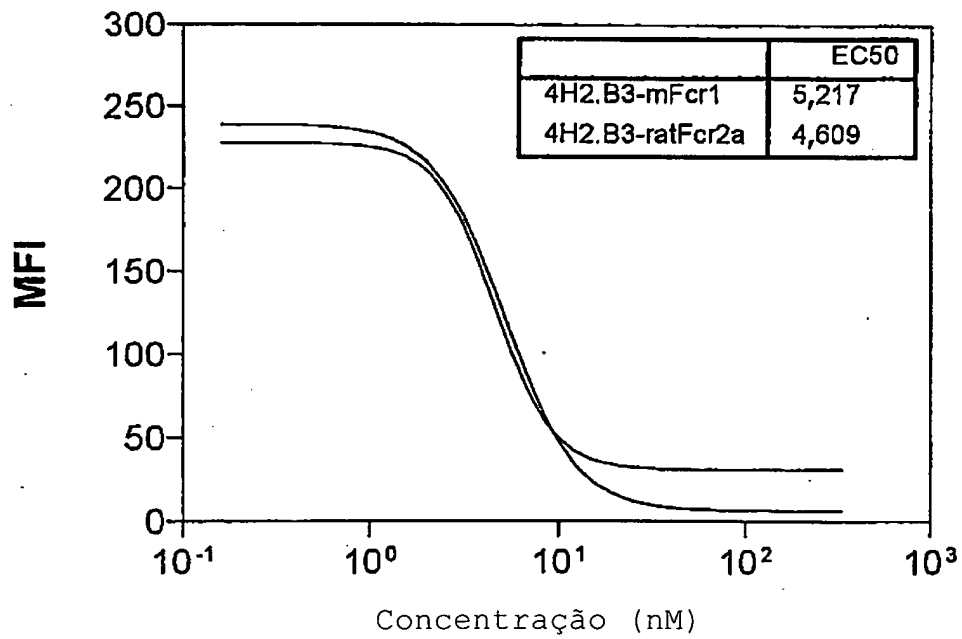


Fig. 46

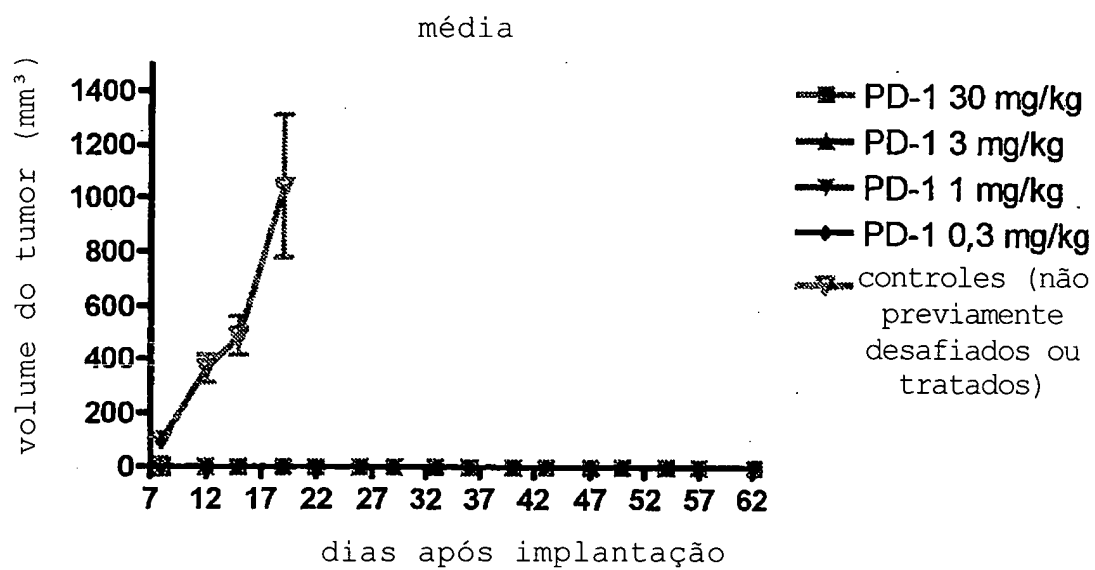


Fig. 47

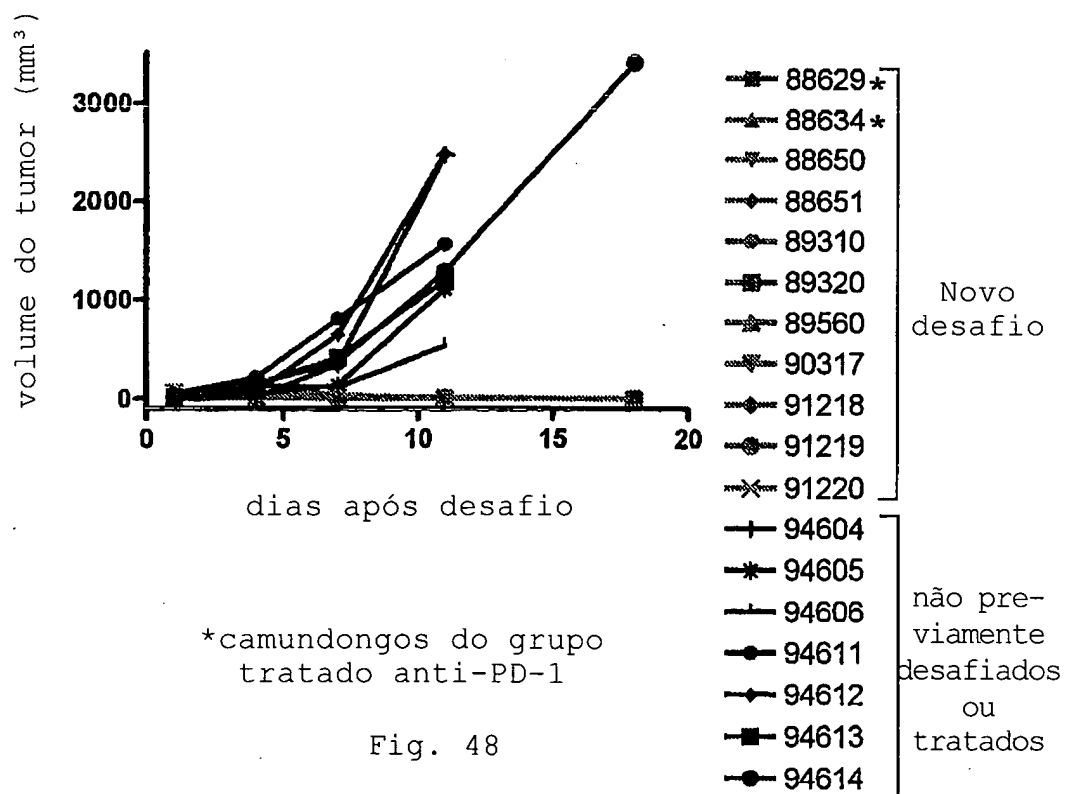


Fig. 48

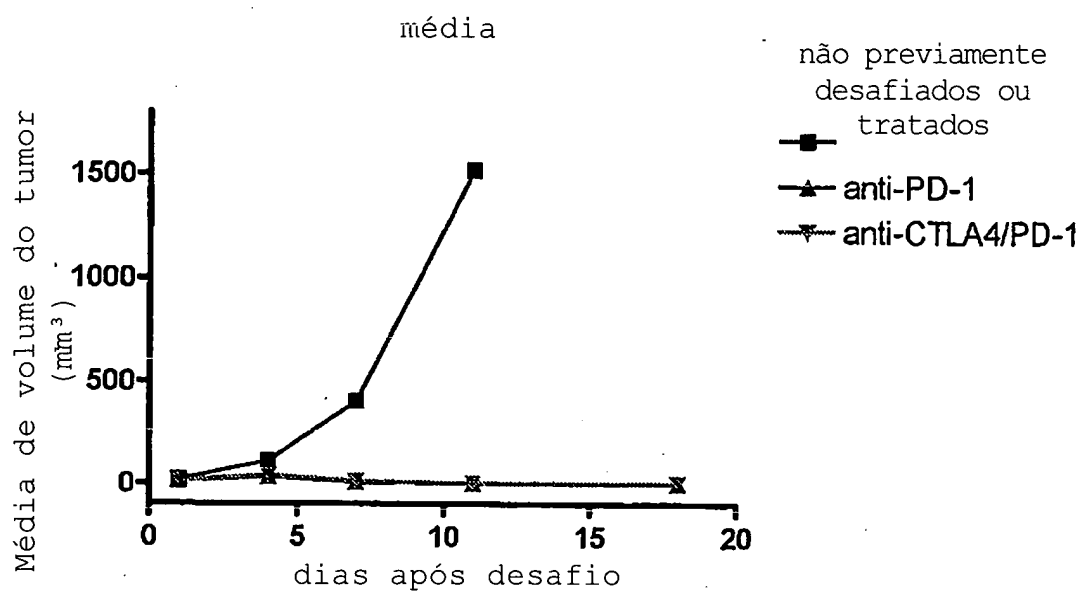


Fig. 49

Estudo de eficácia de
CT26, Camundongos Balb/C
(média numérica, n = 10)

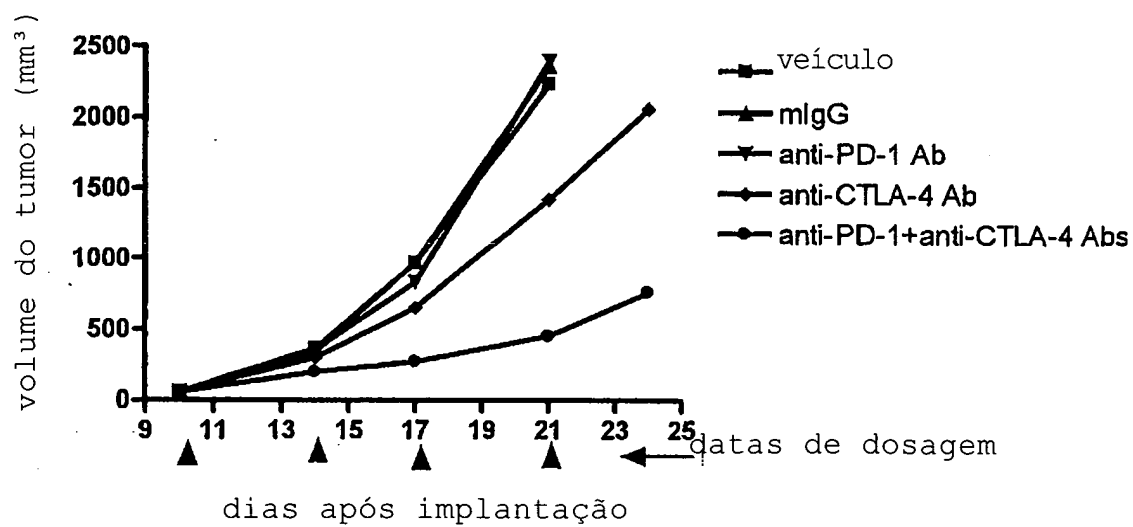


Fig. 50

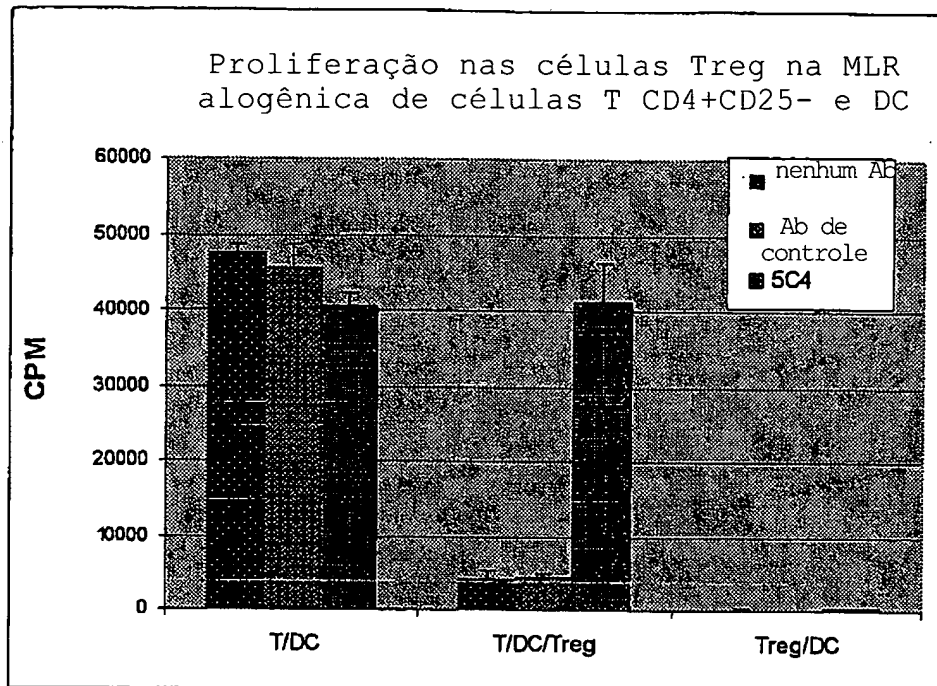


Fig. 51A

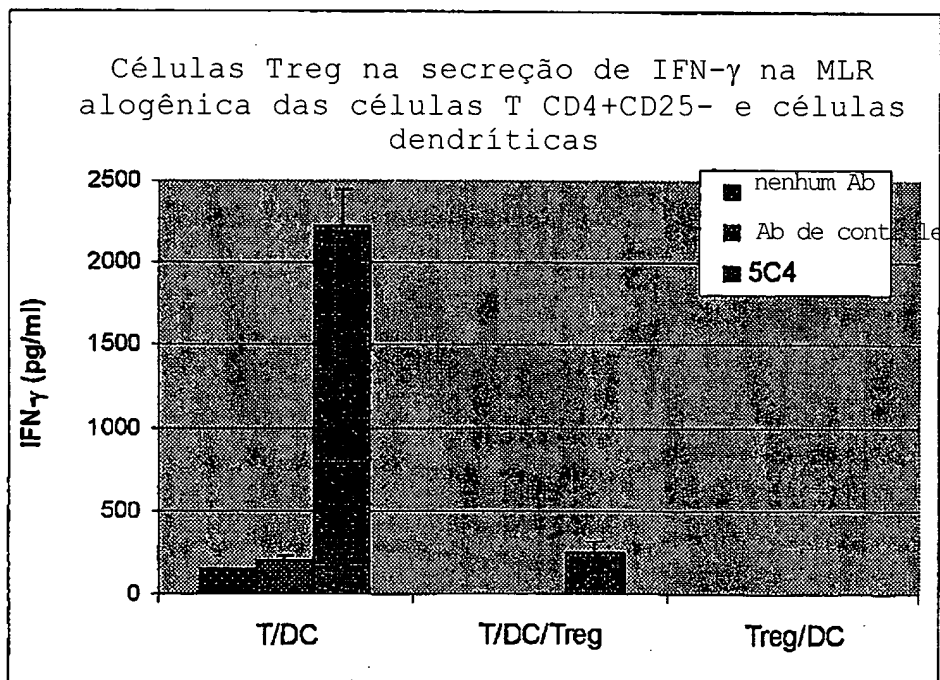


Fig. 51B

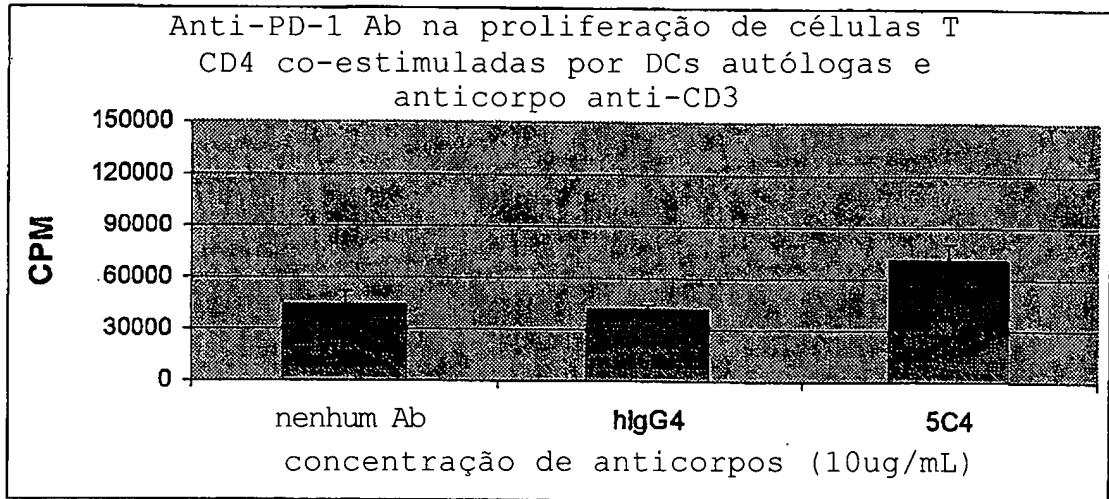


Fig. 52A

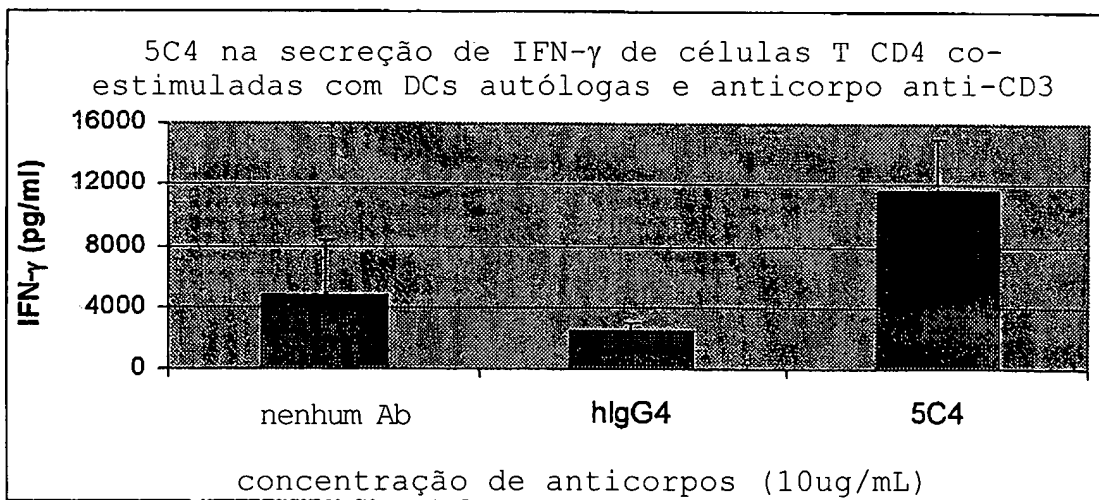


Fig. 52B

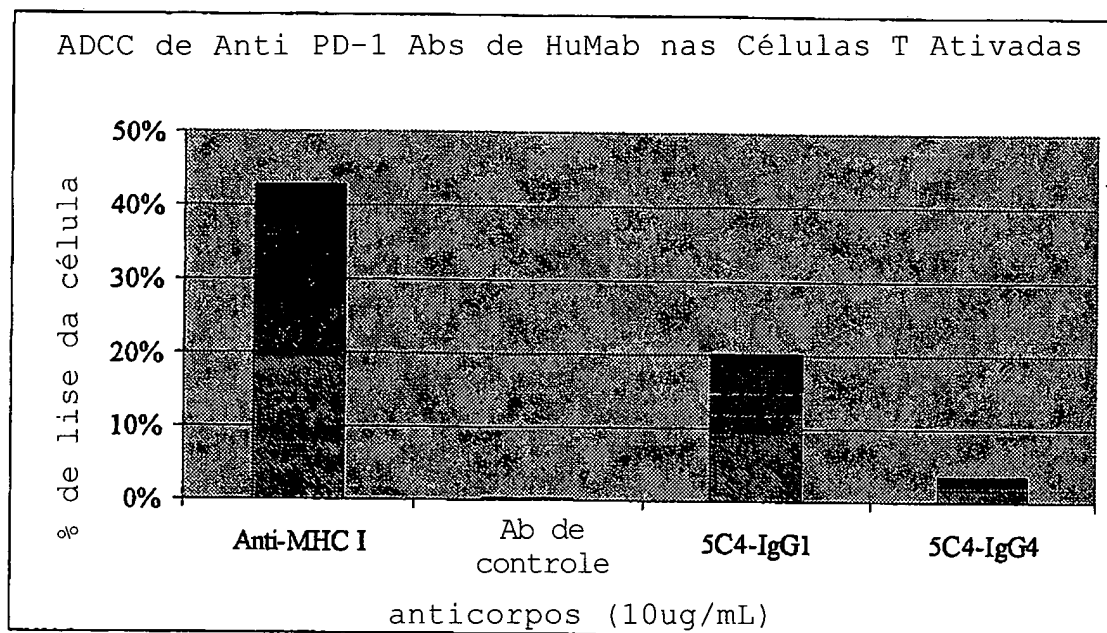


Fig. 53

Ensaio CDC

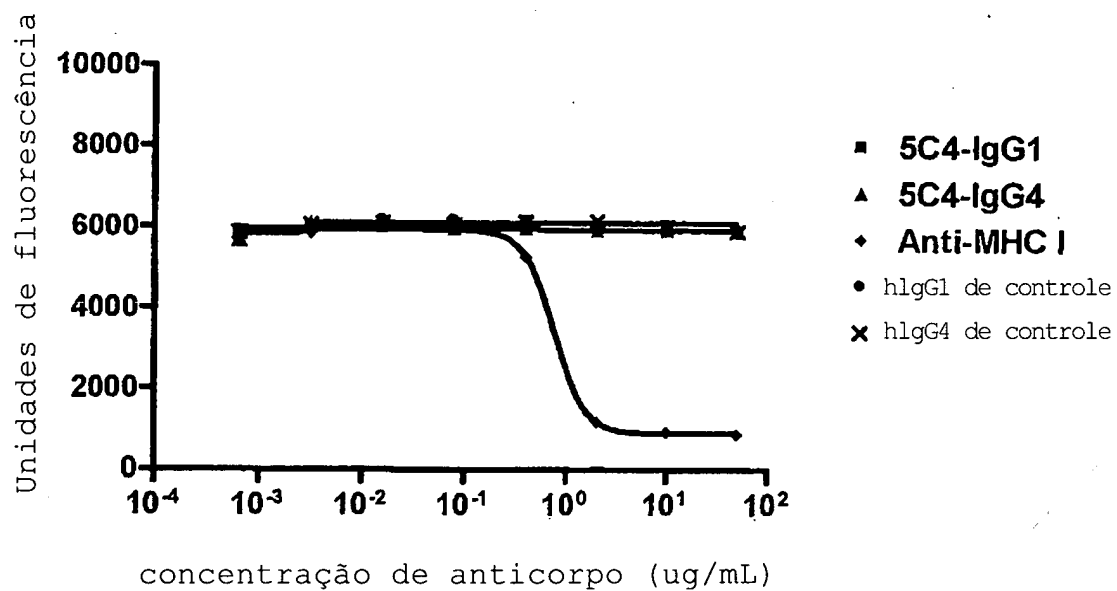


Fig. 54

RESUMO

“ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA MORTE
PROGRAMADA 1(PD-1) E MÉTODOS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER
USANDO ANTICORPOS ANTI-PD-1 SOZINHOS OU EM COMBINAÇÃO COM
5 OUTROS IMUNOTERAPÊUTICOS”

A presente invenção provê anticorpos monoclonais isolados, particularmente anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente ao PD-1 com afinidade alta. São também providas moléculas de ácido nucléico codificando os anticorpos da invenção, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressão dos anticorpos da invenção. São também providos imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos da invenção. A invenção também provê métodos para detectar PD-1, bem como métodos para tratamento de várias doenças, incluindo câncer e doenças infecciosas, usando anticorpos anti-PD-1. A presente invenção também provê métodos para emprego de uma imunoterapia de combinação, tal como, a combinação de anticorpos anti-CTLA-4 e anticorpos anti-PD-1, para tratamento de doença hiperproliferativa, tal como, câncer. A invenção também provê métodos para alterar eventos adversos relacionados ao tratamento individual com tais anticorpos.

"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA MORTE PROGRAMADA 1(PD-1) E USOS DE ANTICORPOS ANTI-PD-1 SOZINHOS OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS IMUNOTERAPÊUTICOS PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER"

5 Campo Técnico

A presente invenção se refere, de modo geral, à imunoterapia no tratamento de doença humana e redução dos eventos adversos relacionados à mesma. Mais especificamente, a presente invenção se refere ao uso de anticorpos anti-PD-1
10 e ao uso de imunoterapia de combinação, incluindo a combinação dos anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD-1 para tratar o câncer e/ou para diminuir a incidência ou grandeza dos eventos adversos relacionados ao tratamento com tais anticorpos de modo individual.

15 Antecedentes da Invenção

Morte Programada da proteína 1 (PD-1) é um elemento inibidor da família CD28 dos receptores, que também inclui CD28, CTLA-4, ICOS e BTLA. O PD-1 é expresso nas células B ativadas, células T e células mielóides (Agata e outros, supra,
20 Okazaki e outros (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett e outros (2003) *J Immunol* 170:711-8). Os elementos iniciais da família, CD28 e ICOS, foram descobertos por efeitos funcionais no aumento da proliferação da célula T, seguindo-se à adição de anticorpos monoclonais (Hutloff e
25 outros (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen e outros (1980) *Immunogenics* 10:247-260). O PD-1 foi descoberto através da classificação para expressão diferencial em células apoptóticas (Ishida e outros (1992)

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo
5 fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 e onde o anticorpo
exibe pelo menos uma das seguintes propriedades:

a) se liga ao PD-1 humano com um K_D de 1×10^{-7} M
ou menos;

b) não se liga substancialmente ao CD28, CTLA-4 ou
10 ICOS humano;

c) aumenta a proliferação da célula T em um ensaio
de Reação de Linfócito Misto (MLR);

d) aumenta a produção de interferon-gama em um en-
saio de MLR; ou

15 e) aumenta a secreção de interleucina-2 (IL-2) em
um ensaio de MRL.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que é o anticorpo de comprimento
pleno de um isotipo de IgG1 ou IgG4.

20 3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que é um fragmento de anticorpo
ou anticorpo de cadeia simples.

4. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1
25 humano com um K_D de 5×10^{-8} M ou menos.

5. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
CARACTERIZADO pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1
humano com um K_D de 1×10^{-8} M ou menos.

6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 humano com um K_D de 5×10^{-9} M ou menos.

7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo se liga ao PD-1 humano com um K_D entre 1×10^{-8} M e 1×10^{-10} M.

8. Anticorpo monoclonal humano geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compete em cruzamento para ligação ao PD-1 com um anticorpo de referência compreendendo:

a) uma região variável de cadeia pesada humana compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

b) uma região variável de cadeia leve humana compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

9. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:1 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:8.

10. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:2 e a região variável de cadeia leve humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:9.

11. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:3 e a região variável de cadeia leve humana compreende a
5 sequência de aminoácido da SEQ ID NO:10.

12. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:4 e a região variável de cadeia leve humana compreende a
10 sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11.

13. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:5 e a região variável de cadeia leve humana compreende a
15 sequência de aminoácido da SEQ ID NO:12.

14. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:6 e a região variável de cadeia leve humana compreende a
20 sequência de aminoácido da SEQ ID NO:13.

15. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:7 e a região variável de cadeia leve humana compreende a
25 sequência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

16. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que

compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene V_H 3-33 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

17. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que é o produto ou derivada de um gene V_H 4-39 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

18. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto ou derivada de um gene V_K L6 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

19. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve que é o produto ou derivada de um gene V_K L15 humano, onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

20. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 3-33 humano; e

b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L6 humano;

onde o anticorpo se liga especificamente ao PD-1.

21. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado
5 e diferente daquele encontrado na natureza ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada de um gene V_H 4-39 humano; e

10 b) uma região variável de cadeia leve de um gene V_K L15 humano;

onde o anticorpo se liga especificamente ao PD-1.

22. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado
e diferente daquele encontrado na natureza ou porção de li-
15 gação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que consiste nas seqüências CDR1, CDR2 e CDR3; e uma região variável de cadeia leve que compreende as seqüências CDR1, CDR2 e CDR3, onde:

20 a) a seqüência CDR3 de região variável de cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35 e modificações conservadoras das mesmas;

b) a seqüência CDR3 da região variável de cadeia
25 leve compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56 e modificações conservadoras das mesmas; e

c) o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

23. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência CDR2 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 e modificações conservadoras das mesmas, e a sequência CDR2 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49 e modificações conservadoras das mesmas.

24. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência CDR1 da região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 17, 18, 19, 20 e 21 e modificações conservadoras das mesmas, e a sequência CDR1 da região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas seqüências de aminoácido das SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42 e modificações conservadoras das mesmas.

25. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou porção de ligação de antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, onde:

a) a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a

uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7;

b) a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% homóloga a uma
5 sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14;

c) o anticorpo se liga ao PD-1 humano com um K_D de 1×10^{-7} M ou menos; e

d) o anticorpo substancialmente não se liga ao
10 CD28, CTLA-4 ou ICOS humano.

26. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo compreende, adicionalmente, pelo menos uma das seguintes propriedades:

a) o anticorpo aumenta a proliferação da célula T
15 em um ensaio de Reação de Linfócito Misto (MLR);

b) o anticorpo aumenta a produção de interferon-gama em um ensaio de MLR; ou

c) o anticorpo aumenta a secreção de interleucina-2 (IL-2) em um ensaio de MRL.

20 27. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada
25 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 17, 18, 19, 20 e 21;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28;

5 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 20, 31, 32, 33, 34 e 35;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve com-
10 preendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve com-
preendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49; e

15 f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve com-
preendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

onde o anticorpo se liga especialmente ao PD-1.

28. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27,
20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:15;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:22;

25 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:29;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve com-
preendendo a SEQ ID NO:36;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:43; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:50.

5 29. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:16;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada
10 compreendendo a SEQ ID NO:23;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:30;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:37;

15 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:44; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:51.

20 30. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:17;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:24;

25 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:31;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:38;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:45; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:52.

5 31. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:18;

10 b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:25;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:32;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:39;

15 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:46; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:53.

20 32. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:19;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:26;

25 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:33;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:40;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:47; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:54.

5 33. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:20;

10 b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:27;

c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:34;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:41;

15 e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:48; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:55.

20 34. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) uma CDR1 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:21;

b) uma CDR2 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:28;

25 c) uma CDR3 da região variável de cadeia pesada compreendendo a SEQ ID NO:35;

d) uma CDR1 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:42;

e) uma CDR2 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:49; e

f) uma CDR3 da região variável de cadeia leve compreendendo a SEQ ID NO:56.

5 35. Anticorpo monoclonal geneticamente modificado e diferente daquele encontrado na natureza ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

10 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e

 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11, 12, 13a e 14;

15 onde o anticorpo se liga especificamente ao PD-1.

 36. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:1, e

20 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:8.

 37. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

25 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:2, e

 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:9.

38. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35,
CARACTERIZADA pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:3, e

5 b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:10.

39. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35,
CARACTERIZADA pelo fato de que compreende:

10 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO: 4, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:11.

40. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35,
CARACTERIZADA pelo fato de que compreende:

15 a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:5, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:12.

20 41. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35,
CARACTERIZADA pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:6, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:13.

25 42. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 35,
CARACTERIZADA pelo fato de que compreende:

a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:7, e

b) uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:14.

43. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo, conforme definido em uma ou mais das reivindicações 1-36 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

44. Imunoconjugado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-36, ligado a um agente terapêutico.

45. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o imunoconjugado, conforme definido na reivindicação 44 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

46. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente terapêutico é uma citotoxina.

47. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o imunoconjugado, conforme definido na reivindicação 46 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

48. Imunoconjugado, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente terapêutico é um isótopo radioativo.

49. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o imunoconjugado, conforme definido na reivindicação 48 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

50. Molécula biespecífica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivin-

dicações 1-36, ligado a uma segunda fração funcional possuindo uma especificidade de ligação diferente que a do anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo.

51. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que
5 compreende a molécula biespecífica, conforme definida na reivindicação 50, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

52. Molécula de ácido nucléico isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que codifica o anticorpo ou uma
10 porção de ligação ao antígeno da mesma, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-36.

53. Vetor de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico, conforme definido na reivindicação 52.

54. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de
15 que compreende o vetor de expressão, conforme definido na reivindicação 53.

55. Uso de um anticorpo ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para
20 preparação de uma composição farmacêutica para modular uma resposta imune.

56. Uso de um anticorpo anti-PD-1 ou porção de ligação ao antígeno do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica para inibir o
25 crescimento das células tumorais.

57. Uso, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico.

58. Uso, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humanizado.

59. Uso, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo plenamente humano.

60. Uso, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células tumorais constituem um câncer selecionado do grupo consistindo em melanoma, câncer renal, câncer da próstata, câncer de mama, câncer de cólon e câncer de pulmão.

61. Uso, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células tumorais são de um câncer selecionado da lista consistindo em câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intra-ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma das trompas falopianas, carcinoma do endométrio, carcinoma do cérvix, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, câncer de esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula tireóide, câncer da glândula paratireóide, câncer da glândula adrenal, sarcoma do tecido mole, câncer da uretra, câncer do pênis, leucemias crônicas ou agudas incluindo leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, tumores sólidos de infância, linfoma linfocítico, cân-

cer da bexiga, câncer dos rins ou uretra, carcinoma da pélvis renal, neoplasmo do sistema nervoso central (CNS), linfoma primário do CNS, angiogênese de tumor, tumor do eixo da espinha, glioma do tronco encefálico, adenoma pituitário, 5 sarcoma de Kaposi, câncer epidermóide, câncer da célula escamosa, linfoma da célula T, cânceres induzidos ambientalmente incluindo aqueles induzidos por asbestos e combinações dos referidos cânceres.

62. Uso de um anticorpo ou porção de ligação ao 10 antígeno do mesmo, conforme definido em uma das reivindicações 1-36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica para inibir o crescimento das células tumorais.

63. Uso de um anticorpo ou porção de ligação ao 15 antígeno do mesmo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica para tratar uma doença infecciosa.

64. Uso, de acordo com a reivindicação 63, 20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença infecciosa é selecionada da lista consistindo em HIV, gripe, Herpes, Giardia, Malária, Leishmaniose, a infecção patogênica pelo vírus da Hepatite (A, B e C), vírus de herpes (por exemplo, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II e CMV, vírus Epstein Barr), adenovírus, vírus da gripe, flavivírus, ecovírus, rinovírus, vírus Cocksackie, 25 cornovírus, vírus sincicial respiratório, vírus da cachumba, rotavírus, vírus do sarampo, vírus da rubéola, parvovírus, vírus da vacínia, vírus HTLV, vírus da dengue, pa-

pilomavírus, vírus de molusco, vírus da pólio, vírus da rai-
 va, vírus JC e vírus da encefalite arboviral, infecção pato-
 gênica pela bactéria *chlamydia*, bactéria Riquetsial, *myco-*
bacteria, *staphylococci*, *streptococci*, *pneumonococci*, *menin-*
 5 *gococci* e *conococci*, *klebsiella*, *Proteus*, *serratia*, *Pseudo-*
monas, *legionella*, difteria, salmonela, bacilos, cólera, té-
 tano, botulismo, antrax, peste, leptospirose e bactéria da
 doença de Lyme, infecção patogênica por fungos *Candida* (*al-*
bicans, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus*
 10 *neoforman*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), Gênero Mu-
 corales (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*,
Blastomyces dermatitidis, *Paracoccidioides brasiliensis*,
Coccidioides immitis e *Histoplasma capsulatum* e infecção pa-
 togênica por parasitas *Entamoeba histolytica*, *Balantidium*
 15 *coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*,
Cryptosporidium sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*,
Babesia microti, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Lei-*
shmania donovani, *Toxoplasma gondi* e *Nippostrongylus brasi-*
liensis.

20 65. Uso de (i) antígeno; e (ii) anticorpo ou por-
 ção de ligação ao anticorpo do mesmo, conforme definido em
 qualquer uma das reivindicações 1-36, tal que, **CARACTERIZADO**
 pelo fato de que é para preparação de uma composição farma-
 cêutica para melhorar uma resposta imune.

25 66. Uso, de acordo com a reivindicação 65,
CARACTERIZADO pelo fato de que o antígeno é um antígeno tu-
 moral, um antígeno viral, um antígeno bacteriano ou um antí-
 geno de um agente patogênico.

67. Uso de (a) um anticorpo anti-PD-1, e (b) um anticorpo anti-CTLA-4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica para tratamento de uma doença hiperproliferativa.

5 68. Uso, de acordo com a reivindicação 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dose do anticorpo anti-DP-1 é subterapêutica.

 69. Uso, de acordo com a reivindicação 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dose do anticorpo anti-
10 CTLA-4 é subterapêutica.

 70. Uso, de acordo com a reivindicação 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que ambas as doses do anticorpo anti-PD-1 e o anticorpo anti-CTLA-4 são subterapêuticas.

 71. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindica-
15 ções 67 a 70, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença hiperproliferativa é câncer.

 72. Uso, de acordo com a reivindicação 71, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer é câncer de cólon.

 73. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindica-
20 ções 66 a 71, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

 74. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindica-
ções 66 a 71, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é um anticorpo de sequência humana.

25 75. Uso, de acordo com a reivindicação 74, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

76. Uso, de acordo com a reivindicação 75, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo monoclonal anti-PD-1 da sequência humana é 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4.

5 77. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 71, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 é um anticorpo de sequência humana.

78. Uso, de acordo com a reivindicação 77, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 da
10 sequência humana é um anticorpo monoclonal.

79. Uso, de acordo com a reivindicação 78, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 da sequência humana é 10D1 (MDX-010).

80. Uso de (a) um anticorpo anti-PD-1, e (b) uma
15 dose subterapêutica do anticorpo anti-CTLA-4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para preparação de uma composição farmacêutica para alterar um evento adverso associado ao tratamento de uma doença hiperproliferativa com um agente imunestimulador.

20 81. Uso, de acordo com a reivindicação 80, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dose do anticorpo anti-PD-1 é subterapêutica.

82. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 81, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a doença hiperproliferativa é câncer.
25

83. Uso, de acordo com a reivindicação 82, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer é câncer de cólon.

84. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 81, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o indivíduo é um ser humano.

85. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 81, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 é um anticorpo de sequência humana.

86. Uso, de acordo com a reivindicação 85, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

87. Uso, de acordo com a reivindicação 86, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-PD-1 da sequência humana é 17D8, 2D3, 5H1, 5C4, 4A11, 7D3 ou 5F4.

88. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 91, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 é um anticorpo da sequência humana.

89. Uso, de acordo com a reivindicação 88, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 da sequência humana é um anticorpo monoclonal.

90. Uso, de acordo com a reivindicação 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo anti-CTLA-4 da sequência humana é 10D1 (MDX-010).

91. Método para preparação de um anticorpo anti-PD-1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) provisão de: (i) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 15, 16, 17, 18, 19, 20a e 21, uma sequência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 22, 23, 24, 25,

26, 27 e 28; e uma sequência de CDR3 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35; ou (ii) uma sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência CDR1 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42, uma sequência CDR2 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 43, 44, 45, 46, 47, 48 e 49 e uma sequência CDR3 que é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56;

10 (b) alteração de pelo menos um resíduo de aminoácido dentro de pelo menos uma sequência de anticorpo da região variável, a sequência sendo selecionada da sequência de anticorpo da região variável de cadeia pesada e a sequência de anticorpo da região variável de cadeia leve, de modo a
15 criar pelo menos uma sequência de anticorpo alterada; e

 (c) expressando a sequência de anticorpo alterada como uma proteína.

VH de Anti-PD1 17D8

Segmento V : 3-33
 Segmento D : **desconhecido**
 Segmento J : JH4b

```

1   Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   D   V   V   Q   P   G   G   S   L
   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     -----
55  R   L   S   C   A   A   S   G   V   A   F   S   N   Y   G   M   H   W
   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA GTC GCC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
109 V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   W   Y   D
   GTC CGC CAG GCT CCC GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATC TGG TAT GAT

                                     CDR2
                                     -----
163 G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
   GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA

                                     CDR2
                                     -----
217 D   N   S   K   N   M   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
   GAC AAT TCC AAG AAC ATG CTC TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                     CDR3
                                     -----
271 T   A   M   Y   Y   C   A   R   N   D   D   Y   W   G   Q   G   T   L
   ACG GCT ATG TAT TAC TGT GCG AGG AAC GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

                                     L → JH4b

325 V   T   V   S   S
   GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

Fig. 1A

VH de Anti-PD1 5C4

Segmento V: 3-33
 Segmento D: **desconhecido**
 Segmento J: JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L
1   CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                     CDR1
      R  L  D  C  K  A  S  G  I  T  F  S  N  S  G  M  H  W
55  AGA CTC GAC TGT AAA GCG TCT GGA ATC ACC TTC AGT AAC TCT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  W  Y  D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATT TGG TAT GAT

      CDR2
      G  S  K  R  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R
163 GGA AGT AAA AGA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D  N  S  K  N  T  L  F  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TTT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                     CDR3
      T  A  V  Y  Y  C  A  T  N  D  D  Y  W  G  Q  G  T  L
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACA AAC GAC GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
      |
      JH4b

      V  T  V  S  S
325 GTC ACC GTC TCC TCA

```

Fig. 4A

RESUMO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA MORTE PROGRAMADA 1(PD-1) E USOS DE ANTICORPOS ANTI-PD-1 SOZINHOS OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS IMUNOTERAPÊUTICOS PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER"

A presente invenção provê anticorpos monoclonais geneticamente modificados e diferentes daqueles encontrados na natureza, particularmente anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente ao PD-1 com afinidade alta. São também providas moléculas de ácido nucléico codificando os anticorpos da invenção, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para expressão dos anticorpos da invenção. São também providos imunoconjugados, moléculas biespecíficas e composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos da invenção. A invenção também provê métodos para detectar PD-1, bem como métodos para tratamento de várias doenças, incluindo câncer e doenças infecciosas, usando anticorpos anti-PD-1. A presente invenção também provê métodos para emprego de uma imunoterapia de combinação, tal como, a combinação de anticorpos anti-CTLA-4 e anticorpos anti-PD-1, para tratamento de doença hiperproliferativa, tal como, câncer. A invenção também provê métodos para alterar eventos adversos relacionados ao tratamento individual com tais anticorpos. Além disso, a invenção revela usos de anticorpos ANTI-PD-1 sozinhos ou em combinação com outros imunoterapêuticos para preparação de composições farmacêuticas para tratamento de câncer.