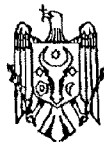




MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3456346 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 39/00 (2006.01.01)  
A61K 39/395 (2006.01.01)  
C07K 16/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Numărul de depozit: e 2019 1256</p> <p>(22) Data de depozit: 2016.07.28</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18199685.1, 2016.07.28</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3456346, 2019.03.20</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201562198867 P; 201562239559 P; 201562255140 P; 201662322974 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.07.30; 2015.10.09; 2015.11.13; 2016.04.15</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US; US; US; US</p> | <p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 11/2021, 2021.11.30</p> <p>(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 27/2021, 2021.07.07</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 11/2019, 2019.11.30</p> |
| <p>(71) Solicitant: MACROGENICS, INC., US</p> <p>(72) Inventatori: SHAH Kalpana, US; SMITH Douglas H., US; LA MOTTE-MOHS Ross, US; JOHNSON Leslie S., US; MOORE Paul A., US; BONVINI Ezio, US; KOENIG Scott, US</p> <p>(73) Titular: MACROGENICS, INC., US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru</p>                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

(54) Molecule de legare la PD-1 și LAG-3 și metode de utilizare a acestora

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la anticorpii anti-PD-1 selectați capabili să se lege la ambele PD-1 de maimuță cynomolgus și PD-1 uman: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15, și

2

la versiunile umanizate și himerice ale unor astfel de anticorpi. Invenția se referă în plus la molecule de legare la PD-1 care cuprind fragmente de legare la PD-1 ale unor astfel de anticorpi anti-PD-1, imunoconjugați, și la molecule bispecifice, incluzând diacorpi, BiTe-uri, anticorpi bispecfici, etc., care cuprind (i) astfel de fragmente de legare la PD-1, și (ii) un

MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

domeniu capabil de legare al unui epitop al unei molecule implicate in reglarea unui punct de control imun prezent pe suprafata unei celule imune. Prezenta invenție se referă de asemenea la metode de utilizare a moleculelor care se leagă la PD-1 pentru stimularea răspunsurilor imune, precum și la metode de detectare a PD-1.

Secvențe: 298

Revendicări: 18

Figuri: 23

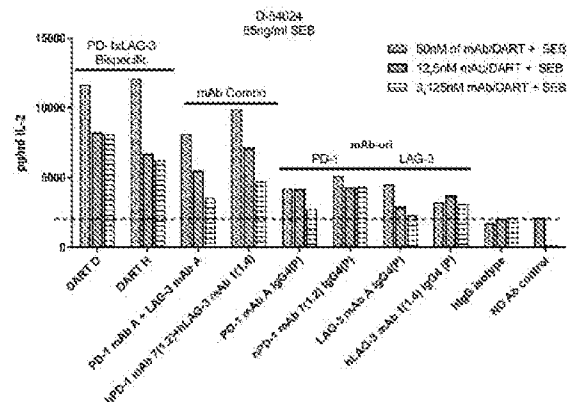


Figura 19

#### (54) PD-1 and LAG-3 binding molecules and methods of use thereof

##### (57) Abstract:

The present invention is directed to selected anti-PD-1 antibodies capable of binding to both cynomolgus monkey PD-1 and to human PD-1: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, or PD-1 mAb 15, and to humanized and chimeric versions of such antibodies. The invention additionally pertains to PD-1-binding molecules that comprise PD-1 binding fragments of such anti-PD-1 antibodies, immunoconjugates, and to bispecific molecules, including diabodies, BiTEs,

bispecific antibodies, etc., that comprise (i) such PD-1-binding fragments, and (ii) a domain capable of binding an epitope of a molecule involved in regulating an immune check point present on the surface of an immune cells. The present invention also pertains to methods of using molecules that bind PD-1 for stimulating immune responses, as well as methods of detecting PD-1.

Sequences: 298

Claims: 18

Fig.: 23

**Descriere:**

(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)

**Referință încrucișată la aplicații înrudite**

- 5 Această aplicație revendică prioritatea la cererile de brevet S.U.A. cu nr. seriale 62/198.867 (depusă pe 30 iulie 2015; în așteptare), 62/239.559 (depusă pe 9 octombrie 2015; în așteptare), 62/255.140 (depusă pe 13 noiembrie 2015; în așteptare), și 62/322.974 (depusă pe 15 aprilie 2016; în așteptare).

**Referință la lista de secvențe**

- 10 Această aplicație include una sau mai multe liste de secvențe conform cu 37 C.F.R. 1.821 și următoarele, care sunt divulgate în mediu citibil de calculator (nume fișier: 1301\_0122PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt, creat pe 1 iulie 2016, și având o dimensiune de 282.789 octeți).

**Domeniul divulgării**

- 15 Prezenta divulgare este direcționată spre moleculele de legare la PD-1 care cuprind domeniul de legare la PD-1 al anticorpilor anti-PD-1 selectați capabili de legare atât la PD-1 de maimuță cynomolgus cât și la PD-1 uman: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15. Divulgarea se preocupă în special cu moleculele de legare la PD-1 care  
20 sunt versiuni umanizate sau himerice de astfel de anticorpi, sau care cuprind fragmente de legare la PD-1 de astfel de anticorpi anti-PD-1 (în special imunoconjugate, diacorpi, BiTE-uri, anticorpi bispecifici, etc.). Divulgarea se preocupă în special cu astfel de molecule de legare la PD-1 care sunt capabile suplimentar să lege un epitop al unei molecule implicate în reglarea unui punct de control imun care este prezent pe suprafața a unei celule imune. Prezenta divulgare se referă de asemenea la metode de  
25 utilizare a unor astfel de molecule de legare la PD-1 pentru a detecta PD-1 sau pentru a stimula un răspuns imun. Prezenta divulgare se referă de asemenea la metode de terapie de combinație în care o moleculă de legare la PD-1 care cuprinde unul sau mai multe domenii de legare la PD-1 ale unor astfel de anticorpi anti-PD-1 selectați este administrată în combinație cu una sau mai multe molecule suplimentare care sunt eficiente în stimularea unui răspuns imun și/sau în combinație cu una sau mai multe molecule  
30 suplimentare care se leagă specific la un antigen al cancerului.

**Bazele invenției****I. Răspunsuri imune mediate de celulă**

- Sistemul imunitar al oamenilor și al altor mamifere este responsabil pentru asigurarea protecției  
împotriva infecției și bolii. O astfel de protecție este asigurată atât prin răspunsul imun umoral cât și  
35 printr-un răspuns imun mediat de celulă. Răspunsul umoral conduce la producția de anticorpi și alte biomolecule care sunt capabile să recunoască și să neutralizeze țintele străine (antigenii). În schimb, răspunsul imun mediat de celulă implică activarea de macrofage, celule ucigăse naturale (NK), și limfocite T citotoxice specifice antigenului prin celule T, și eliberarea de diferite citokine ca răspuns la recunoașterea unui antigen (Dong, C. și colab. (2003) „Immune Regulation by Novel Costimulatory  
40 Molecules”, Immunol. Res. 28(1):39-48).

- Abilitatea celulelor T de a media optim un răspuns imun împotriva unui antigen necesită două interacțiuni de semnalizare distincte (Viglietta, V. și colab. (2007) „Modulating CoStimulation”, Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. și colab. (2007) „Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy”, Adv. Immunol. 90:297-339). În primul rând, antigenul care a fost dispus pe suprafața  
45 celulelor care prezintă antigen (APC) trebuie să fie prezentat unei celule T CD4<sup>+</sup> naive specifice antigenului. O astfel de prezentare livrează un semnal prin receptorul celulei T (TCR) care direcționează celula T pentru a iniția un răspuns imun care va fi specific antigenului prezentat. În al doilea rând, o serie de semnale costimulatoare și inhibitoare, mediate prin interacțiunile dintre APC și moleculele distincte ale suprafeței celulei T, declanșează mai întâi activarea și proliferarea celulelor T și în final inhibarea acestora. Astfel, primul semnal conferă specificitate răspunsului imun în timp ce al doilea semnal servește  
50 pentru a determina natura, mărimea și durata răspunsului.

- Sistemul imunitar este strans controlat de liganzii și receptorii costimulatori și coinhibitori. Aceste molecule asigură al doilea semnal pentru activarea celulelor T și asigură o rețea echilibrată de  
semnale pozitive și negative pentru a maximiza răspunsurile imune împotriva infecției în timp ce  
55 limitează imunitatea la ea însuși (Wang, L. și colab. (7 martie 2011) „VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses”, J. Exp. Med. 10,1084/jem,20100619:1-16; Lepenies, B. și colab. (2008) „The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections”, Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). De o importanță specială este legarea între liganzii B7.1 (CD80) și B7.2 (CD86) ai celulei care prezintă antigenul și receptorii CD28 și CTLA-4 ai limfocitelor T CD4<sup>+</sup> (Sharpe, A.H. și colab. (2002) „The B7-

CD28 Superfamily“, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. și colab. (2003) „Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules“, *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. și colab. (2009) „The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation“, *Immunol. Rev.* 229:307-321). Legarea lui B7.1 sau a lui B7.2 la CD28 stimulează activarea celulelor T; legarea lui B7.1 sau B7.2 la CTLA-4 inhibă o astfel de activare (Dong, C. și colab. (2003) „Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules“, *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. și colab. (2009) „The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation“, *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. și colab. (2005) „The B7 Family Revisited“, *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 este exprimat constitutiv pe suprafața celulei T (Gross, J. și colab. (1992) „Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse“, *J. Immunol.* 149:380-388), în timp ce expresia CTLA-4 este rapid reglată pozitiv după activarea celulelor T (Linsley, P. și colab. (1996) „Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement“, *Immunity* 4:535-543). Deoarece CTLA-4 este receptor cu afinitate mai ridicată (Sharpe, A.H. și colab. (2002) „The B7-CD28 Superfamily“, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), legarea inițiază mai întâi proliferarea celulei T (prin CD28) și apoi o inhibă (prin expresia nativă a CTLA-4), amortizând prin urmare efectul când proliferarea nu mai este necesară.

Investigarea suplimentară a liganzilor receptorului CD28 a condus la identificarea și caracterizarea a unui set molecule B7 inrudite („superfamilia B7“) (Coyle, A.J. și colab. (2001) „The Expanding B7 Superfamilie: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function“, *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. și colab. (2002) „The B7-CD28 Superfamily“, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. și colab. (2005) „The B7 Family Revisited“, *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. și colab. (2005) „The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands“, *Genom Biol.* 6:223,1-223,7; Loke, P. și colab. (2004) „Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells“. *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. și colab. (2007) „Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy“, *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. și colab. (2007) „The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity“, *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. și colab. (2008) „The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance“, *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. și colab. (1996) „CD28/B7 System of T-Cell Costimulation“, *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. și colab. (2004) „Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses“, *Microbes Infect.* 6:759-766). Există în prezent câțiva membri cunoscuți ai familiei: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ligandul costimulator inductibil (ICOS-L), ligandul de moarte programată-1 (PD-L1; B7-H1), ligandul de moarte programată-2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 și B7-H6 (Collins, M. și colab. (2005) „The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands“, *Genom Biol.* 6:223,1-223,7; Flajnik, M.F. și colab. (2012) „Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC“, *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

## II. Moarte programată-1 („PD-1“)

Moartea programată-1 („PD-1“, cunoscut de asemenea ca „CD279“) este un membru al proteinei membranare de tip I de aproximativ 31 kD al familiei CD28/CTLA-4 extinse de regulatori ai celulei T care reglează larg negativ răspunsurile imune (Ishida, Y. și colab. (1992) „Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death“, *EMBO J.* 11:3887-3895; publicațiile de cereri de brevet din Statele Unite nr. 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; brevetele din Statele Unite nr. 6.808.710; 7.101.550; 7.488.802; 7.635.757; 7.722.868; publicația PCT nr. WO 01/14557).

PD-1 este exprimat pe celulele T, celulele B, și monocitele activate (Agata, Y. și colab. (1996) „Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes“, *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. și colab. (2002) „Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC“, *J. Immunol.* 169:5538-5545) și la niveluri scăzute în celulele T ucigașe natural (NK) (Nishimura, H. și colab. (2000) „Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice“, *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. și colab. (2007) „Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity“, *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

Regiunea extracelulară a PD-1 constă dintr-un singur domeniu de imunoglobulină (Ig)V cu 23% identitate cu domeniul echivalent din CTLA-4 (Martin-Orozco, N. și colab. (2007) „Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity“, *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). Domeniul IgV extracelular este urmat de o regiune transmembranară și o coadă intracelulară. Coada intracelulară conține două situsuri de fosforilare situate într-un motiv inhibitor pe bază de tirozină imunoreceptoare și un motiv comutator pe bază de tirozină imunoreceptoare, care sugerează că PD-1 reglează negativ semnalele TCR (Ishida, Y. și colab. (1992) „Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death“, *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. și colab. (2006)

„Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer“, *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745).

PD-1 mediază inhibarea sa a sistemului imunitar prin legare la B7-H1 și B7-DC (Flies, D.B. și colab. (2007) „The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity“, *J. Immunother.* 30(3):251-260; brevetele din Statele Unite nr. 6.803.192; 7.794.710; publicațiile de cereri de brevet din Statele Unite numerele 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; publicațiile PCT numerele WO 01/39722; WO 02/086083).

B7-H1 și B7-DC sunt exprimate pe larg pe suprafețele țesuturilor umane și murine, cum ar fi inima, placentă, mușchii, ficatul fetal, splina, nodulii limfatici, și timusul precum și ficatul murin, plămânul, rinichii, celulele insulelor pancreatice și intestinului subțire (Martin-Orozco, N. și colab. (2007) „Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity“, *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). La oameni, expresia proteinei B7-H1 a fost găsită în celulele endoteliale umane (Chen, Y. și colab. (2005) „Expression of B7 H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells“, *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92; de Haij, S. și colab. (2005) „Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1“ *Kidney Int.* 68:2091-2102; Mazanet, M.M. și colab. (2002) „B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis“, *J. Immunol.* 169:3581-3588), miocardium (Maro, J.A. și colab. (2003) „Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production“, *J. Immunol.* 170:1257-1266), sincytiotrofoblasts (Petroff, M.G. și colab. (2002) „B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface“, *Placenta* 23:S95-S101). Moleculele sunt de asemenea exprimate prin macrofagele rezidente dintr-unele țesuturi, de macrofagele care au fost activate cu interferon (IFN)- $\gamma$  sau factor de necroză tumorală (TNF)- $\alpha$  (Latchman, Y. și colab. (2001) „PD-L2 Is Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation“, *Nat. Immunol.* 2:261-268), și în tumori (Dong, H. (2003) „B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity“, *J. Mol. Med.* 81:281-287).

S-a descoperit că interacțiunea între B7-H1 și PD-1 furnizează un semnal costimulator negativ crucial la celulele T și B (Martin-Orozco, N. și colab. (2007) „Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity“, *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298) și funcții ca inducerea morții celulei (Ishida, Y. și colab. (1992) „Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death“, *EMBO J.* 11:3887-3895; Subudhi, S.K. și colab. (2005) „The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition“, *J. Molec. Med.* 83:193-202). Mai specific, s-a descoperit că interacțiunea între concentrațiile scăzute ale receptorului PD-1 și ligandului B7-H1 conduce la transmiterea unui semnal inhibitor care inhibă puternic proliferarea celulelor T CD8<sup>+</sup> specifice antigenului; la concentrații mai ridicate, interacțiunile cu PD-1 nu inhibă proliferarea celulei T, dar reduce semnificativ producția de citokine multiple (Sharpe, A.H. și colab. (2002) „The B7-CD28 Superfamily“, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). S-a descoperit că proliferarea celulei T și producția de citokine prin ambele celule T CD4 și CD8 în repaus și activate anterior, și chiar celule T naive din sângele cordonului ombilical, au fost inhibitate de proteinele de fuziune solubile B7-H1-Fc (Freeman, G.J. și colab. (2000) „Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation“, *J. Exp. Med.* 192:1-9; Latchman, Y. și colab. (2001) „PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation“, *Nature Immunol.* 2:261-268; Carter, L. și colab. (2002) „PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2“, *Eur. J. Immunol.* 32(3):634-643; Sharpe, A.H. și colab. (2002) „The B7-CD28 Superfamily“, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126).

Rolul B7-H1 și PD-1 în inhibarea activării și proliferării celulelor T a sugerat că aceste biomolecule ar putea servi ca ținte terapeutice pentru tratamentele inflamației și cancerului. Astfel, a fost propusă utilizarea de anticorpi anti-PD-1 pentru a trata infecțiile și tumorile și a modula pozitiv un răspuns adaptiv imun (vezi, publicațiile de cereri de brevet din Statele Unite numerele 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; brevetele din Statele Unite nr. 7.521.051; 7.563.869; 7.595.048; publicațiile PCT nr. WO 2004/056875; WO 2008/083174). Anticorpii capabili de legare specifică la PD-1 au fost raportați de Agata, T. și colab. (1996) „Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes“, *Int. Immunol.* 8(5):765-772; și Berger, R. și colab. (2008) „Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies“, *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051 (vezi, de asemenea, brevetele S.U.A. numerele 8.008.449 și 8.552.154; publicațiile de brevet S.U.A. nr. 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 și 2014/0044738; și publicațiile de brevet PCT nr. WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408; WO 2012/145549; și WO 2013/014668).

Totuși, în ciuda tuturor unor astfel de avantaje anterioare, rămâne o necesitate de a îmbunătăți compozițiile capabile să direcționeze mai viguros sistemul imunitar al corpului pentru a ataca celulele

canceroase sau celulele infectate cu patogeni, în special la concentrații terapeutice mai scăzute. Deși sistemul imunitar adaptiv poate fi un mecanism potent de apărare împotriva cancerului și bolii, este adesea împiedicat de mecanismele imunosupresive din mediul tumoral, cum ar fi expresia de PD-1. Mai mult, moleculele coinhbitoare exprimate de celulele tumorale, celulele imune, și celulele stromale în milieul tumoral pot atenua dominant răspunsul celulei T împotriva celulelor canceroase. Astfel, rămâne o necesitate pentru molecule potente de legare la PD-1. În particular, există o necesitate pentru molecule potente de legare la PD-1 având un profil cinetic dorit de legare și care antagonizează axa PD-1/PD-L1 prin blocarea interacțiunii PD-1/PD-L1, care ar putea furniza o valoare terapeutică îmbunătățită pacienților care suferă de cancer sau alte boli și afecțiuni. Prezenta divulgare este direcționată spre acestea și alte scopuri.

WO 2014194302 se referă la compoziții și metode în legătură cu, sau derivate din, anticorpii anti-PD-1.

WO 2014179664 se referă la o polipeptidă izolată a lanțului greu de imunoglobulină și la o polipeptidă izolată a lanțului ușor de imunoglobulină care se leagă la o proteină de moarte programată-1 (PD-1).

### Rezumatul invenției

Prezenta invenție este direcționată spre o moleculă multispecifică anti-umană de legare la PD-1 care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu și un domeniu variabil al lanțului ușor, în care respectivul domeniu variabil al lanțului greu cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO:147, și respectivul domeniu variabil al lanțului ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 153. Invenția este direcționată de asemenea spre o compoziție cuprinzând molecula multispecifică anti-umană de legare la PD-1 a invenției și un purtător acceptabil farmaceutic. Invenția este direcționată de asemenea spre molecula multispecifică anti-umană de legare la PD-1, sau compoziția invenției pentru utilizare (A) într-o metodă de stimulare a răspunsului imun mediat de celula T a unui subiect care are nevoie de aceasta sau (B) în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu un sistem imunitar suprimat. Invenția este direcționată de asemenea spre utilizarea moleculei multispecifici anti-umane de legare la PD-1 a invenției în detecția *in vitro* a PD-1, în care respectiva moleculă sau respectivul anticorp sunt marcate detectabil. Realizările invenției sunt descrise în unele din cazurile de mai jos. Prezenta divulgare este direcționată spre moleculele de legare PD-1 care cuprind domeniul de legare PD-1 al anticorpilor anti-PD-1 selectați capabili de legare atât la PD-1 de maimuță cynomolgus cât și la PD-1 uman: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15. Divulgarea se preocupă în special cu moleculele de legare PD-1 care sunt versiuni umanizate sau himerice ale unor astfel de anticorpi, sau care cuprind fragmente de legare la PD-1 ale unor astfel de anticorpi anti-PD-1 (în special imunoconjugați, diacorpi, BiTE-uri, anticorpi bispecifici, etc.). Divulgarea se preocupă în special cu astfel de molecule de legare la PD-1 care sunt în plus capabile de legarea unui epitop al unei molecule implicate în reglarea unui punct de control imun care este prezent pe suprafața unei celule imune. Prezenta divulgare se referă de asemenea la metode de utilizare a unor astfel de molecule de legare la PD-1 pentru a detecta PD-1 sau pentru a stimula un răspuns imun. Prezenta divulgare se referă de asemenea la metode de terapie combinată în care o moleculă de legare la PD-1 care cuprinde unul sau mai multe domenii de legare la PD-1 ale unor astfel de anticorpi anti-PD-1 selectați este administrată în combinație cu una sau mai multe molecule suplimentare care sunt eficiente în stimularea unui răspuns imun și/sau în combinație cu una sau mai multe molecule suplimentare care se leagă specific la un antigen al cancerului.

În detaliu, divulgarea furnizează o moleculă anti-umană de legare la PD-1 care cuprinde cele trei domenii CDR ale lanțului greu, CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub> și CDR<sub>H3</sub> și cele trei domenii CDR ale lanțului ușor, CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub>, și CDR<sub>L3</sub>, în care:

(A)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 1, și au respectiv secvențele de aminoacizi: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, și SEQ ID NO:73; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 1, și au respectiv secvențele de aminoacizi: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, și SEQ ID NO:78;

sau

(B)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 2, și au respectiv secvențele de aminoacizi: SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, și SEQ ID NO:87; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 2, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:91, și SEQ ID NO:92;

sau

(C)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 3, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:99**, **SEQ ID NO:100**, și **SEQ ID NO: 101**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 3, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:104**, **SEQ ID NO:105**, și **SEQ ID NO:106**;

sau

(D)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 4, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:109**, **SEQ ID NO:110**, și **SEQ ID NO:111**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 4, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:114**, **SEQ ID NO:115**, și **SEQ ID NO:116**;

sau

(E)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 5, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:119**, **SEQ ID NO:120**, și **SEQ ID NO:121**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 5, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:124**, **SEQ ID NO:125**, și **SEQ ID NO:126**;

sau

(F)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 6, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:129**, **SEQ ID NO:130**, și **SEQ ID NO:131**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 6, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:134**, **SEQ ID NO:135**, și **SEQ ID NO:136**;

sau

(G)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 7, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:139**, **SEQ ID NO:140**, și **SEQ ID NO:141**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 7, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:144**, **SEQ ID NO:145**, și **SEQ ID NO:146**;

sau

(H)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 8, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:161**, **SEQ ID NO:162**, și **SEQ ID NO:163**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 8, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:166**, **SEQ ID NO:167**, și **SEQ ID NO:168**;

sau

(I)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 9, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:171**, **SEQ ID NO:172**, și **SEQ ID NO:173**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 9, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:176**, **SEQ ID NO:177**, și **SEQ ID NO:178**;

sau

(J)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 10, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:192**, **SEQ ID NO:193**, și **SEQ ID NO:194**; și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 10, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:197, SEQ ID NO:198, și SEQ ID NO:199;**

sau

5 (K)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 11, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203, și SEQ ID NO:204;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 11, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208, și SEQ ID NO:209;**

sau

(L)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 12, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213, și SEQ ID NO:214;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 12, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218, și SEQ ID NO:219**

sau

(M)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 13, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, și SEQ ID NO:224;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 13, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, și SEQ ID NO:229;**

sau

(N)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 14, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, și SEQ ID NO:234;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 14, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, și SEQ ID NO:239;**

sau

(O)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al PD-1 mAb 15, și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, și SEQ ID NO:244;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al PD-1 mAb 15, și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, și SEQ ID NO:249;**

sau

(P)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al hPD-1 mAb 7(1,2), și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, și SEQ ID NO:141;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al hPD-1 mAb 7(1,2), și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:145, și SEQ ID NO:146;**

sau

(Q)

(1) domeniul CDR<sub>H</sub>1, domeniul CDR<sub>H</sub>2, și domeniul CDR<sub>H</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului greu al hPD-1 mAb 7(1,3), și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, și SEQ ID NO: 141;** și

(2) domeniul CDR<sub>L</sub>1, domeniul CDR<sub>L</sub>2, și domeniul CDR<sub>L</sub>3 sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al hPD-1 mAb 7(1,3), și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, și SEQ ID NO:145;**

sau

(R)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> sunt regiuni CDR ale lanțului greu al hPD-1 mAb 9(2,2), și au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:183**, **SEQ ID NO:172**, și **SEQ ID NO:173**; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> sunt regiuni CDR ale lanțului ușor al hPD-1 mAb 9(2,2), și, au respectiv secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:188**, **SEQ ID NO:189**, și **SEQ ID NO:178**.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele tuturor acestor molecule anti-umane de legare la PD-1 în care molecula este un anticorp, și în special în care molecula este un anticorp himeric sau un anticorp umanizat.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțe de astfel de molecule anti-umane de legare la PD-1 în care domeniul variabil al lanțului greu are secvența de aminoacizi din **SEQ ID NO:79**, **SEQ ID NO:93**, **SEQ ID NO:147**, **SEQ ID NO:149**, **SEQ ID NO:179**, **SEQ ID NO:181**, sau **SEQ ID NO:250**.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțe de astfel de molecule anti-umane de legare la PD-1 în care domeniul variabil al lanțului ușor are secvența de aminoacizi din **SEQ ID NO:81**, **SEQ ID NO:95**, **SEQ ID NO:151**, **SEQ ID NO:153**, **SEQ ID NO:155**, **SEQ ID NO:184**, **SEQ ID NO:186**, sau **SEQ ID NO:251**.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțe în care molecula anti-umană de legare la PD-1 este o moleculă de legare bispecifică, capabilă să se lege simultan la PD-1 uman și la un al doilea epitop, și se preocupă în special cu instanța în care al doilea epitop este un epitop al unei molecule implicate în reglarea unui punct de control imun prezent pe suprafața unei celule imune (în special în care al doilea epitop este un epitop al B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC de clasă I sau II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 sau VISTA, și cel mai special în care al doilea epitop este un epitop de CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT, sau TIM-3).

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele în care molecula anti-umană de legare la PD-1 este o moleculă bispecifică cuprinzând un situs de legare la epitopul LAG-3, în special în care situsul de legare la epitopul LAG-3 cuprinde:

(A)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al LAG-3 mAb 1, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:42**, **SEQ ID NO:43**, și **SEQ ID NO:44**, respectiv; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 1, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:46**, **SEQ ID NO:47**, și **SEQ ID NO:48**, respectiv;

sau

(B)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al hLAG-3 mAb 1 VH1, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:42**, **SEQ ID NO:43**, și **SEQ ID NO:44**, respectiv; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al hLAG-3 mAb 1 VL4, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:55**, **SEQ ID NO:47**, și **SEQ ID NO:48**, respectiv;

sau

(C)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al LAG-3 mAb 6, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:57**, **SEQ ID NO:58**, și **SEQ ID NO:59**, respectiv; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 6, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:61**, **SEQ ID NO:62**, și **SEQ ID NO:63**, respectiv;

sau

(D)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al hLAG-3 mAb 6 VH1, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:57**, **SEQ ID NO:58**, și **SEQ ID NO:59**, respectiv; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 6, având secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:298**, **SEQ ID NO:62**, și **SEQ ID NO:63**, respectiv.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele unor astfel de molecule anti-umane de legare la PD-1 în care molecula este un diacorp, și în special, în care diacorpul este un complex legat covalent care cuprinde două, sau trei, sau patru, sau cinci catene de polipeptide. Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele unor astfel de molecule anti-umane de legare la PD-1 în care molecula este o moleculă de legare trivalentă, și în special în care molecula de legare trivalentă este un complex de legare covalent care cuprinde trei, patru, cinci sau mai mult de cinci catene de polipeptide. Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele unor astfel de molecule anti-uman de legare la PD-1 în care molecula cuprinde o regiune Fc. Divulgarea se preocupă în plus cu instanțe de astfel de molecule anti-umane de legare la PD-1 în care molecula cuprinde un domeniu de legare la albumină, și în special un domeniu de legare la albumină deimunizată.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele tuturor unor astfel de molecule anti-uman de legare la PD-1 în care molecula cuprinde o regiune Fc, și în care regiunea Fc este o variantă a regiunii Fc care cuprinde una sau mai multe modificări de aminoacizi care reduc afinitatea variantei regiunii Fc pentru un FcγR și/sau sporește perioada de înjumătățire a serului, și mai special, în care modificările cuprind cel puțin o substituție de aminoacizi selectată din grupul constând din:

- (1) L234A; L235A;
- (2) L234A și L235A;
- (3) M252Y; M252Y și S254T;
- (4) M252Y și T256E;
- (5) M252Y, S254T și T256E; sau
- (6) K288D și H435K;

în care numărătoarea este cea a indicelui EU ca în Kabat.

Divulgarea se preocupă în plus cu cazurile în care oricare din moleculele de legare la PD-1 descrise mai sus este utilizată pentru a stimula un răspuns imun mediat de celula T. Divulgarea se preocupă în plus cu cazurile în care oricare din moleculele de legare la PD-1 descrise mai sus este utilizată în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu un sistem imunitar suprimat, în special cancer sau o infecție.

Divulgarea se preocupă în special cu o astfel de utilizare în tratamentul sau diagnoza sau prognoza cancerului, în care cancerul este caracterizat prin prezența unei celule canceroase selectate din grupul constând dintr-o celulă de: o tumoră de glandă suprarenală, un cancer asociat cu SIDA, un sarcom alveolar parțial moale, o tumoră astrocitică, cancer la vezică, cancer osos, un cancer la creier și la măduva spinării, o tumoră cerebrală metastatică, un cancer la sân, o tumoră corporală carotidică, un cancer de col uterin, un condrosarcom, un cordon, un carcinom cromofob cu celule renale, un carcinom cu celule clare, un cancer la colon, un cancer colorectal, un histocitom fibros benign cutanos, o tumoră desmoplazică cu celule mici rotunde, un ependimom, o tumoră Ewing, un condrosarcom mixoid extraskelital, o fibrogeneză osoasă imperfectă, o displazie fibroasă a osului, un cancer la vezica biliară sau la canalul biliar, cancer gastric, o boală trofoblastică gestațională, o tumoră celulară germinală, un cancer la cap și gât, carcinom hepatocelular, o tumoră celulară insulară, un sarcom Kaposi, un cancer la rinichi, o leucemie, o tumoră lipomatoasă lipom/benignă, o tumoră lipotamoasă liposarcom/malignă, un cancer hepatic, un limfom, un cancer pulmonar, un meduloblastom, un melanom, un meningiom, o neoplazie endocrină multiplă, un mielom multiplu, un sindrom mielodisplazic, un neuroblastom, o tumoră neuroendocrină, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un carcinom tiroidian papilar, o tumoră paratiroidă, un cancer pediatric, o tumoră a tecii nervului periferic, o feocromocitomă, o tumoră pituitară, un cancer la prostată, un melanom uveal posterior, o tulburare hematologică rară, un cancer metastatic renal, o tumoră rabdoidă, un rabdomiosarcom, un sarcom, un cancer la piele, un sarcom de țesut moale, un cancer al celulei scuamoase, un cancer la stomac, un sarcom sinovial, un cancer testicular, un carcinom timic, un timom, un cancer metastatic de tiroidă, și un cancer uterin.

Divulgarea se preocupă în special cu o astfel de utilizare în tratamentul sau diagnoza sau prognoza cancerului, în care cancerul este cancer colorectal, carcinom hepatocelular, gliom, cancer la rinichi, cancer la sân, mielom multiplu, cancer la vezică, neuroblastom; sarcom, limfom non-Hodgkin, cancer pulmonar nonmicrocelular, cancer ovarian, cancer pancreatic, un cancer rectal, leucemie mieloidă acută (AML), leucemie mielogenă cronică (CML), leucemie limfoblastică B acută (B-ALL), leucemie limfocitară cronică (CLL), leucemie cu celule păroase (HCL), neoplasm celular dendritic plasmacitoid blastic (BPDCN), limfoame non-Hodgkin (NHL), leucemia care include celulele manta (MCL), și limfom limfocitic mic (SLL), limfom Hodgkin, mastocitoză sistemică, sau limfom Burkitt.

Divulgarea se preocupă în plus cu instanțele în care oricare din moleculele de legare la PD-1 descrise mai sus este marcată detectabil și este utilizată în detecția de PD-1.

#### Scurtă descriere a desenelor

**Figura 1** furnizează o schemă a unui diacorp reprezentativ legat covalent având două situsuri de legare la epitop compuse din două catene de polipeptide, având fiecare un domeniu de promovare al heterodimerului E-spiralat sau K-spiralat. Un rest de cisteină poate fi prezent într-un liant și/sau într-un domeniu de promovare al heterodimerului așa cum se arată în **Figura 3B**. Domeniile VL și VH care recunosc același epitop sunt prezentate utilizând același tipar de umbrire sau de umplere.

**Figura 2** furnizează o schemă a unei molecule diacorp reprezentative legate covalent având două situsuri de legare la epitop compuse din două catene de polipeptide, având fiecare un domeniu CH2 și CH3, astfel încât catenele asociate formează toată sau o parte a unei regiuni Fc. Domeniile VL și VH care recunosc același epitop sunt prezentate utilizând același tipar de umbrire sau de umplere.

**Figurile 3A-3C** furnizează scheme care prezintă diacorpi tetravalenți reprezentativi având patru situsuri de legare la epitop compuse din două perechi de catene de polipeptide (adică, patru catene de polipeptide în total). O polipeptidă din fiecare pereche posedă un domeniu CH2 și CH3, astfel încât catenele asociate formează toată sau o parte a unei regiuni Fc. Domeniile VL și VH care recunosc același

epitop sunt prezentate utilizând același tipar de umbrire sau de umplere. Cele două perechi de catene de polipeptide pot fi aceleași. În astfel de cazuri în care domeniile VL și VH recunosc epitopi diferiți (așa cum se arată în **Figurile 3A-3C**), molecula rezultată posedă patru situsuri de legare la epitop și este bispecifică și bivalentă față de fiecare epitop legat. În astfel de cazuri în care domeniile VL și VH recunosc același epitop (de exemplu, aceleași regiuni CDR ale domeniului VL și aceleași regiuni CDR ale domeniului VH, sunt utilizate pe ambele catene), molecula rezultată posedă patru situsuri de legare la epitop și este monospecifică și tetravalentă față de un singur epitop. Alternativ, cele două perechi de polipeptide pot fi diferite. În astfel de cazuri în care domeniile VL și VH ale fiecărei perechi de polipeptide recunosc epitopi diferiți (așa cum se arată în **Figurile 3A-3C**), molecula rezultată posedă patru situsuri de legare la epitop și este tetraspecifică și monovalentă față de fiecare epitop legat. **Figura 3A** prezintă un diacorp Fc care conține un domeniu de promovare a heterodimerului peptidic cuprinzând un rest de cisteină. **Figura 3B** prezintă un anticorp care conține o regiune Fc, care conține domeniile care promovează heterodimerii care conțin bucla E și bucla K cuprinzând un rest de cisteină și un liant (cu un rest de cisteină opțional). **Figura 3C**, prezintă un diacorp care conține o regiune Fc, care conține domeniile anticorpilor CH1 și CL.

**Figurile 4A și 4B** furnizează schema unei molecule diacorp reprezentative legate covalent având două situsuri de legare la epitop compuse din trei catene de polipeptide. Două catene de polipeptide au un domeniu CH2 și CH3, astfel încât catenele asociate formează toată sau o parte a unei regiuni Fc. Catenele de polipeptide cuprinzând domeniile VL și VH cuprind suplimentar un domeniu care promovează heterodimerul. Domeniile VL și VH care recunosc același epitop sunt prezentate utilizând același tipar de umbrire sau de umplere.

**Figura 5** furnizează schema unei molecule diacorp reprezentativă legată covalent având patru situsuri de legare la epitop compusă din cinci catene de polipeptide. Două catene de polipeptide au un domeniu CH2 și CH3, astfel încât catenele asociate formează o regiune Fc care cuprinde toată sau o parte a unei regiuni Fc. Catenele de polipeptide cuprinzând domeniile legate VL și VH cuprind suplimentar un domeniu care promovează heterodimerul. Domeniile VL și VH care recunosc același epitop sunt prezentate utilizând același tipar de umbrire sau de umplere.

**Figurile 6A-6F** furnizează scheme ale moleculelor de legare trivalente care conțin regiuni Fc reprezentative care au trei situsuri de legare la epitop. **Figurile 6A și 6B**, respectiv, ilustrează schematic domeniile moleculelor de legare trivalente care cuprind două domenii de legare de tip diacorp și un domeniu de legare de tip Fab având diferite orientări de domeniu în care domeniile de legare de tip diacorp sunt N-terminale sau C-terminale la o regiune Fc. Moleculele din **Figurile 6A și 6B** cuprind patru catene. **Figurile 6C și 6D**, respectiv, ilustrează schematic domeniile moleculelor de legare trivalente care cuprind două domenii de legare de tip diacorp N-terminale la o regiune Fc, și un domeniu de legare de tip Fab în care lanțul ușor și lanțul greu sunt marcate printr-un distanțier polipeptidic, sau printr-un domeniu de legare de tip scFv. Moleculele de legare trivalente din **Figurile 6E și 6F**, respectiv ilustrează schematic domeniile moleculelor de legare trivalente care cuprind două domenii de legare de tip diacorp C-terminale la o regiune Fc, și un domeniu de legare legat de tip Fab, sau un domeniu de legare de tip scFv în care sunt domeniile de legare de tip diacorp. Moleculele de legare trivalente din **Figurile 6C-6F** cuprind trei lanțuri. Domeniile VL și VH care recunosc același epitop sunt prezentate utilizând același tipar de umbrire sau de umplere.

**Figurile 7A-7D** arată că anticorpul anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se leagă la PD-1 uman. Curbele de legare pentru legarea la shPD-1-His sunt prezentate în **Figura 7A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4 și PD-1 mAb 9), **Figura 7B** (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, și PD-1 mAb 7), și **Figura 7C** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, și PD-1 mAb 15). Curbele de legare pentru legarea la Fc shPD-1-uman sunt prezentate în **Figura 7D** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, și PD-1 mAb 15).

**Figurile 8A-8C** arată că anticorpul anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se leagă la PD-1 de maimuță cynomolgus. Curbele de legare pentru legarea la Fc scynoPD-1-h sunt prezentate în **Figura 8A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7), **Figura 8B** (PD-1 mAb 9), și **Figura 8C** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, și PD-1 mAb 15).

**Figurile 9A-9D** arată abilitatea anticorpilor anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 de a bloca legarea PD-L1 uman la PD-1 uman. Curbele de inhibare sunt prezentate în **Figura 9A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 15, și PD-1 mAb A), **Figura 9B** (PD-1 mAb 4), **Figura 9C** (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, și PD-1 mAb A), și **Figura 9D** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, PD-1 mAb 15, și PD-1 mAb A).

**Figurile 10A-10B** arată specificitatea țesutului anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 7. **Figura 10A** arată colorarea histologică a țesutului colonului normal (**Panourile i și vii**), ficatului (**Panourile ii și viii**), plămânului (**Panourile iii și ix**), pancreasului (**Panourile**

iv și x), rinichilor (**Panourile v și xi**) și inimii (**Panourile vi și xii**). **Figura 10A**, **Panourile i-vi** arată rezultatele țesutului incubat cu PD-1 mAb 7 marcat (0,313 μg/mL). **Figura 10A**, **Panourile vii-xii** arată rezultatele țesutului incubat cu mAb de control al izotipului marcat (0,314 μg/mL). **Figura 10B** arată colorarea histologică a pielii (**Panourile i și iv**), amigdalelor (**Panourile ii și v**), și a celulelor NSO care exprimă PD-1 (**Panourile iii și vi**). **Figura 10B**, **Panourile i-iii** arată rezultatele țesutului incubat cu PD-1 mAb 7 marcat (0,313 μg/mL).

**Figura 11** prezintă profilurile de legare ale anticorpilor PD-1 anti-umani umanizați hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1,1), hPD-1 mAb 7(1,2), hPD-1 mAb 9(1,1), și ale anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B având IgG1 (AA) sau IgG4 (P) pentru legarea la PD-1 a suprafeței celulare.

**Figurile 12A-12B** arată abilitatea anticorpilor anti-PD umanizați hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1,1), hPD-1 mAb 7(1,2), hPD-1 mAb 9(1,1), și a anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B, având IgG1 (AA) sau IgG4 (P) de a bloca legarea PD-L1 uman solubil (**Figura 12A**) și a PD-L2 uman solubil (**Figura 12B**) la PD-1 uman al suprafeței celulare.

**Figura 13** prezintă abilitatea anticorpilor anti-PD umanizați hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1,1), hPD-1 mAb 7(1,2), hPD-1 mAb 9(1,1), și a anticorpilor anti-PD-1 de referință mAb A și PD-1 mAb B, având IgG1 (AA) sau IgG4 (P) de a antagoniza axa PD-1/PD-L1 prin blocarea interacțiunii PD-1/PD-L1 și prevenirea reglării negative a răspunsurilor celulei T într-un test reporter de luciferază Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1.

**Figura 14** arată că PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 și PD-1 mAb 15 sunt capabili să stimuleze producția de citokine la niveluri comparabile sau mai ridicate decât ale anticorpilor anti-PD-1 referențiali (PD-1 mAb A și PD-1 mAb B) și că tratamentul cu PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 și PD-1 mAb 15 în combinație cu LAG-3 mAb 1 a furnizat cea mai mare sporire de eliberare a citokinelor. Profilurile de secreție IFN $\gamma$  de la PBMC-urile stimulate cu enterotoxină B *Staphylococcal* (SEB) tratate cu anticorpi anti-PD-1 și anti-LAG-3 singuri și în combinație.

**Figurile 15A-15B** prezintă abilitatea anticorpilor anti-PD umanizați hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1,2), hPD-1 mAb 9(1,1), și a anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B, având IgG1 (AA) sau IgG4 (P) de a stimula producția de citokine. IFN $\gamma$  (**Figura 15A**) și TNF $\alpha$  (**Figura 15B**), profilurile de secreție din PBMC-urile stimulate cu SEB, tratate cu anticorpi anti-PD-1.

**Figurile 16A-16B** arată că construcțiile diacorp bispecifice PD-1 x LAG-3, DART A, DART D, DART E, DART F, DART G și DART H, sunt capabile să stimuleze producția de citokine la niveluri comparabile sau mai ridicate decât cele observate după administrarea combinației dintre un anti-PD-1 mAb + un anti-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), și că construcțiile diacorp bispecifice PD-1 x LAG-3, DART A, DART D, DART E, DART F și DART G au furnizat cel mai mare spor de eliberare de citokine. Sunt reprezentate grafic profilurile de secreție IFN $\gamma$  ale PBMC-urilor stimulate cu o concentrație scăzută de SEB (0,2 ng/mL) tratate cu diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3, sau anticorpi anti-PD-1 și anti-LAG-3 singuri și în combinație. Rezultatele utilizând PBMC-uri de la doi donatori reprezentativi sunt prezentate în **Figura 16A** și **Figura 16B**.

**Figurile 17A-17B** arată că construcțiile diacorp bispecifice PD-1 x LAG-3 DART A, DART B și DART C sunt capabile să stimuleze producția de citokine la niveluri mai ridicate decât cele observate după administrarea combinației de un anti-PD-1 mAb + un anti-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Sunt reprezentate grafic profilurile de secreție IFN $\gamma$  ale PBMC-urilor de la doi donatori reprezentativi, stimulate cu o concentrație ridicată de SEB (85 ng/mL) tratată cu diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3, sau cu anticorpi anti-PD-1 și anti-LAG-3 singuri și în combinație. Rezultatele utilizând PBMC-uri de la doi donatori reprezentativi sunt prezentate în **Figura 17A** și **Figura 17B**.

**Figurile 18A-18B** arată că construcțiile diacorp bispecifice PD-1 x LAG-3 DART A, DART B și DART C sunt capabile să stimuleze producția de citokine la niveluri mai ridicate decât cele observate după administrarea combinației dintre un anti-PD-1 mAb + un anti-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Sunt reprezentate grafic profilurile de secreție IFN $\gamma$  ale PBMC-urilor de la doi donatori reprezentativi, stimulate cu o concentrație medie de SEB (0,5 ng/mL) tratate cu diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3, sau anticorpi anti-PD-1 și anti-LAG-3 singuri și în combinație. Rezultatele utilizând PBMC-uri de la doi donatori reprezentativi sunt prezentate în **Figura 18A** și **Figura 18B**.

**Figura 19** arată că construcțiile diacorp bispecifice PD-1 x LAG-3, DART D și DART H sunt capabile să stimuleze producție de citokine la niveluri comparabile sau mai ridicate decât cele observate după administrarea combinației dintre un anti-PD-1 mAb + un anti-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), și că DART D a furnizat cel mai mare spor de eliberare de citokine. Sunt reprezentate grafic profilurile de secreție IL-2 ale PBMC-urilor de la un donator reprezentativ stimulate cu o concentrație ridicată de SEB (85 ng/mL) tratate cu diacorpi bispecifici PD-1 x LAG-3, sau anticorpi anti-PD-1 și anti-LAG-3 singuri și în combinație.

**Figura 20** arată că construcțiile diacorp bispecifice PD-1 x LAG-3 DART B și DART I sunt capabile să stimuleze producția de citokine la niveluri mai ridicate decât cele observate după administrarea combinației dintre un anti-PD-1 mAb + un anti-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb

A, hPD-1 mAb 7(1,2) + hLAG-3 mAb 1(1,4), hPD-1 mAb 7(1,2) + hLAG-3 mAb 6(1,1)). Sunt reprezentate grafic profilurile de secreție IFN $\gamma$  ale PBMC de la un donator reprezentativ, stimulate cu o concentrație medie de SEB (0,5 ng/mL) tratate cu diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3, sau anticorpi anti-PD-1 și anti-LAG-3 singuri și în combinație.

**Figurile 21A-21D** arată că acel diacorp bispecific PD-1 x LAG-3 DART I este capabil să stimuleze producția de citokine la niveluri mai ridicate decât cele observate după administrarea combinației dintre un anti-PD-1 mAb + un anti-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Sunt reprezentate grafic profilurile de secreție IFN $\gamma$  (**Figurile 21A și 21C**) și IL-2 (**Figurile 21B și 21D**) ale celulelor de memorie CD4 de la doi donatori reprezentativi, stimulate cu toxoid de tetanus (5  $\mu$ g/mL) tratat cu diacorpul bispecific PD-1 x LAG-3 DART-I, anticorpii anti-PD-1 și anti-LAG-3 în combinație, sau un control cu izotip. Rezultatele din ziua 7 utilizând celule T de memorie CD4 de la doi donatori reprezentativi sunt prezentate în **Figurile 21A-B și Figurile 21C-D**.

**Figura 22** arată că farmacocineticele moleculelor biospecifice PD-1 x LAG-3, DART I sunt comparabile cu cele ale anticorpului anti-PD-1, PD-1 mAb A IgG4 (P) la maimuța cynomolgus. Liniile au indicat concentrația medie în ser de DART I (continuu) și PD-1 mAb A (punctat). Valorile individuale pentru maimuțele masculi (umplut) și femele (neumplut) sunt reprezentate grafic pentru DART I (triunghiuri) și PD-1 mAb A (cercuri).

**Figurile 23A-23C** arată concentrațiile de anticorp din ser și procentajul de PD-1 legat pe suprafața celulelor T CD4 $^{+}$  sau CD8 $^{+}$  pe durata de timp în care animalele urmează tratamentul cu diferiți anticorpi anti-PD-1. Procentajul de PD 1 legat pe suprafața celulelor T CD4 $^{+}$  sau CD8 $^{+}$  după tratamentul cu anti-PD 1 mAb este reprezentat grafic pe axa y din dreapta; simbolurile reprezintă % de legare al PD 1 pe celulele T pentru fiecare animal individual și liniile punctate reprezintă valorile medii. Concentrațiile de mAb în ser sunt reprezentate grafic pe axa y stângă; simbolurile reprezintă nivelurile serice pentru fiecare animal individual și liniile continue reprezintă ajustările neliniare ale datelor. Fiecare panou prezintă datele pentru animalele (n = 1/sex/grup) cărora le-au fost administrate 10 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) (**Figura 23A**), PD-1 mAb A IgG4 (P) (**Figura 23B**), sau PD-1 mAb B IgG4 (P) (**Figura 23B**) prin perfuzie IV în ziua 1.

#### Descriere detaliată a invenției

Prezenta divulgare este direcționată spre moleculele de legare PD-1 care cuprind domeniul de legare la PD-1 al anticorpilor selectați-PD-1 capabili de legare atât la PD-1 de maimuța cynomolgus cât și la PD-1 uman: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15. Divulgarea se preocupă în special cu moleculele de legare la PD-1 care sunt versiuni umanizate sau himerice ale unor astfel de anticorpi, sau care cuprind fragmente de legare la PD-1 ale unor astfel de anticorpi anti-PD-1 (în special imunoconjugăți, diacorpi (incluzând fără a se limita la DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I, și DART-J), BiTE-uri, anticorpi bispecfici, etc.). Divulgarea se preocupă în special cu astfel de molecule de legare la PD-1 care sunt capabile în plus de legarea unui epitop al unei molecule implicate în reglarea unui punct de control imun care este prezent pe suprafața unei celule imune. Prezenta divulgare se referă de asemenea la metode de utilizare ale unor astfel de molecule de legare la PD-1 pentru a detecta PD-1 sau pentru a stimula un răspuns imun. Prezenta divulgare se referă de asemenea la metode de terapie combinată în care o moleculă de legare la PD-1 care cuprinde unul sau mai multe domenii de legare la PD-1 ale unor astfel de anticorpi anti-PD-1 selectați este administrată în combinație cu una sau mai multe molecule suplimentare care sunt eficiente în stimularea unui răspuns imun și/sau în combinație cu una sau mai multe molecule suplimentare care se leagă specific la un antigen al cancerului.

#### I. Anticorpi și domeniile lor de legare

Anticorpii din prezenta divulgare sunt molecule de imunoglobulină capabile de legarea specifică la o țintă, cum ar fi un carbohidrat, polinucleotidă, lipidă, polipeptidă, etc., prin cel puțin un situs de recunoaștere al antigenului, situat în domeniul variabil al moleculei de imunoglobulină. Așa cum s-a utilizat în acest document, termenii „anticorp” și „anticorpi” se referă la anticorpi monoclonali, anticorpi multispecfici, anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi sintetici, anticorpi himerici, anticorpi policlonali, anticorpi camelizați, Fv-uri monocatenare (scFv), anticorpi monocatenari, fragmente Fab, fragmente F(ab'), Fv-uri bispecifice legate la disulfură (sdFv), intracorpi, și fragmente care se leagă la epitop ale oricăroră din cei de mai sus. În particular, anticorpii includ molecule de imunoglobulină și fragmente active imunologice de molecule de imunoglobulină, adică, molecule care conțin un situs de legare la antigen. Moleculele de imunoglobulină pot fi de orice tip (de exemplu, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA și IgY), clasă (de exemplu, IgG $_1$ , IgG $_2$ , IgG $_3$ , IgG $_4$ , IgA $_1$  și IgA $_2$ ) sau subclasă. În plus față de utilizările lor cunoscute în diagnostic, s-a dovedit că anticorpii sunt utili ca agenți terapeutici. Anticorpii sunt capabili de legare imunspecifică la o polipeptidă sau proteină sau la o moleculă de non-proteină din cauza prezenței pe o astfel de moleculă a unui anumit domeniu sau radical sau conformație (un „epitop”). O moleculă care conține un epitop poate avea activitate imunogenică, astfel încât ea declanșează un răspuns

al producției de anticorpi la un animal; astfel de molecule sunt denumite „antigeni“). Ultimele câteva decade au văzut o revitalizare a interesului în potențialul terapeutic al anticorpilor, și anticorpii au devenit una dintre clasele conducătoare ale medicamentelor derivate din biotehnologie (Chan, C.E. și colab. (2009) „The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases“, Singapore Med. J. 50(7):663-666). Peste 200 de medicamente pe bază de anticorpi au fost aprobate pentru utilizare sau sunt sub dezvoltare.

Termenul „anticorp monoclonal“ se referă la o populație de anticorpi omogeni în care anticorpul monoclonal este compus din aminoacizi (care apar natural și nu apar apar natural) care sunt implicați în legarea selectivă a unui antigen. Anticorpii monoclonali sunt foarte specifici, fiind direcționați împotriva unui singur epitop (sau situs antigenic). Termenul „anticorp monoclonal“ cuprinde nu numai anticorpi intacti monoclonali și anticorpi monoclonali cu lungime completă, ci de asemenea și fragmente ale acestora (cum ar fi Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), monocatenari (scFv), mutanți ai acestora, proteine de fuziune cuprinzând o porțiune de anticorp, anticorpi monoclonali umanizați, anticorpi monoclonali himerici, și orice altă configurație modificată a moleculei de imunoglobulină care cuprinde un situs de recunoaștere al antigenului de specificitate necesară și abilitate de a se lega la un antigen. Nu intenționează să fie limitativ în ceea ce privește sursa anticorpului sau maniera în care acesta este făcut (de exemplu, prin hibridom, selecție de bacteriofagi, exprimare recombinantă, animale transgenice, etc.). Termenul include întregile imunoglobuline precum și fragmentele etc. descrise mai sus sub definiția de „anticorp“. Metodele de realizare a anticorpilor monoclonali sunt cunoscute în domeniu. O metodă care poate fi utilizată este metoda lui Kohler, G. și colab. (1975) „Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity“, Nature 256:495-497 sau o modificare a acesteia. De obicei, anticorpii monoclonali sunt dezvoltati la șoareci, șobolani sau iepuri. Anticorpii sunt produși prin imunizarea unui animal cu o cantitate imunogenică de celule, extracte celulare, sau preparări proteice care conțin epitopul dorit. Imunogenul poate fi, dar nu se limitează la, celule primare, linii celulare cultivate, celule canceroase, proteine, peptide, acizi nucleici, sau țesut. Celule utilizate pentru imunizare pot fi cultivate pe o perioadă de timp (de exemplu, cel puțin 24 ore) înainte de utilizarea lor ca un imunogen. Celulele pot fi utilizate ca imunogeni prin ele însele sau în combinație cu un adjuvant nederivat, cum ar fi Ribi (vezi, de exemplu, Jennings, V.M. (1995) „Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production“, ILAR J. 37(3):119-125). În general, celulele ar trebui să fie păstrate intacte și preferabil viabile când sunt utilizate ca imunogeni. Celulele intacte pot permite ca antigenii să fie detectați mai bine decât celulele rupte de animalul imunizat. Utilizarea de adjuvanți denaturați sau duri, de exemplu, adjuvantul lui Freud, poate rupe celulele și prin urmare este descurajată. Imunogenul poate fi administrat de mai multe ori la intervale periodice cum ar fi, bi-săptămânal, sau săptămânal, sau poate fi administrat într-un astfel de mod încât să se mențină viabilitatea animalului (de exemplu, într-un țesut recombinant). Alternativ, anticorpii monoclonali existenți și orice alți anticorpi echivalenți care sunt imunospesifici pentru un epitop patogen dorit pot fi secvențiați și produși recombinant prin orice mijloace cunoscute în domeniu. Într-un caz, un astfel de anticorp este secvențiat și secvența de polinucleotide este apoi clonată într-un vector pentru expresie sau propagare. Secvența care codifică anticorpul de interes poate fi menținută într-un vector într-o celulă gazdă și celula gazdă poate fi apoi expandată și congelată pentru utilizarea viitoare. Secvența de polinucleotide a unor astfel de anticorpi poate fi utilizată pentru manipularea genetică pentru a genera molecule monospecifice sau multispecifice (de exemplu, bispecifice, trispecifice și tetraspecifice) din divulgare precum și o afinitate optimizată, un anticorp himeric, un anticorp umanizat, și/sau un anticorp caninizat, pentru a îmbunătăți afinitatea, sau alte caracteristici ale anticorpului. Principiul general în umanizarea unui anticorp implică reținerea secvenței de bază a porțiunii de legare la antigen a anticorpului, în timp ce schimbă restul neuman al anticorpului cu secvențe de anticorp uman.

Anticorpii naturali (cum ar fi anticorpii IgG) sunt compuși din două **lanțuri ușoare** complexate cu două **lanțuri grele**. Fiecare lanț ușor conține un domeniu variabil (**VL**) și un domeniu constant (**CL**). Fiecare lanț greu conține un domeniu variabil (**VH**), trei domenii constante (**CH1**, **CH2** și **CH3**), și un domeniu balama situat între domeniile **CH1** și **CH2**. Unitatea structurală de bază a imunoglobulinei care apare natural (de exemplu, IgG) este astfel un tetramer având două lanțuri ușoare și două lanțuri grele, exprimat uzual ca glicoproteină de aproximativ 150.000 Da. Porțiunea amino-terminală („N-terminal“) a fiecărui lanț include un domeniu variabil de aproximativ 100 până la 110 sau mai mulți aminoacizi responsabili în primul rând pentru recunoașterea antigenului. Porțiunea carboxi-terminală („C-terminal“) a fiecărui lanț definește o regiune constantă, cu lanțurile ușoare având un singur domeniu constant și lanțurile grele având uzual trei domenii constante și un domeniu balama. Astfel, structura de lanțuri ușoare a unei molecule IgG este n-VL-CL-c și structura de lanțuri grele IgG este n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (unde H este domeniul balama, și n și c reprezintă, respectiv, N-terminalul și C-terminalul polipeptidei). Domeniile variabile ale unei molecule IgG constau din regiunile determinante de complementaritate (**CDR**), care conțin resturi în contact cu epitopul, și segmente non-CDR, la care se face referire ca segmente cadru (**FR**), care în general mențin structura și determină

poziționarea buclelor CDR astfel încât să permită o astfel de punere în contact (deși anumite resturi cadru pot de asemenea contacta antigenul). Astfel, domeniile VL și VH au structura n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Polipeptidele care sunt (sau pot servi ca) prima, a doua și a treia regiune CDR ale unui lanț ușor al anticorpului sunt denumite aici respectiv **domeniul CDR<sub>L1</sub>**, **domeniul CDR<sub>L2</sub>**, și **domeniul CDR<sub>L3</sub>**. În mod similar, polipeptidele care sunt (sau pot servi ca) prima, a doua și a treia regiune CDR ale unui lanț greu al anticorpului sunt denumite aici respectiv **domeniul CDR<sub>H1</sub>**, **domeniul CDR<sub>H2</sub>**, și **domeniul CDR<sub>H3</sub>**. Astfel, termenii domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, domeniul CDR<sub>L3</sub>, domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> sunt direcționați spre polipeptide care când sunt încorporate într-o proteină determină acea proteină să fie capabilă să se lege la un epitop specific indiferent dacă o astfel de proteină este un anticorp având lanțuri ușoare și grele sau un diacorp sau o moleculă de legare monocatenară (de exemplu, un scFv, un BiTe, etc.), sau este un alt tip de proteină. Corespunzător, așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „**fragment de legare la epitop**” înseamnă un fragment al unui anticorp capabil de legare imunospecifică la un epitop, și termenul „**situs de legare la epitop**” se referă la acea porțiune a unei molecule cuprinzând un fragment de legare la epitop care este responsabil pentru legarea la epitop. Un situs de legare la epitop poate conține 1, 2, 3, 4, 5 sau toate cele 6 din domeniile CDR ale unui astfel de anticorp și, deși capabil de legare imunospecifică la un astfel de epitop, poate prezenta o imunospecificitate, afinitate sau selectivitate spre un astfel de epitop care diferă de cea a unui astfel de anticorp. Preferabil, totuși, un fragment de legare la epitop va conține toate cele 6 din domeniile CDR ale unui astfel de anticorp. Un fragment de legare la epitop al unui anticorp poate fi o polipeptidă monocatenară (de exemplu, un scFv), sau poate cuprinde două sau mai multe catene de polipeptide, fiecare având un terminal amino și un terminal carboxi (de exemplu, un diacorp, un fragment Fab, un fragment F(ab')<sub>2</sub>, etc.).

Divulgarea cuprinde în special fragmente ale domeniului variabil monocatenar („scFv”) al anticorpilor anti-PD-1 ai acestei divulgări și ale moleculelor de legare multispecifică care le cuprind. Fragmentele domeniului variabil monocatenar sunt făcute prin legarea domeniului variabil al lanțului ușor și/sau greu prin utilizarea unei peptide scurte de legare. Bird și colab. (1988) („Single-Chain Antigen-Binding Proteins”, Science 242:423-426) descrie exemplul de peptide de legare care leagă în puncte aproximativ 3,5 nm între terminalul carboxi al unui domeniu variabil și terminalul amino al celui alt domeniu variabil. Au fost concepuți și utilizați și lanțuri ai altor secvențe (Bird și colab. (1988) „Single-Chain Antigen-Binding Proteins”, Science 242:423-426). Lanțurile pot fi în schimb modificate pentru funcții suplimentare, cum ar fi atașarea de medicamente sau atașarea la suporturi solide. Variantele monocatenare pot fi produse fie recombinant sau fie sintetice. Pentru producția sintetică de scFv, poate fi utilizat un sintetizator automat. Pentru producția recombinantă de scFv, o polinucleotidă adecvată care conține plasmidă care codifică scFv, poate fi introdusă într-o celulă gazdă adecvată, fie eucariotă, cum ar fi drojdie, plantă, celule de insecte sau de mamifer, sau fie procariotă, cum ar fi E. coli. Polinucleotidele care codifică scFv de interes pot fi făcute prin manipulări de rutină cum ar fi ligarea polinucleotidelor. ScFv rezultat poate fi izolat utilizând tehnici standard de purificare ale proteinelor cunoscute în domeniu.

Divulgarea cuprinde de asemenea în special variante umanizate de anticorpi anti-PD-1 din divulgare și moleculele de legare multispecifică care le cuprind. Termenul anticorp „umanizat” se referă la o moleculă himerică, preparată în general utilizând tehnici recombinante, având un loc de legare la antigen al unei imunoglobuline dintr-o specie neumană și o structură rămasă de imunoglobulină a moleculei care se bazează pe structura și /sau secvența unei imunoglobuline umane. Anticorpii PD-1 anti-umani din prezenta divulgare includ variantele de anticorpi umanizați, himerici sau caninizați PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15. Secvența de polinucleotidă a domeniilor variabile ale unor astfel de anticorpi poate fi utilizată pentru manipularea genetică pentru a genera astfel de derivați și pentru a îmbunătăți afinitatea, sau alte caracteristici ale unor astfel de anticorpi. Principiul general în umanizarea un anticorp implică reținerea secvenței de bază a porțiunii de legare la antigen a anticorpului, în timp ce se schimbă restul non-uman al anticorpului cu secvențe de anticorp uman. Există patru etape generale pentru a umaniza un anticorp monoclonal. Aceste sunt: (1) determinarea nucleotidei și a secvenței de aminoacizi predictată ale domeniilor variabile ușoare și grele ale anticorpului de început (2) proiectarea anticorpului umanizat sau caninizat, adică, deciderea care regiune cadru a anticorpului va fi utilizată în timpul procesului de umanizare sau caninizare (3) metodologii/tehnicile actuale de umanizarea sau caninizare și (4) transfectarea și expresia anticorpului umanizat. Vezi, de exemplu, brevetele S.U.A. nr. 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; și 6.331.415.

Situsul de legare la antigen poate cuprinde fie un domeniu variabil complet fuzionat cu un domeniu constant sau numai regiunile determinante de complementaritate (regiunile CDR) ale unui astfel de domeniu variabil grefate la regiunile cadru adecvate. Situsurile de legare la antigen pot fi de tip sălbatic sau modificate prin una sau mai multe substituții de aminoacizi. Acest lucru elimină regiunea

constantă ca un imunogen la indivizii umani, dar rămâne posibilitatea unui răspuns imun la domeniul variabil străin (LoBuglio, A.F. și colab. (1989) „Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). O altă abordare nu se concentrează numai pe furnizarea regiunilor constante derivate umane, ci și pe modificarea domeniilor variabile ca și pe remodelarea lor cât mai apropiat posibil de forma umană. Se cunoaște că domeniile variabile ale ambelor lanțuri grele și ușoare conțin trei regiuni determinante de complementaritate (regiuni CDR) care variază ca răspuns la antigenii în cauză și determină capacitatea de legare, flancate de patru regiuni cadru (FR-uri) care sunt relativ conservate la o specie dată și care asigură putativ un eșafodaj pentru regiunile CDR. Când anticorpii neumani sunt preparați față de un anumit antigen, domeniile variabile pot fi „remodelate“ sau „umanizate“ prin grefarea regiunilor CDR derivate de la anticorpi neumani pe FR-urile prezente în anticorpusul uman care urmează a fi modificat. Aplicarea acestei metode la diferiți anticorpi a fost raportată de Sato, K. și colab. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. și colab. (1988) „Reshaping Human Antibodies for Therapy“, Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. și colab. (1988) „Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity“, Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. și colab. (1991) „Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation“, Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. și colab. (1991) „Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity“, Human Antibodies Hibridoma 2:124-134; Gorman, S. D. și colab. (1991) „Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. și colab. (1991) „Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo“, Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. și colab. (1991) „Humanized Antibodies For Antiviral Therapy“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. și colab. (1992) „Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; și Co, M.S. și colab. (1992) „Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen“, J. Immunol. 148:1149-1154. În unele cazuri, anticorpii umanizați conservă toate secvențele CDR (de exemplu, un anticorp umanizat de soarece care conține toate cele șase regiuni CDR de la anticorpusul de soarece). În alte cazuri, anticorpii umanizați au una sau mai multe regiuni CDR (una, două, trei, patru, cinci, sau șase) care diferă în secvență față de anticorpusul original.

A fost descris un număr de molecule de anticorp „umanizate“ cuprinzând un situs de legare la antigen derivat dintr-o imunoglobulină neumană, incluzând anticorpi himerici având domeniul variabil de rozător sau de rozător modificat și regiunile lor determinante de complementaritate (regiuni CDR) asociate fuzionate cu domeniile constante umane (vezi, de exemplu, Winter și colab. (1991) „Man-made Antibodies“, Nature 349:293-299; LoBuglio și colab. (1989) „Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw și colab. (1987) „Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen“, J. Immunol. 138:4534-4538, și Maro și colab. (1987) „Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody“, Cancer Res. 47:3577-3583). Alte referiri descriu regiunile CDR de rozător grefate la un om care susține regiunea cadru (FR) înainte de fuziunea cu un domeniu constant al anticorpusului uman adecvat (vezi, de exemplu, Riechmann, L. și colab. (1988) „Reshaping Human Antibodies for Therapy“, Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. și colab. (1988) „Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity“, Science 239:1534-1536; și Jones și colab. (1986) „Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse“, Nature 321:522-525). O altă referință descrie regiuni CDR de rozător susținute de regiuni cadru de rozător furnizate recombinant. Vezi, de exemplu, publicația de brevet european nr. 519.596. Aceste molecule „umanizate“ sunt concepute să minimizeze răspunsul imunologic nedorit către moleculele anticorpusului anti-uman de rozător, care limitează durata și eficacitatea aplicațiilor terapeutice ale acelor radicali la destinatarii umani. Alte metode de umanizarea anticorpusilor care pot fi de asemenea utilizate sunt divulgate de Daugherty și colab. (1991) „Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins“, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 și în brevetele S.U.A. nr. 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; și 5.866.692.

## II. Receptori Fcγ (FcγR-uri)

Domeniile CH2 și CH3 ale celor două lanțuri grele interacționează pentru a forma regiunea Fc, care este un domeniu care este recunoscut de **receptorii Fc** celulari, incluzând dar fără a se limita la, receptorii gama Fc (**FcγR-uri**). Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „regiune Fc“ este utilizat pentru a defini o regiune C-terminală a unui lanț greu IgG. Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unui exemplu de IgG1 uman este (SEQ ID NO:1):

231 240 250 260 270 280  
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

290 300 310 320 330  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME

440 447  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

cum s-a numerotat prin indicele EU cum s-a stabilit în Kabat, în care, X este o lizină (K) sau este absent.

5 Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unui exemplu de IgG2 uman este (SEQ ID

NO:2):

231 240 250 260 270 280  
 APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

290 300 310 320 330  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

340 350 360 370 380  
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

390 400 410 420 430  
 WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME

440 447  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

cum s-a numerotat prin indicele EU cum s-a stabilit în Kabat, în care, X este o lizină (K) sau este absent.

Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unui exemplu de IgG3 uman este (SEQ ID

10 NO:3):

231 240 250 260 270 280  
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

290 300 310 320 330  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380  
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430  
 WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVME

440 447  
 ALHNRFTQKS LSLSPGX

cum s-a numerotat prin indicele EU cum s-a stabilit în Kabat, în care, X este o lizină (K) sau este absent.

Secvența de aminoacizi a domeniului CH2-CH3 al unui exemplu de IgG4 uman este (SEQ ID

NO:4):

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

      340      350      360      370      380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPQSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

cum s-a numerotat prin indicele EU cum s-a stabilit în Kabat, în care, **X** este o lizină (K) sau este absent.

Prin prezenta descriere, numerotarea resturilor din regiunea constantă a unui lanț greu IgG este în mod special cea a indicelui EU ca în Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, ed. a 5-a Public Health Service, NH1, MD (1991) („Kabat“). Termenul „indice EU ca în Kabat“ se referă la numerotarea anticorpului EU IgG uman. Aminoacizii din domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare mature de imunoglobulină sunt denumiți prin poziția unui aminoacid în lanț. Kabat a descris numeroase secvențe de aminoacizi pentru anticorpi, identificate ca o secvență de aminoacizi consens pentru fiecare subgrup, și a asignat un număr de rest fiecărui aminoacid, și regiunile CDR sunt identificate cum au fost definite de Kabat (se va înțelege că CDR<sub>H</sub>1 cum s-a definit de Chotia, C. & Lesk, A. M. ((1987) „Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins“, J. Mol. Biol. 196:901-917) începe cu cinci resturi mai devreme). Schema de numerotare Kabat este extensibilă la anticorpii neincluși în compendiul său prin alinierea anticorpului în cauză cu una dintre secvențele consens în Kabat prin referința la aminoacizii conservați. Această metodă pentru asignarea numerelor resturilor a devenit standard în domeniu și identifică cu ușurință aminoacizii din pozițiile echivalente în diferiți anticorpi, incluzând variantele himerice sau umanizate. De exemplu, un aminoacid la poziția 50 dintr-un lanț ușor al anticorpului uman ocupă poziția echivalentă cu un aminoacid la poziția 50 a unui lanț ușor al unui anticorp de șoarece.

Polimorfismele au fost observate la un număr de diferite poziții în regiunile constante ale anticorpului (de exemplu, pozițiile CH1, incluzând dar fără a se limita la pozițiile 192, 193, și 214; pozițiile Fc, incluzând dar fără a se limita la pozițiile 270, 272, 312, 315, 356, și 358 cum au fost numerotate prin indicele EU cum s-a stabilit în Kabat), și astfel pot exista ușoare diferențe între secvența prezentată și secvențele din stadiul anterior al tehnicii. Formele polimorfice de imunoglobulină umană au fost bine caracterizate. În prezent, sunt cunoscute 18 alotipuri Gm: G1m (1, 2, 3, 17) sau G1m (a, x, f, z), G2m (23) sau G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) sau G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, și colab., „The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation“. Pergamon, Oxford, pag. 43-78 (1990); Lefranc, G. și colab., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Este specific avut în vedere că anticorpii din prezenta divulgare pot fi încorporați în orice alotip, izoalotip, sau haplotip din orice genă de imunoglobulină, și nu sunt limitați la alotipul, izoalotipul sau haplotipul secvențelor furnizate aici. Mai mult, în unele sisteme de expresie restul aminoacid al C-terminalului (bolduit mai sus) al domeniului CH3 poate fi îndepărtat post-translațional. Corespunzător, restul C-terminal al domeniului CH3 este un rest opțional de aminoacid în moleculele de legare PD-1 din divulgare. Specific cuprinse în prezenta divulgare sunt moleculele de legare PD-1 care nu au restul C-terminal al domeniului CH3. De asemenea specific cuprinse în prezenta divulgare sunt astfel de construcții cuprinzând restul de lizină C-terminal al domeniului CH3.

Semnalele de activare și de inhibare sunt transduse prin ligarea unei regiuni Fc la un receptor gama Fc celular (FcγR). Abilitatea unei astfel de ligări de a conduce la funcții diametral opuse rezultă din diferențele structurale dintre diferiții FcγR. Două domenii distincte în domeniile de semnalizare citoplasmatică ale receptorului denumite motive de activare pe bază de tirozină imunoreceptoare (ITAM-uri) și motive inhibitoare pe bază de tirozină imunoreceptoare (ITIM-uri) reprezintă diferite răspunsuri. Recrutarea diferitelor enzime citoplasmatică la aceste structuri dictează rezultatul răspunsurilor celulare mediate de FcγR. Complecșii FcγR care conțin ITAM-uri includ FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, în timp ce complecșii care conțin ITIM-uri includ numai FcγRIIB. Neutrofilele umane exprimă gena FcγRIIA. Gruparea FcγRIIA prin complecși imunitari sau reticularea anticorpului specific servește pentru a agrega ITAM-urile împreună cu kinazele asociate receptorului care facilitează fosforilarea ITAM-urilor. Fosforilarea ITAM-urilor servește ca loc de andocare pentru kinaza Syk, a cărei activare conduce la

activarea substraturilor in aval (de exemplu, PI<sub>3</sub>K). Activarea celulară conduce la eliberarea de mediatori proinflamatori. Gena FcγRIIB este exprimată pe limfocitele B; domeniul său extracelular este 96% identic cu FcγRIIA și leagă complecși IgG într-o manieră nedistingibilă. Prezența unui ITIM în domeniul citoplasmatic al FcγRIIB definește această clasă inhibitorie de FcγR. Recent, a fost stabilită baza moleculară a acestei inhibiții. Când este co-ligat împreună cu o activare a FcγR, ITIM-ul din FcγRIIB devine fosforilat și atrage domeniul SH2 al inozitol polifosfat 5'-fosfatazei (SHIP), care hidrolizează mesagerii de fosfoinozitol eliberați ca o consecință a activării kinazei tirozine mediate de FcγR care conține ITAM, prevenind în consecință influxul de Ca<sup>++</sup> intracelular. Astfel reticularea de FcγRIIB amortizează activarea răspunsului la ligarea FcγR și inhibă responsivitatea celulară. Activarea celulei B, proliferarea celulei B și secreția de anticorp sunt astfel oprite.

### III. Anticorpi bispecfici, diacorpi multispecfici și diacorpi DART®

Abilitatea unui anticorp de a lega un epitop al unui antigen depinde de prezența și secvența de aminoacizi a domeniilor VL și VH ale anticorpului. Interacțiunea unui lanț ușor al anticorpului cu un lanț greu al anticorpului și, în particular, interacțiunea domeniilor sale VL și VH formează una dintre cele două situsuri de legare la epitop ale unui anticorp natural. Anticorpii naturali sunt capabili de legare doar la o specie de epitop (adică, ei sunt monospecfici), deși ei se pot lega la multiple copii ale acelei specii (adică, care prezintă bivalență sau multivalență).

Domeniile de legare din prezenta divulgare leagă epitopi într-o manieră „**imunospecifică**“. Așa cum s-a utilizat în acest document, un anticorp, diacorp sau altă moleculă care se leagă la epitop este menționat că leagă „**imunospecific**“ o regiune a unei alte molecule (adică, un epitop) dacă reacționează sau se asociază mai frecvent, mai rapid, cu o durată mai mare și/sau cu o afinitate mai mare cu acel epitop față de epitopi alternativi. De exemplu, un anticorp care se leagă imunospecific la un epitop viral este un anticorp care se leagă la acest epitop viral cu o afinitate mai mare, aviditate, mai ușor, și/sau cu o durată mai mare decât el se leagă imunospecific la alți epitopi virali sau epitopi non-virali. Este de asemenea înțeles prin citirea acestei definiții că, de exemplu, un anticorp (sau radical sau epitop) care se leagă imunospecific la o primă țintă poate sau nu se poate lega specific sau preferențial la o a doua țintă. Ca atare, „legarea imunospecifică“ nu necesită în mod necesar (deși poate include) legarea exclusivă. În general, dar nu în mod necesar, referința la legare înseamnă legare „specifică“. Se menționează că două molecule sunt capabile de legare una cu cealaltă într-o manieră „**fiziospecifică**“, dacă o astfel de legare prezintă specificitatea cu care receptorii se leagă la liganzii lor respectivi.

Funcționalitatea anticorpilor fi sporită prin generarea moleculelor pe bază de anticorpi multispecfici care se pot lega simultan la doi antigeni separați și distincți (sau epitopi diferiți ai aceluiași antigen) și/sau prin generarea moleculei pe bază de anticorp care are o valență mai ridicată (adică, mai mult de două situsuri de legare) pentru același epitop și/sau antigen.

Pentru a furniza molecule care au o capacitate mai mare decât anticorpii naturali, a fost dezvoltată o largă varietate de formate bispecifice de anticorpi recombinanți (vezi, de exemplu, publicațiile PCT numerele WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), din care majoritatea utilizează peptide liant fie pentru a fuziona cu un fragment suplimentar de legare la epitop (de exemplu, un scFv, VL, VH, etc.), sau în miezul anticorpului (IgA, IgD, IgE, IgG sau IgM), sau fie pentru a fuziona multiple fragmente care se leagă la epitop (de exemplu, două fragmente Fab sau fragmente scFv). Formatele alternative utilizează peptide liant pentru a fuziona cu un fragment de legare la epitop (de exemplu, un scFv, VL, VH, etc.) la un domeniu de dimerizare cum ar fi domeniul CH2-CH3 sau polipeptide alternative (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). De obicei, astfel de abordări implică periclitări și compromisuri. De exemplu, publicațiile PCT nr. WO 2013/174873, WO 2011/133886 și WO 2010/136172 divulgă că utilizarea lianților poate cauza probleme în setările terapeutice, și prezintă un anticorp trispecific în care domeniile CL și CH1 sunt schimbate din respectivele lor poziții naturale și domeniile VL și VH au fost diversificate (WO 2008/027236; WO 2010/108127) pentru a le permite să se lege la mai mult de un antigen. Astfel, moleculele divulgate în aceste documente comercializează specificitatea de legare pentru abilitatea de legare a speciilor suplimentare de antigen. Publicațiile PCT nr. WO 2013/163427 și WO 2013/119903 divulgă modificarea domeniului CH2 pentru a conține un aduct de proteină de fuziune cuprinzând un domeniu de legare. Documentul observă că domeniul CH2 joacă probabil numai un rol minimal în medierea funcțiilor efectoare. Publicațiile PCT nr. WO 2010/028797, WO2010028796 și WO 2010/028795 divulgă anticorpi recombinanți ale căror regiuni Fc au fost înlocuite cu domenii suplimentare VL și VH, astfel încât să formeze molecule de legare trivalente. Publicațiile PCT nr. WO 2003/025018 și WO2003012069 divulgă diacorpi recombinanți ale căror lanțuri individuale conțin domenii scFv. Publicația PCT nr. WO 2013/006544 divulgă molecule Fab multivalente care sunt sintetizate ca lanțuri polipeptidice și apoi sunt supuse la proteoliză pentru a da structuri heterodimerice. Astfel, moleculele divulgate în aceste documente comercializează toate sau unele dintre capacitățile de mediere ale funcțiilor efectoare pentru abilitatea de a lega specii suplimentare de antigen. Publicațiile PCT nr. WO 2014/022540, WO

2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 și WO 1991/003493 divulgă adăugarea de domenii suplimentare de legare sau grupuri funcționale la un anticorp sau la o porțiune de anticorp (de exemplu, adăugarea unui diacorp la lanțul ușor al anticorpului, sau adăugarea de domenii VL și VH suplimentare la lanțurile greu și ușor ale anticorpului, sau adăugarea unei proteine de fuziune heterologe sau înlănțuirea mai multor domenii Fab unul cu celălalt). Astfel, moleculele divulgate în aceste documente comercializează structura nativă a anticorpului pentru abilitatea de a lega specii suplimentare de antigen.

În domeniu s-a observat suplimentar capacitatea de a produce diacorpi care diferă de astfel de anticorpi naturali ca fiind capabili să lege două sau mai multe specii diferite de epitopi (adică, care prezintă bispecificitate sau multispecificitate în plus față de bivalență sau multivalență) (vezi, de exemplu, Holliger și colab. (1993) „Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger și colab.); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens și colab.); Alt și colab. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. și colab. (2005) „A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity“, J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens și colab.); Olafsen, T. și colab. (2004) „Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications“, Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. și colab. (2001) „Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange“, Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano și colab. (2004) „A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain“, Reumat 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. și colab. (2000) „Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System“, Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. și colab. (2009) „Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy“, Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Proiectarea unui diacorp se bazează pe anticorpul derivat cunoscut ca fragment al domeniului variabil monocatenar (scFv). Astfel de molecule sunt făcute prin legarea domeniilor variabile ale lanțului ușor și/ sau greu prin utilizarea unei peptide liant scurte. Bird și colab. (1988) („Single-Chain Antigen-Binding Proteins“, Science 242:423-426) descrie un exemplu de peptidă liant care leagă în puncte aproximativ 3,5 nm între terminalul carboxi al unui domeniu variabil și terminalul amino al celui alt domeniu variabil. Au fost concepuți și utilizați lianți ai altor secvențe (Bird și colab. (1988) „Single-Chain Antigen-Binding Proteins“, Science 242:423-426). Lianții pot fi în schimb modificați pentru funcții suplimentare, cum ar fi atașarea de medicamente sau atașarea la suporturi solide. Variantele monocatenare pot fi produse fie recombinant sau fie sintetic. Pentru producția sintetică de scFv, poate fi utilizat un sintetizator automat. Pentru producția recombinantă de scFv, o plasmidă adecvată care conține o polinucleotidă care codifică scFv poate fi introdusă într-o celulă gazdă adecvată, fie eucariotă, cum ar fi drojdie, plante, celule de insecte sau de mamifer, sau fie procariotă, cum ar fi *E. coli*. Polinucleotidele care codifică scFv de interes pot fi făcute prin manipulări de rutină cum ar fi ligarea polinucleotidelor. ScFv rezultat poate fi izolat utilizând tehnici standard de purificare a proteinelor cunoscute în domeniu.

Asigurarea de diacorpi non-monospecifici furnizează un avantaj semnificativ față de anticorpi, incluzând dar fără a se limita la, capacitatea de co-ligare și co-localizarea celulelor care exprimă epitopi diferiți. Diacorpii bispecifici au astfel aplicații pe scară largă incluzând terapia și imunodiagnoza. Bispecificitatea permite o mare flexibilitate în proiectarea și modificarea genetică a diacorpului în diferite aplicații, asigurând aviditate sporită la antigenii multimerici, reticularea diferiților antigeni, și țintirea direcționată la tipuri specifice de celule aflate pe prezența ambilor antigeni țintă. Din cauza valenței lor crescute, ratei scăzute de disociere și eliberării rapide din circulație (pentru diacorpii de dimensiune mică, la sau sub ~50 kDa), moleculele de diacorp cunoscute în domeniu au prezentat de asemenea utilizări particulare în domeniul imagisticii tumorale (Fitzgerald și colab. (1997) „Improved Tumor Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*“, Protein Eng. 10:1221).

Bispecificitatea diacorpilor a condus la utilizarea lor pentru co-ligarea diferitelor celule, de exemplu, reticularea celulelor T citotoxice la celule tumorale (Staerz și colab. (1985) „Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells“, Nature 314:628-631, și Holliger și colab. (1996) „Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody“, Protein Eng. 9:299-305; Marvin și colab. (2005) „Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies“, Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Alternativ, sau suplimentar, diacorpii bispecifici pot fi utilizați pentru a co-liga receptori pe suprafața diferitelor celule sau pe o singură celulă. Co-ligarea diferitelor celule și/sau receptori este utilă pentru a modula funcțiile efectoare și/sau semnalizarea celulară imună. Moleculele multispecifice (de exemplu, diacorpii bispecifici) cuprinzând situsuri de legare la epitopi pot fi direcționate spre un determinant de suprafață al oricărei celule imune cum ar fi B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70

(CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), receptorul de activare ucigaș (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC de clasă I sau II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), și/sau VISTA (PD-1H), care sunt exprimate pe T limfocite, celule ucigașe naturale (NK), celule care prezintă antigen sau alte celule mononucleare. În particular, situsurile de legare la epitop direcționate la un receptor de suprafață celulară care este implicat în reglarea unui punct de control imun (sau a ligandului acestuia) sunt utile în generarea de molecule de legare bispecifice sau multispecifice care antagonizează sau blochează semnalizarea inhibitoare a moleculelor punctului de control imun și stimulează prin urmare, reglarea pozitivă sau sporesc, răspunsurile imune la un subiect. Moleculele implicate în reglarea punctelor de control imune includ, dar nu se limitează la, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC de clasă I sau II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 și/sau VISTA.

Totuși, avantajele de mai sus vin cu un cost remarcabil. Formarea de astfel de diacorpi non-monospecfici necesită asamblarea cu succes a două sau mai multe polipeptide distincte și diferite (adică, o astfel de formare necesită ca diacorii să fie formați prin heterodimerizarea diferitelor specii de catene polipeptidice). Acest fapt este în contrast cu diacorii monospecfici, care sunt formați prin homodimerizarea catenelor identice de polipeptide. Deoarece cel puțin două polipeptide diferite (adică, două specii de polipeptidă) trebuie să fie furnizate pentru a forma un diacorp non-monospecific, și deoarece homodimerizarea unor astfel de polipeptide conduce la molecule inactive (Takemura, S. și colab. (2000) „Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System“, Protein Eng. 13(8):583-588), producția de astfel de polipeptide trebuie să fie realizată într-un astfel de mod încât pentru a preveni legarea covalentă între polipeptidele aceleiași specii (adică, astfel încât să se prevină homodimerizarea) (Takemura, S. și colab. (2000) „Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System“, Protein Eng. 13(8):583-588). Tehnica a învățat prin urmare asocierea non-covalentă a unor astfel de polipeptide (vezi, de exemplu, Olafsen și colab. (2004) „Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications“, Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano și colab. (2004) „A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain“, rezumat 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. și colab. (2000) „Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System“, Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. și colab. (2005) „A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity“, J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Totuși, tehnica a recunoscut că diacorii bispecfici compuși din polipeptide non-covalente asociate sunt instabili și cu ușurință disociați în monomeri non-funcționali (vezi, de exemplu, Lu, D. și colab. (2005) „A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity“, J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

În fața acestei provocări, tehnica a reușit să dezvolte diacorpi stabili, non-monospecfici heterodimerici legați covalent, denumiți diacorpi **DART® (reactivi de Re-Țintire cu Afinitate Duală)**; vezi, de exemplu, publicațiile de brevete din Statele Unite nr. 2013-0295121; 2010-0174053 și 2009-0060910; publicațiile brevetelor europene nr. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 și publicațiile PCT nr. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; și Sloan, D.D. și colab. (2015) „Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells“, PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. și colab. (2015) „Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform“, Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. și colab. (2015) „A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates“, Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. și colab. (2011) „Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma“, Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. și colab. (2010) „Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold“, Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. și colab. (2010) „Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion“, J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Astfel de diacorpi cuprind două sau mai multe polipeptide complexate covalent și implică modificarea genetică a unuia sau mai multor resturi de cisteină în fiecare din speciile de polipeptide utilizate care permit legăturilor disulfură să formeze și prin urmare să lege covalent două

lanțuri de polipeptide. De exemplu, s-a arătat că adăugarea unui rest de cisteină la C-terminalul unor astfel de construcții permite legătura disulfură între catenele de polipeptidă, stabilizând heterodimerul rezultat fără interferarea cu caracteristicile de legare ale moleculei bivalente.

Fiecare din cele două polipeptide ale celui mai simplu diacorp bispecific **DART®** cuprinde trei domenii. Prima polipeptidă cuprinde (în direcția de la N-terminal către C-terminal): (i) un prim domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului ușor al unei prime imunoglobuline (VL1), (ii) un al doilea domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului greu al unei a doua imunoglobuline (VH2), și (iii) un al treilea domeniu care conține un rest de cisteină (sau un domeniu care conține cisteină) și un domeniu care promovează heterodimerul care servește pentru a promova heterodimerizarea cu a doua polipeptidă a diacorpului și pentru a lega covalent prima și a doua polipeptidă ale diacorpului una cu cealaltă. A doua polipeptidă conține (în direcția de la N-terminal către C-terminal): (i) un prim domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului ușor al celei de a doua imunoglobuline (VL2), (ii) un al doilea domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului greu al primei imunoglobuline (VH1), și (iii) un al treilea domeniu care conține un rest de cisteină (sau un domeniu care conține cisteină) și un domeniu complementar de promovare a heterodimerului care complexează cu domeniul de promovare al heterodimerului primului lanț de polipeptidă pentru a promova heterodimerizarea cu primul lanț de polipeptidă. Restul de cisteină (sau un domeniu care conține cisteină) al celui de al treilea domeniu al celui de al doilea lanț de polipeptidă servește pentru a promova legarea covalentă a celui de al doilea lanț de polipeptidă la primul lanț de polipeptidă al diacorpului. Astfel de molecule sunt stabile, potente și au abilitatea de a se lega simultan la doi sau mai mulți antigeni. Într-un caz, al treilea domeniu al primei și celei de a doua polipeptide conțin fiecare un rest cisteină, care servește pentru a lega polipeptidele împreună printr-o legătură disulfură. **Figura 1** furnizează a schemă a unui astfel de diacorp, care utilizează domeniile de promovare ale heterodimerului E-spiralat/K-spiralat și o cisteină care conține un liant pentru legarea covalentă. Cum s-a prevăzut în **Figura 2** și în **Figurile 3A-3C**, una sau ambele polipeptide pot avea suplimentar secvența unui domeniu CH2-CH3, astfel încât complexarea între cele două polipeptide ale diacorpului formează o regiune Fc care este capabilă de legare la receptorul Fc al celulelor (cum ar fi limfocite B, celule dendritice, celule ucigașe natural, macrofage, neutrofile, eozinofile, bazofile și mastocite). Cum s-a prevăzut mai detaliat mai jos, domeniile CH2 și/sau CH3 ale unor astfel de lanțuri de polipeptide nu trebuie să fie identice în secvență, și sunt modificate în mod avantajos pentru a întreține complexarea între cele două lanțuri de polipeptide.

Au fost descrise multe variații ale unor astfel de molecule (vezi, de exemplu, publicațiile de brevete din Statele Unite nr. 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 și 2009/0060910; publicații le de brevete europene nr. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 și publicațiile PCT nr. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Acești diacorpi **DART®** care conțin regiuni Fc pot cuprinde două perechi de lanțuri de polipeptide. Primul lanț de polipeptide cuprinde (în direcția de la N-terminal către C-terminal): (i) un prim domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului ușor al unei prime imunoglobuline (VL1), (ii) un al doilea domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului greu al unei a doua imunoglobuline (VH2), (iii) un al treilea domeniu care conține un rest de cisteină (sau un domeniu care conține cisteină) și servește pentru a promova heterodimerizarea cu a doua polipeptidă a diacorpului și a lega covalent prima și cea de a doua polipeptidă ale diacorpului una cu cealaltă, și (iv) un domeniu CH2-CH3. A doua polipeptidă conține (în direcția de la N-terminal către C-terminal): (i) un prim domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului ușor al celei de a doua imunoglobuline (VL2), (ii) un al doilea domeniu care cuprinde o regiune de legare a unui domeniu variabil al lanțului greu al primei imunoglobuline (VH1), și (iii) un al treilea domeniu care conține un rest de cisteină (sau un domeniu care conține cisteină) și un domeniu de promovare a heterodimerului care promovează heterodimerizarea cu primul lanț de polipeptidă. Aici primele două polipeptide complexează una cu cealaltă pentru a forma o regiune Fc. **Figurile 3A-3C** furnizează schemele a trei variații ale unor astfel de diacorpi utilizând diferite domenii de promovare ale heterodimerului.

Alți diacorpi **DART®** care conțin regiuni Fc pot cuprinde trei lanțuri de polipeptide. Prima polipeptidă a unui astfel de diacorp **DART®** conține trei domenii: (i) un domeniu care conține VL1, (ii) un domeniu care conține VH2 și (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. A doua polipeptidă a unui astfel de diacorp **DART®** conține: (i) un domeniu care conține VL2, (ii) un domeniu care conține VH1 și (iii) un domeniu care promovează heterodimerizarea și legarea covalentă cu primul lanț de polipeptide al diacorpului. A treia polipeptidă a unui astfel de diacorp **DART®** cuprinde o secvență CH2-CH3. Astfel, primul și al doilea lanț de polipeptide ale unor astfel de diacorpi **DART®** se asociază împreună pentru a forma un situs de legare VL1/VH1 care este capabil de legare la epitop, precum și un situs de legare VL2/VH2 care este capabil de legare la al doilea epitop. Astfel de molecule **DART®** mai complexe au de asemenea domenii care conțin cisteină care funcționează pentru a forma un complex de

legături covalente. Astfel, prima și a doua polipeptidă sunt legate una cu cealaltă printr-o legătură disulfură care implică resturi de cisteină în respectivele lor cel de al treilea domeniu. Notabil, primul și al treilea lanț de polipeptide complexează unul cu celălalt pentru a forma o regiune Fc care este stabilizată printr-o legătură disulfură. **Figurile 4A-4B** furnizează scheme de astfel de diacorpi care cuprind trei lanțuri de polipeptide.

Încă alți diacorpi DART® care conțin regiuni Fc pot cuprinde cinci lanțuri de polipeptide care pot cuprinde regiunile de legare de la domeniile variabile ale lanțului ușor și greu de până la trei imunoglobuline diferite (la care se face referire ca VL1/VH1, VL2/VH2 și VL3/VH3). De exemplu, primul lanț de polipeptidă al unui astfel de diacorp poate conține: (i) un domeniu care conține VH1, (ii) un domeniu care conține CH1, și (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. Al doilea și al cincilea lanț de polipeptide ale unor astfel de diacorpi pot conține: (i) un domeniu care conține VL1, și (ii) un domeniu care conține CL. Al treilea lanț de polipeptidă al unui astfel de diacorp poate conține: (i) un domeniu care conține VH1, (ii) un domeniu care conține CH1, (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3, (iv) un domeniu care conține VL2, (v) un domeniu care conține VH3 și (vi) un domeniu care promovează heterodimerul, unde domeniile care promovează heterodimerul promovează dimerizarea celui de al treilea lanț cu al patrulea lanț. A patra polipeptidă a unor astfel de diacorpi poate conține: (i) un domeniu care conține VL3, (ii) un domeniu care conține VH2 și (iii) un domeniu care promovează heterodimerizarea și legarea covalentă cu al treilea lanț de polipeptidă al diacorpului. Aici prima și a treia polipeptidă complexează una cu cealaltă pentru a forma o regiune Fc. Astfel de molecule DART® mai complexe au de asemenea domenii care conțin cisteină care funcționează pentru a forma un complex de legături covalente, astfel încât fiecare lanț de polipeptidă este legat la cel puțin un lanț de polipeptidă adăugat printr-o legătură disulfură care implică resturi de cisteină. Preferabil, astfel de domenii sunt ordonate în direcția de la N-terminal către C-terminal. **Figura 5** furnizează schemele unor astfel de diacorpi cuprinzând cinci lanțuri de polipeptide.

Construcțiile alternative sunt cunoscute în domeniu pentru aplicațiile unde este dorită o moleculă tetravalentă dar nu este necesară o Fc incluzând, dar fără a se limita la, anticorpi tandem tetravalenți, la care se face referire de asemenea ca „**TandAbs**” (vezi, de exemplu publicațiile de brevete din Statele Unite nr. 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; publicațiile de brevete europene nr. EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 și EP 1293514; publicațiile PCT nr. WO 1999/057150, WO 2003/025018, și WO 2013/013700) care sunt formate prin homo-dimerizarea a două lanțuri identice care posedă fiecare un domeniu VH1, VL2, VH2, și VL2.

Recent, au fost descrise structuri trivalente care încorporează două domenii de legare de tip diacorp și un domeniu de tip non-diacorp și o regiune Fc (vezi, de exemplu, cererea PCT nr.: PCT/US 15/33076, intitulată „Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof”, depusă pe 29 mai 2015; și PCT/US15/33081, intitulată „Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof”, depusă pe 29 mai 2015). Astfel de molecule trivalente pot fi utilizate pentru a genera molecule monospecifice, bispecifice sau trispecifice. **Figurile 6A-6F** furnizează scheme de astfel de molecule trivalente cuprinzând 3 sau 4 lanțuri de polipeptide.

#### IV. Molecule de legare la PD-1 anti-uman din prezenta divulgare

Moleculele de legare la PD-1 preferate din prezenta divulgare includ anticorpi, diacorpi, BiTE-uri, etc. și sunt capabile de legare la o porțiune (**epitop**) continuă sau discontinuă (de exemplu, conformațională) de PD-1 uman (CD279). Moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare vor prezenta de asemenea preferabil, abilitatea de a se lega la molecule PD-1 dintr-una sau mai multe specii non-umane, în particular, specii de primat (și în special o specie de primată, cum ar fi maimuța cynomolgus). O polipeptidă PD-1 umană reprezentativă (secvență NCBI NP\_005009.2; incluzând o secvență semnal de 20 de resturi de aminoacizi (prezentată subliniat) și proteina matură de 268 de resturi de aminoacizi) are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:68**):

MQIPQAPWPFV VWAFLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  
TFTCSFSNTS ESFVLNWMYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTQL  
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE  
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI  
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT  
IVFPSPGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

În anumite cazuri moleculele de legare la PD-1 anti-uman din divulgare sunt caracterizate prin oricare (unul sau mai multe) din următoarele criterii:

- (1) se leagă specific la PD-1 uman după cum este exprimat endogen pe suprafața unei celule T umane stimulate;
- (2) se leagă specific la PD-1 uman cu o constantă de legare la echilibru ( $K_D$ ) de 40 nM sau mai mică;
- (3) se leagă specific la PD-1 uman cu o constantă de legare la echilibru ( $K_D$ ) de 5 nM sau mai mică;
- (4) se leagă specific la PD-1 uman cu o rată on ( $k_a$ ) de  $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  sau mai mare;

- (5) se leagă specific la PD-1 uman cu o rată on ( $k_a$ ) de  $90,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  sau mai mare;  
 (6) se leagă specific la PD-1 uman cu o rată off ( $k_d$ ) de  $7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  sau mai mică;  
 (7) se leagă specific la PD-1 uman cu o rată off ( $k_d$ ) de  $2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  sau mai mică;  
 (8) se leagă specific la PD-1 de primată non-umană (de exemplu, PD-1 de maimuță cynomolgus);  
 5 (9) inhibă (adică, blochează sau interferează cu) activitatea de legare/inhibare) a ligandului PD-1 (PD-L1/PD-L2) la PD-1;  
 (10) stimulează un răspuns imun; și/sau  
 (11) sinergizează cu un anticorp LAG-3 anti-uman pentru a stimula un răspuns al celulei T specific antigenului.

10 Așa cum s-a utilizat aici, termenul „răspuns al celulei T specific antigenului” se referă la răspunsurile unei celule T care rezultă din stimularea celulei T cu antigenul pentru care celula T este specifică. Exemple nelimitative de răspunsuri ale unei celule T după stimularea specifică antigenului includ proliferarea și producția de citokine (de exemplu, producția de  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ). Abilitatea unei molecule de a stimula un răspuns specific la antigen al celulei T poate fi determinată, de exemplu,  
 15 utilizand testul PBMC **de stimulare-(„SEB”)** al antigenului enterotoxină de tip B *Staphylococcus aureus* descris aici.

Moleculele de legare la PD-1 anti-uman preferate din prezenta divulgare au domeniile VH și/sau VL ale anticorpilor monoclonali PD-1 anti-umani murini „PD-1 mAb 1”, „PD-1 mAb 2”, „PD-1 mAb 3”, „PD-1 mAb 4”, „PD-1 mAb 5”, „PD-1 mAb 6”, „PD-1 mAb 7”, „PD-1 mAb 8”, „PD-1 mAb 9”,  
 20 „PD-1 mAb 10”, „PD-1 mAb 11”, „PD-1 mAb 12”, „PD-1 mAb 13”, „PD-1 mAb 14”, sau „PD-1 mAb 15”, și mai preferabil au 1, 2 sau toate 3 dintre CDR<sub>H</sub>-urile domeniului VH și/sau 1, 2 sau toate 3 dintre CDR<sub>L</sub>-urile domeniului VL al unor astfel de anticorpi monoclonali PD-1 anti-umani. Astfel de molecule de legare la PD-1 anti-uman preferate includ anticorpi bispecfici (sau multispecfici), anticorpi himerici sau umanizați, BiTe-uri, diacorpi, *etc.*, și astfel de molecule de legare având variante de regiuni  
 25 Fc.

Divulgarea se referă în special la molecule de legare la PD-1 cuprinzand un domeniu de legare la PD-1 care posedă:

(A)

- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 1;  
 30 (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 1;  
 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 1 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 1;

(4) domeniul VH al hPD-1 mAb 1 VH1;

(5) domeniul VL al hPD-1 mAb 1 VL1;

35 (6) domeniile VH și VL ale hPD-1 mAb 1;

(B)

(1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 2;

(2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 2;

(3) cele trei CDR<sub>H</sub>-urile domeniului VH al PD-1 mAb 2 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 2;

40 (4) domeniul VH al hPD-1 mAb 2 VH1;

(5) domeniul VL al hPD-1 mAb 2 VL1;

(6) domeniile VH și VL ale hPD-1 mAb 2;

(C)

45 (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 3;

(2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 3;

(3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 3 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 3;

(D)

50 (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 4;

(2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 4;

(3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 4 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 4;

(E)

55 (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 5;

(2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 5;

(3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 5 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 5;

(F)

60 (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 6;

(2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 6;

- (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 6 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 6;
- (G)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 7;
- 5 (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 7, sau hPD-1 mAb 7 VL2, sau hPD-1 mAb 7 VL3;
- (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 7 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 7, sau hPD-1 mAb 7 VL2, hPD-1 mAb 7 VL3;
- (4) domeniul VH al hPD-1 mAb 7 VH1, sau hPD-1 mAb 7 VH2;
- 10 (5) domeniul VL al hPD-1 mAb 7 VL1, sau hPD-1 mAb 7 VL2, sau hPD-1 mAb 7 VL 3;
- (6) domeniile VH și VL ale hPD-1 mAb 7(1,1), sau hPD-1 mAb 7(1,2), sau hPD-1 mAb 7(1,3), sau hPD-1 mAb 7(2,1), sau hPD-1 mAb 7(2,2), sau hPD-1 mAb 7(2,3);
- (H)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 8;
- 15 (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 8;
- (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 8 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 8;
- (I)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VH2;
- 20 (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VL2;
- (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VH2 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VL2;
- (4) domeniul VH al hPD-1 mAb 9 VH1, sau hPD-1 mAb 9 VH2;
- (5) domeniul VL al hPD-1 mAb 9 VL1, sau hPD-1 mAb 9 VL2;
- 25 (6) domeniile VH și VL ale hPD-1 mAb 9(1,1), sau hPD-1 mAb 9(1,2), sau hPD-1 mAb 9(2,1), sau hPD-1 mAb 9(2,2);
- (J)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 10;
- (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 10;
- 30 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 10 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 10;
- (K)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 11;
- (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 11;
- 35 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 11 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 11;
- (L)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 12;
- (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 12;
- 40 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 12 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 12;
- (M)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 13;
- (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 13;
- 45 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 13 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 13;
- (N)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 14;
- (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 14;
- 50 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 14 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 14;
- (O)
- (1) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 15;
- (2) cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 15;
- 55 (3) cele trei CDR<sub>H</sub>-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 15 și cele trei CDR<sub>L</sub>-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 15;
- (4) domeniul VH al hPD-1 mAb 15 VH1;
- (5) domeniul VL al hPD-1 mAb 15 VL1;
- (6) domeniile VH și VL ale hPD-1 mAb 15;

sau care se leagă, sau concurează pentru legare cu, același epitop ca PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15.

#### A. Anticorp PD-1 anti-uman PD-1 mAb 1

##### 5 1. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 1

Secvența de aminoacizi a domeniului VH a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:69) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate).

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT NDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG  
HITYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCARDY  
SGGYPYTLDY WGQGTSTVTS S

CDR<sub>H1</sub> of PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:71): NDYAWN

CDR<sub>H2</sub> of PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:72): HITYSGSTSYNPSLKS

CDR<sub>H3</sub> of PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:73): DYSGGYPYTLDY

10 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 1 este SEQ ID NO:70 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac  
cttctcagtc tctgtccctc acctgcaactg tcaactggctt ctcaatcacc  
aatgattatg cctggaactg gatccgacag ttccagga acaaactgga  
gtggatgggc cacataacct acagtggcag cactagctac aacctatctc  
tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa ccacttcttc  
ctgcagttga gttctgtgac tctgaggac acagccacat attactgtgc  
aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tgggggtcaag  
gtacctcagt caccgtctcc tcc

15 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:74) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

QIVLTQSPAL MSASPGKVT MTCSATSIVS YVYWYQQKPG SSPQPMWIYLT  
SNLASGVPAR FSGSGSTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG  
TKLEIK

|                                                |                   |
|------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>L1</sub> a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:76): | <u>SATSIVSYVY</u> |
| CDR <sub>L2</sub> a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:77): | <u>LTSNLAS</u>    |
| CDR <sub>L3</sub> a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:78): | <u>QQWSDNPYT</u>  |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 1 este SEQ ID NO:75 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga  
gaaggtcacc atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact  
ggtaccagca gaagcctgga tctctccccc aacctggat ttatctcaca  
tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg  
gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa gatgctgcc  
cttattactg cagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg  
20 accaagctgg aaataaaa

##### 2. Umanizarea anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 1 până la forma „hPD-1 mAb 1”

Anticorpul PD-1 anti-uman murin descris mai sus, PD-1 mAb 1, a fost umanizat și în continuare deimmunizat când au fost identificați epitopii antigenici pentru a demonstra capacitatea de umanizare a unui anticorp PD-1 anti-uman astfel încât să scadă antigenicitatea sa după administrarea la un destinatar uman. Umanizarea a dat un domeniu VH umanizat, denumit aici ca „hPD-1 mAb 1 VH1”, și un domeniu VL umanizat denumit aici ca „hPD-1 mAb 1 VL1”. Corespunzător, un anticorp cuprinzând domeniile VL umanizate imperecheate cu domeniul VH umanizat este cel la care se face referire ca „hPD-1 mAb 1”.

30 Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 1 VH1 (SEQ ID NO:79) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

DVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS NDYAWNWIRQ PPGKLEWIG  
HITYSGSTSY NPSLKSRITI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCARDY  
SGGYPYTLDY WGQGTSTVTS S

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 1 VH1 este SEQ ID NO:80 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac  
actgagcctg acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg  
cctggaattg gattaggcag cctcccggta aagggctgga gtggatcggc  
cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatccagtc tgaagagccg  
tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttggt ctgaccatga  
ccaacatgga cctgttgat actgcaacat actattgtgc tcgagattat  
ggttctgggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt  
gaccgtgagc tcc

5 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO:81) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITCSATSIVS YVYWYQQKPG QAPQPLIYLT  
SNLASGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG  
TKVEIK

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 1 VL1 este SEQ ID NO:82 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaaatcggtc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga  
aaaggtcacc attacttgc ctgctacttc tatcggtgcc tacgtgtact  
ggtatcagca gaagcccggc caggctcccc agccattgat atatctgacc  
agcaacctgg cttctgggtat cccagctcgt ttttcggta gcgggtccgg  
gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa gacgccgcca  
cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc  
accaaagtcg aaataaag

#### 10 B. Anticorpul PD-1 anti-uman PD-1 mAb 2

##### 1. Anticorpul PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 2

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:83) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLS  
DYFDYWGQT TLTVSS

|                                                 |                  |
|-------------------------------------------------|------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:85): | SFGMH            |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:86): | YISSGMSISYADTVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:87): | LSDYFDY          |

15 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 2 este SEQ ID NO:84 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gatgtgcagc tegtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc  
ccggaaactc tectgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa  
tgcactgggt tegtgcagct ccagagaagg ggttgagtg ggtcgcatac  
atcagtagtg gcagtatgag catttcctat gcagacacag tgaagggcgcg  
attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcagc tctctcc

20 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:88) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPK  
LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFCSQTTHVP  
WTFGGGTKLE IK

|                                                 |                  |
|-------------------------------------------------|------------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:90): | RSSQSLVHSTGNTYLH |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:91): | RVSNRFS          |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:92): | SQTTHVPWT        |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 2 este **SEQ ID NO:89** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg  
gaaacaccta tttacattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
ctcctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacaggtt  
cagtggcagt ggtcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtgg  
aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaaactac acatgttccg  
tggaagggttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

## 2. Umanizarea anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 2 pentru a forma „hPD-1 mAb 2”

Anticorpul PD-1 anti-uman murin descris mai sus, PD-1 mAb 2, a fost umanizat și mai departe deimunizat când au fost identificați epitopii antigenici pentru a demonstra capacitatea de umanizare a unui anticorp PD-1 anti-uman astfel încât să scadă antigenicitatea sa după administrarea la un destinatar uman. Umanizarea a dat un domeniu VH umanizat, denumit aici ca „hPD-1 mAb 2 VH1”, și un domeniu VL umanizat denumit aici ca „hPD-1 mAb 1 VL1”. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând domeniile VL umanizate imperecheate cu domeniul VH umanizat este cel la care se face referire ca „hPD-1 mAb 2”.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 2 VH1 (**SEQ ID NO:93** este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY  
ISSGSMISISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALYYCASLS  
DYFDYWGQGT TVTVSS

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 2 VH1 este **SEQ ID NO:94** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaagtgaat tgggtgagag tgggtggggc ctgggtgcagc caggtggaag  
tctgcgggtg tctgtgtcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga  
tgcattgggt ggcagaggt cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac  
atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaaggcag  
gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac ctgcaaatga  
atagcctgag caccgaggac accgccttgt actactgcgc tcccctgtct  
gattacttgc actactgggg tcagggcaca actgtgcagac tttcttcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 2 VL1 (**SEQ ID NO:95** este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

DVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ  
LLIYRVSNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTHVP  
WTFGQGTKLE IK

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 2 VL1 este **SEQ ID NO:96** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctggggcca  
gccagccagt atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag  
gaaatacata tctccattgg tacctgcaaa aaccaggcca gagccccag  
ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt tctggcggtc cagatcggtt  
cagcggcagc ggggtctggca ctgatttcac actgaaaatc tctaggggtg  
aggcagagga cgtaggcggt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc  
tggaacttttg gccaaaggtac taagctggaa atcaag

## C. Murine Anti-Human PD-1 Anticorp PD-1 mAb 3

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 3 (**SEQ ID NO:97**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYVMHWVKQT PVHGLEWIGT  
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYFTREK  
ITTIVEGTYW YFDVWGTGTT VTVSS

|                                                           |                   |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 3 ( <b>SEQ ID NO:99</b> ):  | DYVMH             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 3 ( <b>SEQ ID NO:100</b> ): | TIDPETGGTAYNQKFKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 3 ( <b>SEQ ID NO:101</b> ): | EKITTIVEGTYWYFDV  |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 3 este **SEQ ID NO:98** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

cagggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctgggtgagc ctggggcttc  
 agtgacgctg tcttgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa  
tgcactgggt gaagcagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact  
attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa  
 ggccatactg actgcagaca agtctctcaa cacagcctac atggagctcc  
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag  
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac  
 agggaccacg gtcaccgtct cctca

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 3 (**SEQ ID NO:102**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIIV HSNGDTYLEW YLQKPGQSPK  
 LLIYKVSNRFS SGVPDRFGSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP  
YTFGGGTKLE IK

|                                                           |                   |
|-----------------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 3 ( <b>SEQ ID NO:104</b> ): | RSSQNIIVHSNGDTYLE |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 3 ( <b>SEQ ID NO:105</b> ): | KVSNRFS           |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 3 ( <b>SEQ ID NO:106</b> ): | FQGSHPYT          |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 3 este **SEQ ID NO:103** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgctgtca gtcttgga  
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg  
gagacaccta tttggaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag  
 ctctgatct ataaagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacagggt  
 cagtggcagt gggctcaggga cagattttac actcaaaatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatcttccg  
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

#### D. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 4

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO:107**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLT  
DYFDYWGQGT TLTVSS

|                                                           |                  |
|-----------------------------------------------------------|------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 4 ( <b>SEQ ID NO:109</b> ): | SFGMH            |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 4 ( <b>SEQ ID NO:110</b> ): | YISSGMSISYADTVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 4 ( <b>SEQ ID NO:111</b> ): | LTDYFDY          |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 4 este **SEQ ID NO:108** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgacagc ctggagggtc  
 ccggaaactc tctgtgcag cctctggatt cgttttccagt agctttggaa  
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat  
attagtagtg gcagtatgag tatttcctat gcagacacag tgaagggccg  
 attcaccgct accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcagac tctctca

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO:112**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DVVMSTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYFHW YLQKPGQSPK  
 LLIYRVSNRFS SGVPDRFGSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTHVP  
WTFGGGTKLE IK

|                                                           |                  |
|-----------------------------------------------------------|------------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 4 ( <b>SEQ ID NO:114</b> ): | RSSQSLVHSTGNTYFH |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 4 ( <b>SEQ ID NO:115</b> ): | RVSNRFS          |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 4 ( <b>SEQ ID NO:116</b> ): | SQTHVPWT         |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 4 este **SEQ ID NO:113** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):  
 gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga  
 tcaagcctcc atctcctgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg  
gaaacaccta tttccatttg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
 ctctctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacagggt  
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaactac acatgttccg  
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

#### E. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 5

5 Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO:117**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT AYWMNWMKQR PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH  
YGSSPFAYWG QGTLVTVSA

|                                                          |                  |
|----------------------------------------------------------|------------------|
| CDR <sub>H1</sub> a PD-1 mAb 5 ( <b>SEQ ID NO:119</b> ): | AYWMN            |
| CDR <sub>H2</sub> a PD-1 mAb 5 ( <b>SEQ ID NO:120</b> ): | VIHPDSETWLNQKFKD |
| CDR <sub>H3</sub> a PD-1 mAb 5 ( <b>SEQ ID NO:121</b> ): | EHYGSSPFAY       |

10 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 5 este **SEQ ID NO:118** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):  
 caggtccaac tgcagcagcc tgggggttgaa ctgggtgagcc ctggagcttc  
 agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta ctctctcacc gcctactgga  
tgaactggat gaaacagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg  
attcatcctt ccgatatgta aacttggtta aatcagaagt tcaaggacaa  
 ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactca  
 tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac  
tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggaactc tggtcactgt  
 ctctgca

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO:122**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIYAASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKLEI K

|                                                          |                 |
|----------------------------------------------------------|-----------------|
| CDR <sub>L1</sub> a PD-1 mAb 5 ( <b>SEQ ID NO:124</b> ): | RANESVDNYGMSFMN |
| CDR <sub>L2</sub> a PD-1 mAb 5 ( <b>SEQ ID NO:125</b> ): | AASNQGS         |
| CDR <sub>L3</sub> a PD-1 mAb 5 ( <b>SEQ ID NO:126</b> ): | QQSKEVPYT       |

15

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 5 este **SEQ ID NO:123** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):  
 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
 gagggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca  
tgagttttat gaactggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc  
 ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag  
 tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg

aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac  
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

20

#### F. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 6

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO:127**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRLEWVAT  
ISGGGSDTTY PDSVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSSLRSED TALYYCARQK  
ATTWFAYWGQ GTLVTVST

|                                                          |       |
|----------------------------------------------------------|-------|
| CDR <sub>H1</sub> a PD-1 mAb 6 ( <b>SEQ ID NO:129</b> ): | SYGMS |
|----------------------------------------------------------|-------|

|                                                  |                   |
|--------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:130): | TISGGGSDTYYPDSVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:131): | QKATTWFAY         |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 6 este **SEQ ID NO:128** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtagc tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga  
acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactgggtt cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg  
ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggtatct ggggtgcctt cacgtttttc  
tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
cagaggactt tgcctcttat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

- 5 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:132) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NYGISFMNWF QQKPGQPPKL  
LIYPASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FCQQSKEVPW  
TFGGGTKLEI K

|                                                  |                 |
|--------------------------------------------------|-----------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:134): | RASESVDNYGISFMN |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:135): | PASNQGS         |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:136): | QQSKEVPWT       |

- 10 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 6 este **SEQ ID NO:133** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):
- gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
gagggccacc atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca  
ttagttttat gaactgggtc caacagaaac caggacagcc acccaaactc  
ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag

tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg  
aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctgtg  
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa

#### G. Anticorp PD-1 anti-uman PD-1 mAb 7

- 15 1. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 7

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:137) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDKATL TVDKSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLTVTSS

|                                                  |                   |
|--------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:139): | SYWMN             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:140): | VIHPSDSETWLDQKFKD |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:141): | EHYGTSPFAY        |

- 20 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 7 este **SEQ ID NO:138** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):
- gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtgagc ctggagcttc  
agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga  
tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg  
attcatcctt ccgatatgta aacttgggta gatcagaagt tcaaggacaa  
ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca  
tcagcccgac atctgaggac tctgcgggtct attactgtgc aagggagcac  
tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggaactc tggtcactgt  
gtcttcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:142) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPARFSGSG FGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKLEI K

|                                                  |                 |
|--------------------------------------------------|-----------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:144): | RANESVDNYGMSFMN |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:145): | AASNQGS         |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:146): | QQSKEVPYT       |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 7 este **SEQ ID NO:143** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
 gagggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca  
tgagttttat gaactgggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc  
 ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccagggttag  
 tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg  
 aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctgtac  
acgttcggag ggggggaccaa gctggaaata aaa

## 2. Umanizarea anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 7 pentru a forma „hPD-1 mAb 7“

Anticorpul PD-1 anti-uman descris mai sus, PD-1 mAb 7, a fost umanizat și mai departe deimunizat când au fost identificați epitopii antigenici pentru a demonstra capacitatea de umanizare a unui anticorp PD-1 anti-uman astfel încât să scadă antigenicitatea sa după administrarea la un destinatar uman. Umanizarea a dat două domenii VH umanizate, denumite aici ca „hPD-1 mAb 7 VH1“, și „hPD-1 mAb 7 VH2“, și trei domenii VL umanizate denumite aici ca „hPD-1 mAb 7 VL1“, „hPD-1 mAb 7 VL2“, și „hPD-1 mAb 7 VL3“. Oricare din domeniile VL umanizate poate fi imperecheat cu fiecare din domeniile VH umanizate. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul dintre domeniile VL umanizate imperecheat cu domeniul VH umanizat este referit generic ca „hPD-1 mAb 7“, și combinațiile particulare de domenii VH/VL umanizate sunt referite prin referința la domeniile VH/VL specifice, de exemplu un anticorp umanizat cuprinzând hPD-1 mAb 7 VH1 și hPD-1 mAb 1 VL2 este referit specific ca „hPD-1 mAb 7(1.2)“.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 7 VH1 (SEQ ID NO:147) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VH1 este **SEQ ID NO:148** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag  
 tgtaaggtg tcttgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga  
tgaattgggt gcgtaagca ccagggcagg gtctggaatg gattgggggtg  
atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg  
 tgtgacaatt acagtcgata agtcacaaag cactgcttac atggaactct  
 ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac  
tacggcacat caccttttgc atactgggggc cagggaaactc tcgtaaccgt  
 atcctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 7 VH2 (SEQ ID NO:149) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWAGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VH2 este **SEQ ID NO:150** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag  
 tgtaaggtg tctgcaaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga  
tgaattgggt gcgtagaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg  
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg gaccagaaat ttaaagatcg  
 tgtgacaatt acagtgcata agtcacaag cactgcttac atggaactct  
 ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac  
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt  
 atcctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL1 (SEQ ID NO:151) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

5 Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL1 este SEQ ID NO:152 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga  
 acgtgccact ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactgggtt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
 ctcacccag cgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgttttct  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL2 (SEQ ID NO:153) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

10

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL2 este SEQ ID NO:154 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga  
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactgggtt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
 ctcacccag cgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgttttct  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL3 (SEQ ID NO:155) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

15

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNRGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL3 este SEQ ID NO:156 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga  
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtccttcat gaactgggtt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
 ctcacccag cgcctctaa ccgggatct ggggtgcctt cacgttttct  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

20

CDR<sub>L</sub>1 a domeniului VL al ambilor hPD-1 mAb 7 VL2 și hPD-1 mAb 7 VL3 cuprinde o substituție aminoacidă de serină cu asparagină și are secvența de aminoacizi: RASESVDNYGMSFMN ((SEQ ID NO:157), serina substituită este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>L</sub>1 ale PD-1 mAb 7 descrise mai sus.

În plus, CDR<sub>L</sub>2 a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL3 cuprinde o substituție aminoacidă de arginină cu glutamină și are secvența de aminoacizi: AASNRGS ((SEQ ID NO:158), arginina substituită este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>L</sub>2 ale PD-1 mAb 7 descrise mai sus.

#### 5 H. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 8

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:159) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

EGQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYMNWVKQN HGKSLEWIGD  
INPKNGDTHY NQKFKGEATL TVDKSSTTAY MELRSLTSED SAVYYCASDF  
DYWGQGTTLT VSS

|                                                  |                   |
|--------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:161): | DYYMN             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:162): | DINPKNGDTHYNQKFKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:163): | DFDY              |

#### 10 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 8 este SEQ ID NO:160 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggcttc  
 agtgaagata tcttgtaagc cttctggata cactgttact gactactaca  
tgaacttggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagtg gattggagat  
attaatccta aaaatggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggcga  
 ggccacattg actgtagaca agtctctccac cacagcctac atggagctcc  
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagegatttt  
gactacttggt gccaaggcac cactctcaca gtctctctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:164) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DVVMQTPLS LPVGLGDQAS ISCRSSQTLV YSNGNTYLNW FLQKPGQSPK  
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
FTFGSGTKLE IK

15

|                                                  |                  |
|--------------------------------------------------|------------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:166): | RSSQTLVYSNGNTYLN |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:167): | KVSNRFS          |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:168): | SQSTHVPFT        |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 8 este SEQ ID NO:165 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttgagga  
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaccttgta tatagtaatg  
gaaacaccta tttaaattggt ttcttcgaga agccaggcca gtctccaaag  
 ctcttgatct acaaggtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacaggtt  
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctgggaggt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca  
ttcacgttcg gctcggggac aaagtggaa ataaaa

20

#### I. Anticorp PD-1 anti-uman PD-1 mAb 9

##### 1. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 9

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:169) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQT PEKRLEWVAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

|                                                  |                   |
|--------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:171): | SYLVS             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:172): | TISGGGGNTYYSDSVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:173): | YGFDAWFAY         |

25

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 9 este **SEQ ID NO:170** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg  
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
attagtgggtg gtgggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggtcg  
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatca  
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatgggt  
ttcgacggcg cctgggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt  
 ctcttcc

5 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO:174**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITC**RASENIY SYLA**WYQQKQ EKSPQLLVYN  
**AKTLAAGVPS** RFSGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYC**QH HYAVPWT**FGG  
 GTRLEIT

|                                                           |             |
|-----------------------------------------------------------|-------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 9 ( <b>SEQ ID NO:176</b> ): | RASENIYSYLA |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 9 ( <b>SEQ ID NO:177</b> ): | NAKTLAA     |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 9 ( <b>SEQ ID NO:178</b> ): | QHHYAVPWT   |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 9 este **SEQ ID NO:175** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga  
 tattgtcacc atcacatgtc gagcaagtga gaatatctac agttatttag  
catgggtatca gcagaaacag gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat  
 10 gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc

aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct gaagattttg  
 ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcgggtgga  
 ggcaccagac tggaaatcac a

## 2. Umanizarea anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 9 pentru a forma „hPD-1 mAb 9“

15 Anticorpul PD-1 anti-uman murin descris mai sus, PD-1 mAb 9, a fost umanizat și în continuare deimunizat când au fost identificați epitopii antigenici pentru a demonstra capacitatea de umanizare a unui anticorp PD-1 anti-uman astfel încât să scadă antigenicitatea sa după administrarea la un destinatar uman. Umanizarea a dat două domenii VH umanizate, denumite aici ca „hPD-1 mAb 9 VH1“, și „hPD-1 mAb 9 VH2“, și două domenii VL umanizate denumite aici ca „hPD-1 mAb 9 VL1“, și „hPD-1 mAb 9 VL2“. Oricare din domeniile VL umanizate poate fi împerecheat cu domeniile VH umanizate.

20 Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul dintre domeniile VL umanizate împerecheat cu domeniul VH umanizat este referit generic ca „hPD-1 mAb 9“, și combinațiile particulare ale domeniilor VH/VL umanizate sunt referite prin referința la domeniile VH/VL specifice, de exemplu un anticorp umanizat cuprinzând hPD-1 mAb 9 VH1 și hPD-1 mAb 9 VL2 este referit specific ca „hPD-1 mAb 9(1,2)“.

25 Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 9 VH1 (**SEQ ID NO:179**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQA PGKGLEWVAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VH1 este **SEQ ID NO:180** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaggtgcagc tgggtggaag tgggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag  
 tctgaaactg tectgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg  
tgtcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact  
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggggaag  
 atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga  
 actccctgcg cgcgcaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga  
tttgacggcg catggtttgc ctacttgggga cagggcacat tggtaacgt  
 tagctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 9 VH2 (SEQ ID NO:181) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EVQLVESGGG LARPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVGWVRQA PGKGLEWTAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSARAED TATYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

- 5 Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VH2 este SEQ ID NO:182 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaggtgcagc tgggtggaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag  
 tctgaaactg tectgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg  
tgggctgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg gacggccact  
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggggaag  
 atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga  
 actccgcacg cgcgcaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga  
tttgacggcg catggtttgc ctacttgggga cagggcacat tggtaacgt  
 tagctcc

- 10 CDR<sub>H1</sub> a domeniului VH al hPD-1 mAb 9 VH2 cuprinde o substituție aminoacidă de glicină cu serină și are secvența de aminoacizi: SYLVG ((SEQ ID NO:183), glicina substituită este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>H1</sub> ale PD-1 mAb 9 descrise mai sus.

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 9 VL1 (SEQ ID NO:184) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SYLAWYQQKP GKAPKLLIYN  
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ  
 GTKLEIK

- 15 Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VL1 este SEQ ID NO:185 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga  
 tcgggtcacc atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg  
cctgggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacaac  
gccaagaccc tgcagctgg cgtgccaaagt aggttctcag gcagcggctc  
 aggacagat ttcacctca ccatatcttc actgcagccc gaggattttg  
 ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa  
 ggcactaagc tcgagatcaa a

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 9 VL2 (SEQ ID NO:186) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKP GKAPKLLIYD  
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ  
 GTKLEIK

- 20 Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VL2 este SEQ ID NO:187 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga  
 tcgggtcacc atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg  
cctgggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacgac  
gccaaagaccc tcgcagctgg cgtgcccaagt aggttctcag gcagcggctc  
 aggacagat ttaccacctca ccatatcttc actgcagccc gaggattttg  
 ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa  
 ggcactaagc tcgagatcaa a

CDR<sub>L</sub>1 a domeniului VL al hPD-1 mAb 9 VL2 cuprinde o substituție aminoacidă de asparagină cu serină și are secvența de aminoacizi: RASENIINILA (SEQ ID NO:188), asparagina substituită este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>L</sub>1 ale PD-1 mAb 9 descrise mai sus.

CDR<sub>L</sub>2 a domeniului VL al hPD-1 mAb 9 VL2 cuprinde o substituție aminoacidă de aspartat cu asparagină și are secvența de aminoacizi: DAKTLAA ((SEQ ID NO:189), aspartatul substituit este prezentat subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>L</sub>2 ale PD-1 mAb 7 descrise mai sus.

#### 10 J. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 10

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:190) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYLMSWVRQT PEKRLEWVAS  
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCARQE  
LAFDYWGQGT TLTVSS

|                                                   |                   |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:192): | NYLMS             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:193): | SISGGGSNIYYPDSVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:194): | QELAFDY           |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 10 este SEQ ID NO:191 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaagtgatac tgggtggagtc tgggggagggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca  
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt  
attagtgggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtc  
 attcaccata tcaggggaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga  
 acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa  
ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:195) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRTSQDIS NFLNWYQQKP DGTIKLLIYY  
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GSTLPWTFGG

GTKLEII

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:197): | RTSQDISNFLN |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:198): | YTSRLHS     |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:199): | QQGSTLPWT   |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 10 este SEQ ID NO:196 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gatatccaga tgacacagac tacatctctc ctgtctgcct ctctgggaga  
 cagagtcacc atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatttttttaa  
actgggtatca gcagaaacca gatggaacta ttaaaactcct gatctacttac  
acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc  
 tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg  
 ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcgggtgga  
 ggcaccaagc tggaaatcat a

#### 25 K. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 11

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:200) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate).

EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT GYWMHWVKQR PGQGLKWMGA  
IYPGNSDTHY NQKFKGKAKL TAVTSASTAY MELSSLTNEI SAIYYCTTGT  
YSYFDVWGTG TTVTSS

|                                                   |                   |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:202): | GYWMH             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:203): | AIYPGNSDTHYNQKFKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:204): | GTYSYFDV          |

- 5 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 11 este **SEQ ID NO:201** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc  
 agtgaagatg tcttgaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga  
tgcactgggt aaaacagagg cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct  
atttatcctg gaaatagtga tactcactac aaccagaagt tcaagggcaa  
 ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac atggagctca  
 gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc  
tactcgtact tcatgtctg gggcacagg accacggtca cgtctctctc a

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:205) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQHRT NGSPRLLIKY  
ASESISGIPS RFGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWLTFGAG

- 10 TKLELK

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:207): | RASQSIGTSIH |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:208): | YASESIS     |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:209): | QQSNSWLT    |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 11 este **SEQ ID NO:206** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga  
 aagagtcagt ttctctctgca gggccagtc gagcattggc acaagcatac  
actggtatca gcacagaaca aatggttctc caaggcttct cataaagttat  
gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc aggttttagtg gcagtggatc  
 agggactgat ttactcttta gcatcaacag tgtggagtct gaagatattg  
 cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cgggtgctggg  
 accaagctgg agctgaaa

- 15 **L. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 12**

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:210) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate).

QGHLLQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGT  
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TVDKSSTTTY MELRSLTSED SAVFYCSRER  
ITTVVEGAYW YFDVWGTGTT VTVSS

|                                                   |                   |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:212): | DYEMH             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:213): | TIDPETGGTAYNQKFKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:214): | ERITTVVEGAYWYFDV  |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 12 este **SEQ ID NO:211** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc  
 agtgacgctg tccgtgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga  
tgcactgggt gaaacagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact  
attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa  
 ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc  
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg  
attactacgg ttgttgaggg ggccatactgg tacttcgatg tctggggcac  
 agggaccacg gtcaccgtct cctca

5 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO:215**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK  
 LLICKVSTRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV  
YTFGGGTKLE IK

|                                                            |                   |
|------------------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 12 ( <b>SEQ ID NO:217</b> ): | RSSQNIVHSNNGNTYLE |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 12 ( <b>SEQ ID NO:218</b> ): | KVSTRFS           |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 12 ( <b>SEQ ID NO:219</b> ): | FQGSHPYPT         |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 12 este **SEQ ID NO:216** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gatgttttga tgaccacagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagga  
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg  
gaaacaccta tttagaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag  
 ctctgatct gcaaaagtttc cacccgattt tctgggggtcc cagacaggtt  
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctgggagtt tattattgt ttcaaggttc acatgttccg  
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa

10

#### M. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 13

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO:220**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SHTMSWVRQT PEKRLWVAT  
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARQA  
YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S

|                                                            |                   |
|------------------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 13 ( <b>SEQ ID NO:222</b> ): | SHTMS             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 13 ( <b>SEQ ID NO:223</b> ): | TISGGGSNIYYPDSVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 13 ( <b>SEQ ID NO:224</b> ): | QAYYGNYWYFDV      |

15

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 13 este **SEQ ID NO:221** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tccgtgtgag cctctggatt cactttcagt agccatacca  
tgtcttgggt tgcaccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
attagtgggtg gtggtttctaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg  
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga  
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct  
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt  
 caccgtctcc tcc

20 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO:225**) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA  
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSFKISLQA EDFVSYYCQQ LDSIPWTFGG  
 GTKLEIK

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:227): | LASQTIGTWLA |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:228): | AATSLAD     |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:229): | QQLDSIPWT   |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 13 este **SEQ ID NO:226** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):  
gacattcaga tgacccagtc tctgtccacc cagtctgcat ctctgggaga  
aagtgtcacc atcacgtgcc tggaagtcga gaccattggt acatgggttag  
catgggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctacagctcct gatttatgct  
gcaaccagct tggaagtcga ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc  
tggtcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg  
taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga  
ggcaccaagc tggaaatcaa a

#### 5 N. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 14

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:230) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat).

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI SYWITWVKQR PGQGLQWIGN  
IYPGTDGTTY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHL SRLTSED SAVYYCATGL  
HWYFDVWGTG TTVTSS

|                                                   |                   |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:232): | SYWIT             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:233): | NIYPGTDGTTYNEKFKS |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:234): | GLHWYFDV          |

#### 10 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 14 este **SEQ ID NO:231** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc  
agtgaagatg tctgtcaagg cttctggcta caacttcac agctactgga  
taacctgggt gaaacagagg cctggacaag gccttcagtg gattggaaat  
atttatcctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagcaa  
ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac atgcacctca  
gtgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta  
cactgggtact tcgatgtctg gggcacagg accacgggtca cgtctcttc c

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:235) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKKASQSVG TNVAWYQKP GQSPKALIYS  
ASSRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAIEYFCQQ YNSYPYTFGG

#### 15 GTKLEIK

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:237): | KASQSVGTNVA |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:238): | SASSRFS     |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:239): | QQYNSYPYT   |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 14 este **SEQ ID NO:236** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga  
caggttcagtg gtcacctgca aggccagtcga gagtgtgggt actaatgtag  
cctgggtatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaagcact gatttacttcg  
gcacacctcc gattcagtgg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc  
tggtcacagat ttactctca ccatcagtaa tgtgcagttc gaagacttgg  
cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg  
gggaccaagc tggaaataaa a

#### 20 O. Anticorp PD-1 anti-uman PD-1 mAb 15

##### 1. Anticorp PD-1 anti-uman murin PD-1 mAb 15

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:240) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS SYLISWVRQT PEKRLEWVAA  
ISGGGADTTY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTRRG  
TYAMDYWGQG TSVTVSS

|                                                   |                   |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H</sub> 1 a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:242): | SYLIS             |
| CDR <sub>H</sub> 2 a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:243): | AISGGGADTTYADSVKG |
| CDR <sub>H</sub> 3 a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:244): | RGTYAMDY          |

- 5 Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 15 este **SEQ ID NO:241** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggagggc ttagtgaagc ctggaggggc  
 cctgaaactc tctgtgagc cctctggatt cattttcagt agctatctca  
tctcttgggt tggccagact ccggagaaga ggctggagtg ggctgctgcc  
attatggtg gtggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaagggtcg  
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat ctgcaaata  
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg  
acctatgcta tggactactg gggctcaagga acctcagtc cgtctcctc c

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:245) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKPK GKSPQLLIYA  
ATSLADGVPS RFGSGSGTK FSFKISLQA EDFVNYCQQ LYSIPWTFGG

- 10 GTKLEIK

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| CDR <sub>L</sub> 1 a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:247): | LASQTIGTWLA |
| CDR <sub>L</sub> 2 a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:248): | AATSLAD     |
| CDR <sub>L</sub> 3 a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:249): | QQLYSIPWT   |

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 15 este **SEQ ID NO:246** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

gacattcaga tgacccagtc tccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga  
 aagtgtcacc atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatgggttag  
catggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct  
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc  
 tggcacaaaa tttcttttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg  
 taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga  
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

- 15 **2. Umanizarea anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 15 pentru a forma „hPD-1 mAb 15”**

Anticorpul PD-1 anti-uman murin descris mai sus, PD-1 mAb 15, a fost umanizat și mai departe deimmunizat când au fost identificați epitopii antigenici pentru a demonstra capacitatea de umanizare a unui anticorp PD-1 anti-uman astfel încât să scadă antigenicitatea sa după administrarea la un destinatar uman. Umanizarea a dat un domeniu VH umanizat, denumit aici ca „hPD-1 mAb 2 VH1”, și un domeniu VL umanizat denumit aici ca „hPD-1 mAb 1 VL1”. Un anticorp cuprinzând domeniul VL umanizat imperecheat cu domeniul VH umanizat este cel la care se face referire ca „hPD-1 mAb 15”.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 15 VH1 (SEQ ID NO:250) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFIFS SYLISWVRQA PGKLEWVAA  
ISGGGADTTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG  
TYAMDYWGQG TLVTVSS

- 25 Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 15 VH1 este **SEQ ID NO:251** (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc  
 actcagactg tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta  
tctcttgggt ggcgaagcc ccaggtgaagg gccttgaatg ggctcgcgccc  
attagtgggg gtggtgccga tacatattat gccgacagcg tcaagggacg  
 ttccaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac ctgcagatga  
 actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg  
acttacgcta tggactattg gggccagggc accttggtca ctgtctcatc c

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 15 VL1 (SEQ ID NO:252) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKAPKLLIYA  
ATSLADGVPS RFSGSGSGTD FTFITSSLPQ EDFATYYCQQ LYSIPWTFGQ  
 GTKLEIK

- 5 Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 15 VL1 este SEQ ID NO:253 (nucleotidele care codifică resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

gatatccaga tgaccagtc tccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga  
 ccgtgtgacc atcacctgtc tggccagtc gaccattgga acctggctcg  
cctgggtatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc  
gccacctccc tgcagatgg agtgccctcc cgatttagcg ggccgggctc  
 cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc gaggatttcg  
 ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag  
 ggtactaaac tggagatcaa a

#### V. Anticorpi PD-1 anti-umani PD-1 mAb 1-15, și derivați ai lor având o regiune Fc modificată genetic

- 10 În funcția imună tradițională, interacțiunea complexelor anticorp-antigen cu celulele sistemului imunitar conduce la o matrice largă de răspunsuri, care variază de la funcțiile efectoare cum ar fi citotoxicitatea dependentă de anticorp, degranularea mastocitelor, și fagocitoză până la semnalele imunomodulatoare cum ar fi proliferarea reglării de limfocite și secreția anticorpului. Toate aceste interacțiuni sunt inițiate prin legarea regiunii Fc a anticorpilor sau complexelor imunitari la receptori
- 15 specializați ai suprafeței celulare pe celulele hematopoietice. Diversitatea răspunsurilor celulare declanșată de anticorpi și complexii imunitari rezultă din eterogenitatea structurală a trei receptori Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), și FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) și FcγRIII (CD16) sunt receptori de activare (adică, sporesc sistemul imunitar); FcγRIIB (CD32B) este un receptor de inhibare (adică, diminuează sistemul imunitar). În plus, interacțiunea cu receptorul Fc neonatal (FcRn) mediază reciclarea moleculelor IgG de la endosom la suprafața celulei și le eliberează în sânge. Secvențele de aminoacizi din exemplele de IgG1 (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:2), IgG3 (SEQ ID NO:3), și IgG4 (SEQ ID NO:4) de tip sălbatic sunt prezentate mai sus.

- 25 Modificarea regiunii Fc conduce în mod normal la un fenotip alterat, de exemplu perioadă alterată de înjumătățire în ser, stabilitate alterată, susceptibilitate alterată la enzimele celulare sau funcții efectoare alterate. Se poate dori să se modifice un anticorp sau altă moleculă de legare din prezenta divulgare față de funcțiile efectoare, de exemplu, astfel încât să sporească eficacitatea unei astfel de molecule în tratarea cancerului. Reducerea sau eliminarea funcțiilor efectoare este de dorit în anumite cazuri, de exemplu în cazul anticorpilor al căror mecanism de acțiune implică blocarea sau antagonismul, dar nu și uciderea celulelor care poartă un antigen țintă. Funcțiile efectoare crescute sunt în general de
- 30 dorit când sunt direcționate spre celule nedorite, cum ar fi celulele tumorale și străine, unde FcγR-urile sunt exprimate la niveluri scăzute, de exemplu, celule B specifice tumorii cu niveluri scăzute de FcγRIIB (de exemplu, limfom non-Hodgkins, CLL, și limfom Burkitt). În respectivele cazuri, moleculele divulgării cu activitatea funcțiilor efectoare conferită sau alterată sunt utile pentru tratamentul și/sau prevenirea unei boli, tulburări sau infecții unde este dorită o eficacitate sporită a activității funcțiilor
- 35 efectoare.

- În anumite cazuri, moleculele de PD-1 din prezenta divulgare cuprind o regiune Fc care posedă una sau mai multe modificări (de exemplu, substituții, deleții, sau inserții) la secvența de aminoacizi a unei regiunii Fc de tip sălbatic (de exemplu, SEQ ID NO:1), care reduce afinitatea și aviditatea regiunii Fc și, astfel, a moleculei din divulgare, pentru unul sau mai mulți receptori FcγR. În alte cazuri,
- 40 moleculele din divulgare cuprind o regiune Fc care posedă una sau mai multe modificări la aminoacizii regiunii Fc de tip sălbatic, care cresc afinitatea și aviditatea regiunii Fc și, astfel, a moleculei din divulgare, pentru unul sau mai mulți receptori FcγR. În alte cazuri, molecula cuprinde o regiune Fc variantă în care respectiva variantă conferă sau mediază activitatea citotoxică crescută mediată de celula dependentă de anticorp (ADCC) și/sau o legare crescută la FcγRIIA, față de o moleculă care nu cuprinde

nici o regiune Fc sau care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic. În cazurile alternate, moleculele cuprind o variantă a regiunii Fc în care respectiva variantă conferă sau mediază o activitate ADCC scăzută (sau a altei funcții efectoare) și/sau o legare crescută la FcγRIIB, față de o moleculă care nu cuprinde nici o regiune Fc sau care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic. În unele cazuri, divulgarea cuprinde molecule de legare la PD-1 care cuprind o regiune Fc variantă, care regiune Fc variantă nu prezintă o legare detectabilă la nici un FcγR, față de o moleculă comparabilă care cuprinde regiunea Fc de tip sălbatic. În alte cazuri, divulgarea cuprinde molecule de legare la PD-1 care cuprind o variantă a regiunii Fc, care variantă a regiunii Fc se leagă numai la un singur FcγR, preferabil unul dintre FcγRIIA, FcγRIIB, sau FcγRIIIA. Orice astfel de afinitate crescută și/sau aviditate este evaluată preferabil prin măsurarea extinderii *in vitro* a legării detectabile la activitatea asociată cu FcγR sau FcγR în celulele care exprimă niveluri scăzute ale FcγR cand activitatea de legare a moleculei părinte (fără regiunea Fc modificată) nu poate fi detectată în celule, sau în celule care exprimă antigenii țintă ai receptorului non-FcγR la o densitate de 30.000 până la 20.000 de molecule/celulă, la o densitate de 20.000 până la 10.000 de molecule/celulă, la o densitate de 10.000 până la 5.000 de molecule/celulă, la o densitate de 5.000 până la 1.000 de molecule/celulă, la o densitate de 1.000 până la 200 de molecule/celulă sau la o densitate de 200 de molecule/celulă sau mai mică (dar cel puțin de 10, 50, 100 sau 150 molecule/celulă).

Moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare pot cuprinde o variantă a regiunii Fc având afinități alterate pentru o activare și/sau inhibare a receptorului Fcγ. Într-un caz, molecula de legare la PD-1 cuprinde o regiune Fc variantă care are afinitate crescută pentru FcγRIIB și o afinitate scăzută pentru FcγRIIIA și/sau FcγRIIA, față de o moleculă comparabilă cu o regiune Fc de tip sălbatic. Într-un alt caz, molecula de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprinde o variantă a regiunii Fc, care are o afinitate scăzută pentru FcγRIIB și afinitate crescută pentru FcγRIIIA și/sau FcγRIIA, față de o moleculă comparabilă cu o regiune Fc de tip sălbatic. În încă un alt caz, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc care are o afinitate scăzută pentru FcγRIIB și o afinitate scăzută pentru FcγRIIIA și/sau FcγRIIA, față de o moleculă comparabilă cu o regiune Fc de tip sălbatic. În încă un alt caz, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc, care are afinitate nemodificată pentru FcγRIIB și o afinitate scăzută (sau crescută) pentru FcγRIIIA și/sau FcγRIIA, față de o moleculă comparabilă cu o regiune Fc de tip sălbatic.

În anumite cazuri, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc având o afinitate alterată pentru FcγRIIIA și/sau FcγRIIA astfel încât imunoglobulina are o funcție efectoare sporită. Exemple nelimitative de funcții celulare efectoare includ citotoxicitatea mediată de celula dependentă de anticorp, fagocitoza dependentă de anticorp, fagocitoza, opsonizarea, opsonofagocitoza, legarea celulei, rozarea, legarea la C1q, și citotoxicitatea mediată de celula dependentă de complement.

Într-un caz preferat, alterarea afinității sau funcțiilor efectoare este cel puțin de 2 ori, preferabil cel puțin de 4 ori, cel puțin de 5 ori, cel puțin de 6 ori, cel puțin de 7 ori, cel puțin de 8 ori, cel puțin de 9 ori, cel puțin de 10 ori, cel puțin de 50 de ori, sau cel puțin de 100 de ori, față de o moleculă comparabilă care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic. În alte cazuri din divulgare, varianta regiunii Fc se leagă imunospesific la unul sau mai mulți FcR cu cel puțin 65%, preferabil cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, sau 250% afinitate mai mare față de o moleculă care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic. Astfel de măsurători pot fi în teste *in vivo* sau *in vitro*, și într-un caz preferat sunt teste *in vitro* cum ar fi teste ELISA sau de rezonanță plasmonică de suprafață.

În diferite cazuri, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc în care respectiva variantă agonizează cel puțin o activitate a unui receptor FcγR, sau antagonizează cel puțin o activitate a unui receptor FcγR. Într-un caz preferat, moleculele cuprind o variantă care antagonizează una sau mai multe activități ale FcγRIIB, de exemplu, semnalizarea mediată de receptorul celulei B, activarea celulelor B, proliferarea celulelor B, producția de anticorp, influxul de calciu intracelular al celulelor B, progresul ciclului celular, inhibarea mediată de FcγRIIB a semnalizării FcεRI, fosforilarea FcγRIIB, recrutarea SHIP, fosforilarea SHIP și asocierea cu Shc, sau activitatea uneia sau mai multor molecule în aval (de exemplu, kinază MAP, JNK, p38, sau Akt) în calea de transducție a semnalului FcγRIIB. Într-un alt caz, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă care agonizează una sau mai multe activități ale FcεRI, de exemplu, activarea mastocitelor, mobilizarea calciului, degranularea, producția de citokine, sau eliberarea de serotonină.

În anumite cazuri, moleculele cuprind o regiune Fc care cuprinde regiuni de la două sau mai multe izotipuri IgG (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4). Așa cum s-a utilizat în acest document, o regiune Fc este menționată a fi a unui anumit izotip IgG dacă secvența sa de aminoacizi este cea mai omoloagă cu cea a izotipului față de alte izotipuri IgG. Diferitele izotipuri IgG prezintă diferite proprietăți fizice și funcționale incluzând perioada de înjumătățire în ser, fixarea complementului, afinități de legare la FcγR și activități ale funcțiilor efectoare (de exemplu, ADCC, CDC, etc.) din cauza diferențelor în secvențele de aminoacizi ale regiunilor lor balama și/sau Fc, de exemplu cum s-a descris în Flesch și Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel și colab. (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-

25131; Chappel și colab. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; sau Bruggemann și colab. (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Acest tip de variantă a regiunii Fc poate fi utilizată singură, sau în combinație cu o modificare de aminoacid, pentru a afecta funcțiile efectoare mediate de Fc și/sau activitatea de legare. În combinație, modificarea de aminoacid și regiunea IgG balama/Fc pot afișa o funcționalitate similară (de exemplu, afinitate crescută pentru FcγRIIA) și pot acționa aditiv sau, mai preferabil, sinergic pentru a modifica funcționalitatea efectoare în molecula din divulgare, față de o moleculă din divulgare care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic. În alte cazuri, modificarea de aminoacid și regiunea Fc IgG pot afișa o funcționalitate opusă (de exemplu, afinitate crescută și scăzută pentru FcγRIIA, respectiv) și pot acționa pentru a tempera sau reduce selectiv o funcționalitate specifică în molecula din divulgare, față de o moleculă din divulgare care nu cuprinde o regiune Fc sau care cuprinde o regiune Fc de tip sălbatic a aceluiași izotip.

Intr-un caz specific preferat, moleculele de legare PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc, în care respectiva variantă a regiunii Fc cuprinde cel puțin o modificare de aminoacid față de o regiune Fc de tip sălbatic, astfel încât respectiva moleculă are o afinitate alterată pentru un FcR, cu condiția că atunci respectiva variantă a regiunii Fc nu are o substituție în pozițiile care fac un contact direct cu FcγR pe baza analizei cristalografice și structurale a interacțiunilor Fc-FcR cum ar fi cele divulgate de Sondermann și colab. (2000) Nature 406:267-73. Exemple de poziții în regiunea Fc care fac un contact direct cu FcγR sunt resturile de aminoacid 234-239, resturi de aminoacid 265-269 (bucla B/C), resturile de aminoacid 297-299 (bucla C'/E), și resturile de aminoacid 327-332 (bucla F/G). În unele cazuri, moleculele din divulgare cuprind variante de regiuni Fc care cuprind modificarea a cel puțin unui reziduu care nu face un contact direct cu un FcγR pe baza analizei structurale și cristalografice, de exemplu, nu este în situsul de legare Fc-FcγR.

Variantele regiunilor Fc sunt bine cunoscute în domeniu, și orice variantă a regiunii Fc cunoscută poate fi utilizată în prezenta divulgare pentru a conferi sau modifica funcțiile efectoare prezentate de o moleculă din divulgare care cuprinde o regiune Fc (sau porțiune a acesteia) ca testată funcțional, de exemplu, într-un test dependent de NK sau dependent de macrofage. De exemplu, variantele regiunii Fc identificate ca funcții efectoare alterate sunt divulgate în publicațiile PCT nr. WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; și WO 2008/140603, și orice variantă adecvată divulgată aici poate fi utilizată în moleculele prezente.

În anumite cazuri, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc, având una sau mai multe modificări de aminoacizi în una sau mai multe regiuni, care modificare (modificări) alterează (față de o regiune Fc de tip sălbatic) **raportul de afinități** al variantei regiunii Fc la un FcγR de activare (cum ar fi FcγRIIA sau FcγRIIA) față de un FcγR de inhibare (cum ar fi FcγRIIB):

$$\text{Raport de afinități} = \frac{\text{Modificare a afinității de tip sălbatic față de variantă la FcγR de activare}}{\text{Modificare a afinității de tip sălbatic față de variantă la FcγR de inhibare}}$$

În special preferate sunt moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare care au o variantă a regiunii Fc (față de regiunea Fc de tip sălbatic) în care varianta regiunii Fc are un raport de afinități mai mare decât 1. Astfel de molecule au utilizarea particulară în furnizarea unui tratament terapeutic sau profilactic al unei boli, tulburări, sau infecții, sau în ameliorarea unui simptom al acestora, unde este dorită o eficacitate sporită a funcției celulei efectoare (de exemplu, ADCC) mediată de FcγR, de exemplu, cancer sau boală infecțioasă. În contrast, o variantă a regiunii Fc având un raport de afinități mai mic de 1 mediază o eficacitate scăzută a funcției celulei efectoare. **Tabelul 1** listează exemple de mutații singure, duble, triple, cvadruple și cvintuple dacă raportul lor de afinități este mai mare sau mai mic decât 1.

| Tabelul 1                                                                      |                |                        |                             |                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Exemple de mutații singure și multiple listate pe baza raportului de afinități |                |                        |                             |                                    |
| Singură                                                                        | Dublă          | Triplă                 | Cvadruplă                   | Cvintuplă                          |
| Raport de afinități > 1                                                        |                |                        |                             |                                    |
| F243L                                                                          | F243L<br>R292P | & F243L, P247L & N421K | L234F, F243L, R292P & Y300L | L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L |
| D270E                                                                          | F243L<br>Y300L | & F243L, R292P & Y300L | L235I, F243L, R292P & Y300L | L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L |
| R292G                                                                          | F243L<br>P396L | & F243L, R292P & V305I | L235Q, F243L, R292P & Y300L | F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L |

| Tabelul 1                                                                      |                |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------|---|-----------------|-------|----------------------|---------------------------------|--|-----------|--|
| Exemple de mutații singure și multiple listate pe baza raportului de afinități |                |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
| Singură                                                                        | Dublă          |   | Triplă          |       |                      | Cvadruplă                       |  | Cvintuplă |  |
| Raport de afinități > 1                                                        |                |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
| R292P                                                                          | D270E<br>P396L | & | F243L,<br>P396L | R292P | &                    | F243L, P247L, D270E &<br>N421K  |  |           |  |
|                                                                                | R292P<br>Y300L | & | F243L,<br>P396L | Y300L | &                    | F243L, R255L, D270E &<br>P396L  |  |           |  |
|                                                                                | R292P<br>V305I | & | P247L,<br>N421K | D270E | &                    | F243L, D270E, G316D &<br>R416G  |  |           |  |
|                                                                                | R292P<br>P396L | & | R255L,<br>P396L | D270E | &                    | F243L, D270E, K392T &<br>P396L  |  |           |  |
|                                                                                | Y300L<br>P396L | & | D270E,<br>R416G | G316D | &                    | F243L, D270E, P396L &<br>Q419H  |  |           |  |
|                                                                                | P396L<br>Q419H | & | D270E,<br>P396L | K392T | &                    | F243L, R292P, Y300L, &<br>P396L |  |           |  |
|                                                                                |                |   | D270E,<br>Q419H | P396L | &                    | F243L, R292P, V305I &<br>P396L  |  |           |  |
|                                                                                |                |   | V284M,<br>K370N | R292L | &                    | P247L, D270E, Y300L &<br>N421K  |  |           |  |
|                                                                                |                |   | R292P,<br>P396L | Y300L | &                    | R255L, D270E, R292G &<br>P396L  |  |           |  |
|                                                                                |                |   |                 |       |                      | R255L, D270E, Y300L &<br>P396L  |  |           |  |
|                                                                                |                |   |                 |       |                      | D270E, G316D, P396L &<br>R416G  |  |           |  |
| Raport de afinități < 1                                                        |                |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
| Y300L                                                                          | F243L & P396L  |   |                 |       | F243L, R292P & V305I |                                 |  |           |  |
| P396L                                                                          | P247L & N421K  |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
|                                                                                | R255L & P396L  |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
|                                                                                | R292P & V305I  |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
|                                                                                | K392T & P396L  |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |
|                                                                                | P396L & Q419H  |   |                 |       |                      |                                 |  |           |  |

Intr-un caz specific, în variantele regiunilor Fc, orice modificări de aminoacizi (de exemplu, substituții) au loc la oricare din pozițiile 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328, sau 330 și preferabil la unul sau mai multe din următoarele resturi: A240, I240, L241, L243, H244, N298, 1328 sau V330. Intr-un caz specific diferit, în variantele regiunilor Fc, orice modificări de aminoacizi (de exemplu, substituții) au loc la oricare din pozițiile 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 sau 439 și preferabil la unul sau mai multe din următoarele resturi: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 sau L300.

Intr-un caz preferat, în variantele regiunilor Fc care se leagă la un FcγR cu o afinitate alterată, orice modificări de aminoacizi (de exemplu, substituții) au loc la oricare din pozițiile 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 sau 439. Preferabil, varianta regiunii Fc are oricare din următoarele resturi: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 sau A430.

Intr-un caz diferit, în variantele regiunilor Fc care se leagă la un FcγR (prin regiunea sa Fc) cu o afinitate redusă, orice modificări de aminoacizi (de exemplu, substituții) au loc la oricare din pozițiile 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 sau 439.

- 5 Intr-un caz diferit, în variantele regiunilor Fc care se leagă la un FcγR (prin regiunea sa Fc) cu o afinitate sporită, orice modificări de aminoacizi (de exemplu, substituții) au loc la oricare din pozițiile 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 sau 430. Intr-un caz diferit, în variantele regiunilor Fc care se leagă la FcγRIIA cu o afinitate sporită, au loc oricare din următoarele resturi: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 sau A430.
- 10

Variantele preferate includ una sau mai multe modificări la oricare din pozițiile: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 sau 332.

- 15 Variantele în special preferate includ una sau mai multe modificări selectate dintre grupurile A-AI:

|    |                                                                                                                |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A  | 228E, 228K, 228Y sau 228G;                                                                                     |
| B  | 230A, 230E, 230Y sau 230G;                                                                                     |
| C  | 231E, 231K, 231Y, 231P sau 231G;                                                                               |
| D  | 232E, 232K, 232Y, 232G;                                                                                        |
| E  | 233D;                                                                                                          |
| F  | 234I sau 234F;                                                                                                 |
| G  | 235D, 235Q, 235P, 235I sau 235V;                                                                               |
| H  | 239D, 239E, 239N sau 239Q;                                                                                     |
| I  | 240A, 240I, 240M sau 240T;                                                                                     |
| J  | 243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H sau 243I;                                                              |
| K  | 244H;                                                                                                          |
| L  | 245A;                                                                                                          |
| M  | 247G, 247V sau 247L;                                                                                           |
| N  | 262A, 262E, 262I, 262T, 262E sau 262F;                                                                         |
| O  | 263A, 263I, 263M sau 263T;                                                                                     |
| P  | 264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T sau 264W;                                                                   |
| Q  | 265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N sau 265Q;                                                       |
| R  | 266A, 266I, 266M sau 266T;                                                                                     |
| S  | 271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W sau 271G; |
| T  | 273I;                                                                                                          |
| U  | 275L sau 275W;                                                                                                 |
| V  | 281D, 281K, 281Y sau 281P;                                                                                     |
| W  | 284E, 284N, 284T, 284L, 284Y sau 284M;                                                                         |
| X  | 291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I sau 291G;                                                                   |
| Y  | 299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W sau 299Y; |
| Z  | 302I;                                                                                                          |
| AA | 304D, 304N, 304T, 304H sau 304L                                                                                |
| AB | 305I;                                                                                                          |
| AC | 313F;                                                                                                          |

|    |                                                                                                                   |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AD | 3231;                                                                                                             |
| AE | 325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W sau 325P;          |
| AF | 328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M sau 328N;    |
| AG | 330L, 330Y, 330I sau 330V;                                                                                        |
| AH | 332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G sau 332Y; și |
| AI | 336E, 336K sau 336Y                                                                                               |

Variantele încă mai special preferate includ una sau mai multe modificări selectate dintre grupurile 1-105:

| Grup | VARIANTĂ                                      | Grup | VARIANTĂ                                                       |
|------|-----------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------|
| 1    | A330L / I332E                                 | 54   | S239D / D265L / N297D / I332E                                  |
| 2    | D265F / N297E / I332E                         | 55   | S239D / D265T / N297D / I332E                                  |
| 3    | D265Y / N297D / I332E                         | 56   | S239D / D265V / N297D / I332E                                  |
| 4    | D265Y / N297D / T299L / I332E                 | 57   | S239D / D265Y / N297D / I332E                                  |
| 5    | F241E / F243Q / V262T / V264F                 | 58   | S239D / I332D                                                  |
| 6    | F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E         | 59   | S239D / I332E                                                  |
| 7    | F241E / F243R / V262E / V264R                 | 60   | S239D / I332E / A330I                                          |
| 8    | F241E / F243R / V262E / V264R / I332E         | 61   | S239D / I332N                                                  |
| 9    | F241E / F243Y / V262T / V264R                 | 62   | S239D / I332Q                                                  |
| 10   | F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E         | 63   | S239D / N297D / I332E                                          |
| 11   | F241L / F243L / V262I / V264I                 | 64   | S239D / N297D / I332E / A330Y                                  |
| 12   | F241L / V262I                                 | 65   | S239D / N297D / I332E / A330Y / F241 S / F243H / V262T / V264T |
| 13   | F241R / F243Q / V262T / V264R                 | 66   | S239D / N297D / I332E / K326E                                  |
| 14   | F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E         | 67   | S239D / N297D / I332E / L235D                                  |
| 15   | F241W / F243W / V262A / V264A                 | 68   | S239D / S298A / I332E                                          |
| 16   | F241Y / F243Y / V262T / V264T                 | 69   | S239D / V264I / A330L / I332E                                  |
| 17   | F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E | 70   | S239D / V264I / I332E                                          |
| 18   | F243L / V262I / V264W                         | 71   | S239D / V264I / S298A / I332E                                  |
| 19   | P243L / V264I                                 | 72   | S239E / D265N                                                  |
| 20   | L328D / I332E                                 | 73   | S239E / D265Q                                                  |
| 21   | L328E / I332E                                 | 74   | S239E / I332D                                                  |
| 22   | L328H / I332E                                 | 75   | S239E / I332E                                                  |
| 23   | L328I / I332E                                 | 76   | S239E / I332N                                                  |
| 24   | L328M / I332E                                 | 77   | S239E / I332Q                                                  |
| 25   | L328N / I332E                                 | 78   | S239E / N297D / I332E                                          |
| 26   | L328Q / I332E                                 | 79   | S239E / V264I / A330Y / I332 E                                 |

| Grup | VARIANTĂ                                      | Grup | VARIANTĂ                              |
|------|-----------------------------------------------|------|---------------------------------------|
| 27   | L328T / I332E                                 | 80   | S239E / V264I / I332 E                |
| 28   | L328V / I332E                                 | 81   | S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E |
| 29   | N297D / A330Y / I332E                         | 82   | S239N / A330L / I332E                 |
| 30   | N297D / I332E                                 | 83   | S239N / A330Y / I332E                 |
| 31   | N297D / I332E / S239D / A330L                 | 84   | S239N / I332D                         |
| 32   | N297D / S298A / A330Y / I 332E                | 85   | S239N / I332E                         |
| 33   | N297D / T299L / I332E                         | 86   | S239N / I332N                         |
| 34   | N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E | 87   | S239N / I332Q                         |
| 35   | N297D / T299I / I332E                         | 88   | S239N1S298A / I332E                   |
| 36   | N297D / T299L / I332E                         | 89   | S239Q / I332D                         |
| 37   | N297D / T299V / I332E                         | 90   | S239Q / I332E                         |
| 38   | N297E / I332E                                 | 91   | S239Q / I332N                         |
| 39   | N297S / I332E                                 | 92   | S239Q / I332Q                         |
| 40   | P230A / E233D / I332E                         | 93   | S239Q / V264I / I332E                 |
| 41   | P244H / P245A / P247V                         | 94   | S298A / I332E                         |
| 42   | S239D / A330L / I332E                         | 95   | V264E / N297D / I332E                 |
| 43   | S239D / A330Y / I332E                         | 96   | V264I / A330L / I332E                 |
| 44   | S239D / A330Y / I332E / K326E                 | 97   | V264I / A330Y / I332E                 |
| 45   | S239D / A330Y / I332E / K326T                 | 98   | V264I / I332E                         |
| 46   | S239D / A330Y / I332E / L234I                 | 99   | V264I / S298A / I332E                 |
| 47   | S239D / A330Y / I332E / L235D                 | 100  | Y296D / N297D / I332E                 |
| 48   | S239D / A330Y / I332E / V240I                 | 101  | Y296E / N297D / I332 E                |
| 49   | S239D / A330Y / I332E / V264T                 | 102  | Y296H / N297D / I332E                 |
| 50   | S239D / A330Y / I332E / V266I                 | 103  | Y296N / N297D / I332E                 |
| 51   | S239D / D265F / N297D / I332E                 | 104  | Y296Q / N297I / I332E                 |
| 52   | S239D / D265H / N297D / I332E                 | 105  | Y296T / N297D / I332E                 |
| 53   | S239D / D265I / N297D / I332E                 |      |                                       |

Intr-un caz, o moleculă de legare la PD-1 din divulgare va cuprinde o variantă a regiunii Fc având cel puțin o modificare în regiunea Fc. În anumite cazuri, varianta regiunii Fc cuprinde cel puțin o substituție selectată din grupul constând din L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I, și P396L.

5 Intr-un caz specific, varianta regiunii Fc cuprinde:

(A) cel puțin o substituție selectată din grupul constând din F243L, R292P, Y300L, V305I, și P396L;

(B) cel puțin două substituții selectate din grupul constând din:

(1) F243L și P396L;

(2) F243L și R292P; și

10 (3) R292P și V305I;

(C) cel puțin trei substituții selectate din grupul constând din:

(1) F243L, R292P și Y300L;

(2) F243L, R292P și V305I;

(3) F243L, R292P și P396L; și

15 (4) R292P, V305I și P396L;

(D) cel puțin patru substituții selectate din grupul constând din:

(1) F243L, R292P, Y300L și P396L; și

(2) F243L, R292P, V305I și P396L; sau

(E) cel puțin cinci substituții selectate din grupul constând din:

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I și P396L; și

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L și P396L.

Intr-un alt caz specific, varianta regiunii Fc cuprinde substituții de:

(A) F243L, R292P, și Y300L;

5 (B) L235V, F243L, R292P, Y300L, și P396L; sau

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I, și P396L.

Intr-un caz, o moleculă de legare la PD-1 din divulgare cuprinde o variantă a regiunii Fc care prezintă o legare scăzută (sau substanțial nici una) la FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) sau FcγRIIIB (CD16b) (față de legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Intr-un caz, o moleculă de legare la PD-1 din divulgare va cuprinde o variantă a regiunii Fc care prezintă legare redusă (sau substanțial nici una) la un FcγR (de exemplu, FcγRIIIA) și funcții efectoare ADCC reduse (sau substanțial nici una). În anumite cazuri, varianta regiunii Fc cuprinde cel puțin o substituție selectată din grupul constând din L234A, L235A, D265A, N297Q, și N297G. Într-un caz specific, varianta regiunii Fc cuprinde substituții la L234A; 10 L235A; L234A și L235A; D265A; N297Q, sau N297G.

O secvență IgG1 preferată pentru domeniile CH2 și CH3 ale moleculelor de legare la PD-1 din divulgare vor avea substituțiile L234A/L235A (**SEQ ID NO:5**):

APEAAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
ALHNHYTQKS LSLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

20 Intr-un caz diferit, o moleculă de legare la PD-1 din divulgare cuprinde o regiune Fc care în mod inherent prezintă o legare scăzută (sau substanțial nici una) la FcγRIIIA (CD16a) și/sau funcții efectoare reduse (față de legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Intr-un caz specific, o moleculă de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprinde o regiune Fc IgG2 (**SEQ ID NO:2**) sau o regiune Fc IgG4 (**SEQ ID: NO:4**). Când o regiune Fc IgG4 este utilizată, divulgarea 25 prezintă cuprinde de asemenea introducerea unei mutații de stabilizare, astfel încât substituția S228P a regiunii balama IgG4 (vezi, de exemplu, **SEQ ID NO:13**: ESKYGPPCP~~PCP~~, (Lu și colab., (2008) „The Effect Of A PointMutation On The Stability Of IgG4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation“, J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969) să reducă incidența modificării catenei. Alte mutații stabilizatoare cunoscute în domeniu pot fi introduse într-o regiune Fc IgG4 (Peteri, P și colab., (2012) „Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability“, J. Biol. Chem., 287:24525-24533; publicația PCT a brevetului nr.: WO 2008/145142).

În alte cazuri, divulgarea cuprinde utilizarea oricărei variante a regiunilor Fc cunoscute în domeniu, cum ar fi cele divulgate în Jefferis, B.J. și colab. (2002) „Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγγR: Current Models“, Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. și colab. (2002) „Engineering 35 Therapeutic Antibodies For Improved Function“, Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. și colab. (2001) „Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement“, J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. și colab. (2001) „High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For FcγγRI, FcγγRII, FcγγRIII, And FcγγRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The FcγγR“, J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. și colab. (2000) 40 „Mapping Of The Clq Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc“, J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. și colab. (2000) „Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4“, J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. și colab. (2000) „In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies“, Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. și colab. (1999) „Recombinant human IgG 45 Molecules Lacking Fcγγ Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities“, Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. și colab. (1996) „Modulation Of Fc(γγ)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions“, Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. și colab. (1996) „Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fcγγ Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide 50 Chains“, J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins și colab. (1995) „Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A γγ4 Variant Of Campath-1H“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. și colab. (1995) „Recognition Sites On Human IgG For Fcγγ Receptors: The Role Of Glycosylation“, Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. și colab. (1995) „Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fcγγ Receptors“, FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. și colab. (1994) „A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo“, Transplantation 57:1537-

1543; Lund și colab. (1992) „Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11“, Mol. Immunol. 29:53-59; Lund și colab. (1991) „Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG“, J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. și colab. (1988) „Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG“, Nature 332:563-564; brevetul SUA nr. 5.624.821; 5.885.573; 6.194.551; 7.276.586; și 7.317.091; și publicațiile PCT WO 00/42072 și PCT WO 99/58572.

În unele cazuri, moleculele din divulgare cuprind suplimentar unul sau mai multe situsuri de glicozilare, astfel încât unul sau mai mulți radicali carbohidrat sunt atașați covalent la molecule. Preferabil, moleculele din divulgare cu unul sau mai multe situsuri de glicozilare și/sau una sau mai multe modificări în regiunea Fc conferă sau au o funcție efectoră sporită mediată de anticorp, de exemplu, activitatea ADCC sporită, în comparație cu anticorpul nemodificat. În unele cazuri, divulgarea cuprinde în plus molecule cuprinzând una sau mai multe modificări de aminoacizi care sunt direct sau indirect cunoscute că interacționează cu un radical carbohidrat din regiunea Fc, incluzând dar fără a se limita la aminoacizii din pozițiile 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, și 301. Aminoacizii care interacționează direct sau indirect cu un radical carbohidrat al unei regiuni Fc sunt cunoscuți în domeniu, *vezi*, de exemplu, Jefferis și colab., 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

Intr-un alt caz, divulgarea cuprinde molecule care au fost modificate prin introducerea unuia sau mai multor situsuri de glicozilare în unul sau mai multe situsuri ale moleculelor, preferabil fără alterarea funcționalității moleculelor, de exemplu, activitatea de legare la antigenul țintă sau la FcγR. Situsurile de glicozilare pot fi introduse în regiunea variabilă și/sau constantă a moleculelor din divulgare. Așa cum s-a utilizat în acest document, „situsurile de glicozilare“ includ orice secvență specifică de aminoacizi într-un anticorp la care o oligozaharidă (adică, carbohidrați conținând două sau mai multe zaharuri simple legate împreună) se va atașa specific și covalent. Catenele laterale de oligozaharidă sunt de obicei legate la eșafodajul unui anticorp prin legături fie N sau fie O. Glicozilarea prin legături N se referă la atașarea unui radical de oligozaharidă la catena laterală a unui rest de asparagină. Glicozilarea prin legături O se referă la atașarea unui radical de oligozaharidă la un acid hidroxi amino, de exemplu, serină, treonină. Moleculele din divulgare pot cuprinde unul sau mai multe situsuri de glicozilare, incluzând situsuri de glicozilare de legături N și de legături O. Orice situs de glicozilare de legături N sau de legături O cunoscut în domeniu poate fi utilizat în conformitate cu divulgarea prezentă. Un exemplu de situs de glicozilare de legături N care este util în conformitate cu metodele din prezenta divulgare este secvența de aminoacizi: Asn-X-Thr/Ser, în care X poate fi orice aminoacid și Thr/Ser indică o treonină sau o serină. Un astfel de situs sau situsuri poate fi introdus într-o moleculă din divulgare utilizând metode bine cunoscute în domeniu la care această divulgare se referă (*vezi* de exemplu, IN VITRO MUTAGENESIS, RECOMBINANT ADN: A SHORT COURSE, J. D. Watson, și colab. W.H. Freeman și Company, New York, 1983, capitolul 8, pag. 106-116). Un exemplu de metodă pentru introducerea unui situs de glicozilare într-o moleculă din divulgare poate cuprinde: modificarea sau mutarea unei secvențe de aminoacizi a moleculei astfel încât să se obțină secvența dorită Asn-X-Thr/Ser.

În unele cazuri, divulgarea cuprinde metode de modificare a conținutului de carbohidrat al unei molecule din divulgare prin adăugarea sau deleția unui situs de glicozilare. Metodele pentru modificarea conținutului de carbohidrați ai anticorpilor (și moleculelor care cuprind domenii de anticorp, de exemplu, regiunea Fc) sunt bine cunoscute în domeniu și cuprinse în divulgările, *vezi*, de exemplu, brevetul S.U.A. nr. 6.218.149; EP 0 359 096 B1; publicația S.U.A. nr. 2002/0028486; WO 03/035835; publicația S.U.A. nr. 2003/0115614; brevetul S.U.A. nr. 6,218,149; brevetul S.U.A. nr. 6.472.511. În alte cazuri, divulgarea cuprinde metode de modificare a conținutului de carbohidrați al unei molecule din divulgare prin deleția unuia sau mai multor radicali carbohidrat endogeni ai moleculei. Intr-un caz specific, divulgarea cuprinde deplasarea situsului de glicozilare al regiunii Fc a unui anticorp, prin modificarea pozițiilor adiacente până la 297. Într-un caz specific, divulgarea cuprinde modificarea poziției 296 astfel încât poziția 296 și nu poziția 297 să fie glicozilată.

Funcțiile efectoră pot fi de asemenea modificate prin tehnici cum ar fi prin introducerea unuia sau mai multor resturi de cisteină în regiunea Fc, permițând prin urmare apariția formării legăturii disulfură intercatenare în această regiune, conducând la generarea unui anticorp homodimeric care poate avea capacitate de internalizare îmbunătățită și/sau uciderea și ADCC a celulelor mediate de complement crescute (Caron, P.C. și colab. (1992) „Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies“, J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) „A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity“, J. Immunol. 148(9):2918-2922. Anticorpii homodimerici cu activitate antitumorală sporită pot fi de asemenea preparați utilizând agenți de reticulare heterobifuncționali cum s-a descris în Wolff, E.A. și colab. (1993) „Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice“, Cancer Research 53:2560-2565. Alternativ, un anticorp care are regiuni Fc duale poate fi modificat genetic și poate avea prin urmare lizări sporite ale complementului și capacității ADCC (Stevenson, G.T. și colab. (1989) „A Chimeric Antibody With Dual

Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge“, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

Perioada de înjumătățire în ser a moleculelor din prezenta divulgare care cuprind regiuni Fc poate fi crescută prin creșterea afinității de legare a regiunii Fc pentru FcRn. Termenul „perioadă de înjumătățire“ așa cum s-a utilizat în acest document înseamnă o proprietate farmacocinetică a unei molecule care este o măsură a timpului mediu de supraviețuire a moleculei după administrarea acesteia. Perioada de înjumătățire poate fi exprimată ca timpul necesar pentru a elimina cincizeci de procente (50%) ale unui cantități cunoscute de molecule din corpul subiectului (de exemplu, pacient uman sau alt mamifer) sau dintr-un compartiment specific al acestuia, de exemplu, după cum s-a măsurat în ser, adică, în perioada de înjumătățire în circulație, sau în alte țesuturi. În general, o creștere a perioadei de înjumătățire conduce la o creștere a timpului mediu de rezidență (MRT) în circulație pentru molecula administrată.

În unele cazuri, moleculele de legare la PD-1 din prezenta divulgare cuprind o regiune Fc variantă, în care respectiva regiune Fc variantă cuprinde cel puțin o modificare de aminoacid față de o regiune Fc de tip sălbatic, astfel încât respectiva moleculă are o perioadă de înjumătățire crescută (față de o regiune Fc de tip sălbatic).

În unele cazuri, moleculele de legare PD-1 din prezenta divulgare cuprind o variantă a regiunii Fc, în care respectiva variantă a regiunii Fc cuprinde o substituție de aminoacizi care extinde perioada de înjumătățire la una sau mai multe poziții selectate din grupul constând din 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, și 436. Numeroase mutații specifice capabile de creșterea perioadei de înjumătățire a unei molecule care conține o regiune Fc sunt cunoscute în domeniu și includ, de exemplu M252Y, S254T, T256E, și combinații ale acestora. De exemplu, vezi mutațiile descrise în brevetele S.U.A. numerele 6.277.375, 7.083.784; 7.217.797, 8.088.376; publicațiile de brevet U.S. numerele 2002/0147311; 2007/0148164; și publicațiile internaționale numerele WO 98/23289; WO 2009/058492; și WO 2010/033279. Moleculele care conțin regiunea Fc cu perioadă de înjumătățire sporită le includ de asemenea pe cele cu substituții la două sau mai multe din resturile regiunii Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 și 436. În particular, două sau mai multe substituții selectate dintre: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, și Y436I.

Intr-un caz specific, varianta regiunii Fc cuprinde substituții de:

- (A) M252Y, S254T și T256E;
- (B) M252Y și S254T;
- (C) M252Y și T256E;
- (D) T250Q și M428L;
- (E) T307Q și N434A;
- (F) A378V și N434A;
- (G) N434A și Y436I;
- (H) V308P și N434A; sau
- (I) K288D și H435K.

Divulgarea prezentă cuprinde suplimentar variante ale regiunii Fc cuprinzând:

- (A) una sau mai multe mutații care alterează funcțiile efectoare și/sau FcγR; și
- (B) una sau mai multe mutații care extind perioada de înjumătățire în ser.

#### **VI. Molecule de legare bispecifice PD-1 anti-umane**

Un caz din prezenta divulgare se referă la molecule de legare bispecifică care sunt capabile de legare la un „prim epitop“ și la „un al doilea epitop“, în care primul epitop este un epitop de PD-1 uman și al doilea epitop este același sau un epitop diferit de PD-1, sau este un epitop al unei alte molecule care este prezentă pe suprafața unei celule imune (cum ar fi o limfocită T) și este implicat în reglarea unui punct de control imun. Intr-un caz, al doilea epitop este un epitop de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC de clasă I sau II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 sau VISTA. Intr-un caz, al doilea epitop nu este un epitop de PD-1. Intr-un caz specific, al doilea epitop este CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT, sau TIM-3. În anumite cazuri, o moleculă bispecifică cuprinde mai mult de două situsuri de legare la epitop. Astfel de molecule bispecifice se pot lega la doi sau mai mulți epitopi diferiți ai LAG-3 și la cel puțin un epitop al unei molecule care nu este LAG-3.

Divulgarea prezentă cuprinde anticorpi bispecfici capabili de legarea simultană la PD-1 și la al doilea epitop (de exemplu B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). În unele cazuri, anticorpii bispecfici capabili de legarea simultană la PD-1 și la al doilea epitop este produs utilizând oricare dintre metodele

descrise în publicațiile PCT numerele WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, și WO 2014/022540.

#### A. Diacorpi bispecfici care nu au regiuni Fc

Un caz din prezenta divulgare se referă la diacorpi bispecfici care cuprind, și cel mai preferabil sunt compuși din, un prim lanț de polipeptidă și un al doilea lanț de polipeptidă, ale căror secvențe permit lanțurilor de polipeptide să se lege covalent unul cu celălalt pentru a forma un diacorp asociat covalent care este capabil să se lege simultan la un prim epitop și la un al doilea epitop, astfel de epitopi nefiind identici unul cu celălalt. Astfel de diacorpi bispecfici cuprind astfel domenii „VL1” / „VH1” care sunt capabile de legare la primul epitop și domenii „VL2” / „VH2” care sunt capabile de legare la al doilea epitop. Notăția „VL1” și „VH1” denotă respectiv, domeniul variabil al lanțului ușor și domeniul variabil al lanțului greu care leagă „primul” epitop al unui astfel de diacorp bispecific. În mod similar, notația „VL2” și „VH2” denotă respectiv, domeniul variabil al lanțului ușor și domeniul variabil al lanțului greu care leagă „al doilea” epitop al unui astfel de diacorp bispecific. Este irelevant dacă un epitop particular este denumit ca primul vs. al doilea epitop; astfel de notații au relevanță numai față de prezența și orientarea domeniilor catenelor de polipeptide ale moleculelor de legare din prezenta divulgare. Într-un caz, un astfel de epitop este un epitop de PD-1 și celălalt astfel de epitop nu este un epitop de PD-1 (de exemplu, un epitop de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR TIM-3, etc.).

Domeniul VL al primului lanț de polipeptidă interacționează cu domeniul VH al celui de al doilea lanț de polipeptidă pentru a forma un prim situs funcțional de legare la antigen care este specific pentru un prim antigen (adică, fie PD-1 sau fie un antigen care conține al doilea epitop). În mod asemănător, domeniul VL al celui de al doilea lanț de polipeptidă interacționează cu domeniul VH al primului lanț de polipeptidă pentru a forma un al doilea situs funcțional de legare la antigen care este specific pentru un al doilea antigen (adică, fie un antigen care conține al doilea epitop sau fie PD-1). Astfel, selecția domeniilor VL și VH ale primului și celui de al doilea lanț de polipeptide este coordonată, astfel încât cele două lanțuri de polipeptide ale diacorpului cuprind colectiv domeniile VL și VH capabile de legare la ambii un epitop de PD-1 și la un al doilea epitop (adică, ele cuprind VL<sub>PD-1</sub>/VH<sub>PD-1</sub> și VL<sub>2</sub>/VH<sub>2</sub>, în care PD-1 este „primul” epitop, sau VL<sub>1</sub>/VH<sub>1</sub> și VL<sub>PD-1</sub>/VH<sub>PD-1</sub>, în care PD-1 este „al doilea” epitop).

Primul lanț de polipeptidă al unei instanțe de astfel de diacorpi bispecfici cuprinde, în direcția de la N-terminal către C-terminal, un N-terminal, domeniul VL1 al unui anticorp monoclonal capabil de legare fie la primul sau fie la al doilea epitop (adică, fie VL<sub>PD-1</sub> sau fie VL<sub>Epitop 2</sub>), o primă peptidă distanțier de intervenție (Liant 1), un domeniu VH2 al unui anticorp monoclonal capabil de legare fie la al doilea epitop (dacă un astfel de prim lanț de polipeptidă conține VL<sub>PD-1</sub>) sau fie la primul epitop (dacă un astfel de prim lanț de polipeptidă conține VL<sub>Epitop 2</sub>), o a doua peptidă distanțier de intervenție (Liant 2) care conține opțional un rest cisteină, un domeniu de promovare al heterodimerului și un C-terminal (**Figura 1**).

Al doilea lanț de polipeptidă al acestei instanțe de diacorpi bispecfici cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal, un N-terminal, un domeniu VL2 al unui anticorp monoclonal capabil de legare fie la PD-1 sau fie la al doilea epitop (adică, fie VL<sub>PD-1</sub> sau VL<sub>Epitop 2</sub>, și domeniul VL fiind neselectat pentru includere în primul lanț de polipeptidă al diacorpului), o peptidă liant de intervenție (Liant 1), un domeniu VH1 al unui anticorp monoclonal capabil de legare fie la al doilea epitop (dacă un astfel de al doilea lanț de polipeptidă conține VL<sub>PD-1</sub>) sau fie la PD-1 (dacă un astfel de al doilea lanț de polipeptidă conține VL<sub>Epitop 2</sub>), o a doua peptidă distanțier de intervenție (Liant 2) conținând opțional un rest cisteină, un domeniu de promovare al heterodimerului, și un C-terminal (**Figura 1**).

Cel mai preferabil, lungimea peptidei liant de intervenție (de exemplu, Liantul 1) care separă astfel de domenii VL și VH este selectată pentru a preveni substanțial sau complet ca domeniile VL și VH ale lanțului de polipeptidă să se lege unul cu celălalt. Astfel domeniile VL și VH ale primului lanț de polipeptidă sunt substanțial sau complet incapabile să se lege unul cu celălalt. În mod asemănător, domeniile VL și VH ale celui de al doilea lanț de polipeptidă sunt substanțial sau complet incapabile să se lege unul cu celălalt. O peptidă distanțier de intervenție preferată (Liant 1) are secvența (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG.

Lungimea și compoziția celei de a doua peptide liant de intervenție (Linker 2) sunt selectate pe baza alegerii domeniilor de promovare ale heterodimerului. De obicei, a doua peptidă liant de intervenție (Liant 2) va cuprinde 3-20 resturi de aminoacizi. În particular, unde domeniile de promovare ale heterodimerului nu cuprind un rest cisteină, este utilizată o a doua peptidă liant de intervenție care conține cisteină (Liant 2). O a doua peptidă distanțier de intervenție care conține cisteină (Liant 2) va conține 1, 2,

3 sau mai multe cisteine. O peptidă distanțier preferată care conține cisteină (Liant 2) are secvența **SEQ ID NO:15**: GGCGGG. Alternativ, Liantul 2 nu cuprinde o cisteină (de exemplu, GGG, GGGS (**SEQ ID NO:29**), LGGSG (**SEQ ID NO:261**), GGGSGGGSGG (**SEQ ID NO:262**), ASTKG (**SEQ ID NO:30**), LEPKSS (**SEQ ID NO:33**), APSSS (**SEQ ID NO:34**), etc.) și este utilizat un domeniu care conține cisteină de promovare a heterodimerului, cum s-a descris mai jos. Opțional, sunt utilizați atât Liantul 2 care conține cisteină cât și un domeniu care conține cisteină de promovare a heterodimerului.

Domeniile de promovare ale heterodimerului pot fi GVEPKSC (**SEQ ID NO:16**) sau VEPKSC (**SEQ ID NO:17**) sau AEPKSC (**SEQ ID NO:18**) pe un lanț de polipeptidă și GFNRGEC (**SEQ ID NO:19**) sau FNRGEC (**SEQ ID NO:20**) pe celălalt lanț de polipeptidă (US2007/0004909).

Mai preferabil, totuși, domeniile de promovare ale heterodimerului ale unor astfel de diacorpi sunt formate din unul, două, trei sau patru domenii spiralate repetate în tandem de încărcări opuse care cuprind o secvență de cel puțin șase, cel puțin șapte sau cel puțin opt resturi de aminoacid astfel încât domeniul care promovează heterodimerul posedă o încărcare netă (Apostolovic, B. și colab. (2008) „pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil“, *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt, K.M. și colab. (2001) „Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain“, *J. Molec. Biol.* 312:221-228; Arndt, K.M. și colab. (2002) „Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils“, *Structure* 10:1235-1248; Boucher, C. și colab. (2010) „Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions“, *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P.J. și colab. (2004) „Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy“, *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. și colab. (2003) „Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding“, *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. și colab. (2012) „Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag“, *Protein Science* 21:511-519; Ghosh, T.S. și colab. (2009) „End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures“, *Acta Crystallografica D65*:1032-1041; Grigoryan, G. și colab. (2008) „Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions“, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483; Litowski, J.R. și colab. (2002) „Designing Heterodimeric Two-Stranded  $\alpha$ -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And  $\alpha$ -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity“, *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. și colab. (2012) „The d'-d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif“, *J. Amer. Chem. Soc.* 134(5):2626-2633; Straussman, R. și colab. (2007) „Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface“, *J. Molec. Biol.* 366:1232-1242; Tripet, B. și colab. (2002) „Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance“, *J. Molec. Biol.* 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) „The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies“, *Adv. Prot. Chem.* 70:79-112; Zeng, Y. și colab. (2008) „A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism“, *J. Gene Med.* 10:355-367).

Astfel de domenii spiralate repetate pot fi repetări exacte sau pot avea substituții. De exemplu, domeniul spiralat al domeniului de promovare al heterodimerului primului lanț de polipeptidă poate cuprinde o secvență de opt resturi de aminoacizi selectate pentru a conferi o încărcare negativă unui astfel de domeniu de promovare al heterodimerului, și domeniul spiralat al domeniului de promovare al heterodimerului celui de al doilea lanț de polipeptidă poate cuprinde o secvență de opt resturi de aminoacizi selectate pentru a conferi o încărcare pozitivă unui astfel de domeniu de promovare al heterodimerului. Este nerelevant care spiră este prevăzută la primul sau la al doilea lanț de polipeptidă, cu condiția ca o spiră de încărcare opusă să fie utilizată pentru celălalt lanț de polipeptidă. Aminoacidul încărcat pozitiv poate fi lizină, arginină, histidină, etc. și/sau aminoacidul încărcat negativ poate fi acid glutamic, acid aspartic, etc. Aminoacidul încărcat pozitiv este preferabil lizină și/sau aminoacidul încărcat negativ este preferabil acid glutamic. Este posibil să fie utilizat doar un singur domeniu de promovare al heterodimerului (deoarece un astfel de domeniu va inhiba homodimerizarea și prin urmare promovează heterodimerizarea), totuși, se preferă ca atât primul cât și cel de al doilea lanț de polipeptidă al diacorpilor din prezenta divulgare să conțină domenii de promovare ale heterodimerului.

Intr-un caz preferat, unul dintre domeniile de promovare ale heterodimerului va cuprinde patru domenii elicoidale tandem „E-spiralate“ (**SEQ ID NO:21**: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), ale căror resturi de glutamat vor forma o încărcare negativă la pH 7, în timp ce celelalte domenii de promovare ale heterodimerului vor cuprinde patru domenii tandem „K-spiralate“ (**SEQ ID NO:22**: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK), ale căror resturi de lizină vor forma o încărcare pozitivă la pH 7. Prezența unor astfel de domenii încărcate promovează asocierea între prima și

a doua polipeptidă, și plasează astfel formarea heterodimerului. În special preferat este un domeniu de promovare al heterodimerului în care unul din patru domenii elicoidale tandem „E-spiralate” din **SEQ ID NO:21** au fost modificate pentru a conține un rest de cisteină: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**). În mod asemănător, în special preferat este un domeniu de promovare al heterodimerului în care unul din patru domenii elicoidale tandem „K-spiralate” din **SEQ ID NO:22** au fost modificate pentru a conține un rest de cisteină: KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK (**SEQ ID NO:24**).

Cum s-a divulgat în WO 2012/018687, pentru a îmbunătăți proprietățile farmacocinetice *in vivo* ale diacorpilor, un diacorp poate fi modificat pentru a conține o porțiune de polipeptidă a unei proteine de legare la ser la unul sau mai multe din terminalele diacorpului. Cel mai preferabil, o astfel de porțiune de polipeptidă a unei proteine de legare la ser va fi instalată la C-terminalul diacorpului. Albumina este cea mai abundentă proteină din plasmă și are o perioadă de înjumătățire de 19 zile la oameni. Albumina posedă câteva situsuri de legare ale micromoleculelor care le permit să se lege non-covalent la alte proteine și extinzând prin urmare timpii lor de înjumătățire în ser. Domeniul 3 de legare al albuminei (ABD3) al proteinei G a tulpinii de *Streptococcus* G148 constă din 46 resturi de aminoacid care formează un pachet stabil de trei elicoide și are o largă specificitate de legare a albuminei (Johansson, M.U. și colab. (2002) „Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules”, J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. Astfel, o porțiune de polipeptidă în special preferată a unei proteine de legare la ser pentru îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice *in vivo* ale unui diacorp este domeniul de legare al albuminei (ABD) de la proteina G a streptococului, și mai preferabil, domeniul 3 de legare al albuminei (ABD3) al proteinei G a tulpinii de *Streptococcus dysgalactiae* G148 (**SEQ ID NO:25**): LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Cum s-a divulgat în WO 2012/162068, variantele „deimunizate” din **SEQ ID NO:25** au abilitatea de a atenua sau elimina legarea MHC de clasă II. Pe baza rezultatelor mutațiilor combinaționale, următoarele combinații de substituții sunt considerate a fi substituții preferate pentru formarea de astfel de ABD deimunizate: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Variantele de ABD-uri care au modificările L64A, I65A și D79A sau modificările N66S, T70S și D79A. Varianta de ABD deimunizată care are secvența de aminoacizi:

LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLID<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> A<sub>71</sub>EGVKALIDE ILAALP (**SEQ ID NO:26**), sau secvența de aminoacizi:

LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNA<sub>64</sub>A<sub>65</sub>NNAKT VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP (**SEQ ID NO:27**), sau secvența de aminoacizi:

LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP (**SEQ ID NO:28**),

este în special preferată, ca atare ABD deimunizată prezintă o legare substanțială de tip sălbatic în timp ce furnizează o legare atenuată a MHC de clasă II. Astfel, primul lanț de polipeptidă al unui astfel de diacorp având ABD conține o peptidă liant poziționată preferabil C-terminal față de domeniul E-spiralat (sau K-spiralat) al unui astfel de lanț de polipeptidă astfel încât să intervină între domeniul E-spiralat (sau K-spiralat) și ABD (care este preferabil un ABD deimunizat). O secvență preferată pentru o astfel de peptidă liant este **SEQ ID NO:29**: GGGS.

#### **B. Regiuni Fc care conțin diacorpi bispecfici**

O instanță a prezentei divulgări se referă la diacorpi bispecfici care cuprind o regiune Fc capabilă de legarea simultană la PD-1 și la un al doilea epitop (de exemplu B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Adăugarea unui domeniu IgG CH2-CH3 la unul sau ambele lanțuri de polipeptide ale diacorpului, astfel încât complexarea lanțurilor diacorpului să conducă la formarea unei regiuni Fc, creșterea perioadei de înjumătățire biologice și/sau alterarea valenței diacorpului. Incorporarea unui domeniu IgG CH2-CH3 pe ambele polipeptide ale diacorpului va permite formarea unui diacorp care conține o regiune Fc bispecifică bicatenară (**Figura 2**).

Alternativ, incorporarea unui domeniu IgG CH2-CH3 numai pe una din polipeptidele diacorpului va permite formarea unui diacorp mai complex care conține o regiune Fc bispecifică cu patru catene (**Figurile 3A-3C**). **Figura 3C** prezintă un diacorp reprezentativ cu patru catene care are domeniul ușor constant (CL) și domeniul greu constant CH1, totuși pot fi folosite alternativ fragmente de astfel de domenii precum și alte polipeptide (vezi, de exemplu, **Figurile 3A și 3B**, publicațiile de brevete din Statele Unite nr. 2013-0295121; 2010-0174053 și 2009-0060910; publicațiile de brevete europene nr. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 și publicațiile PCT nr. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Astfel, de exemplu, în loc de domeniul CH1, se poate utiliza o peptidă având secvența de aminoacizi GVEPKSC (**SEQ ID NO:16**) VEPKSC (**SEQ ID NO:17**), sau AEPKSC (**SEQ ID NO:18**), derivată din domeniul balama al unui IgG uman, și în loc de domeniul CL, se pot utiliza 6 aminoacizi ai C-terminalului lanțului ușor kapa uman, GFNRGEC (**SEQ ID NO:19**) sau FNRGEC (**SEQ ID NO:20**). O peptidă reprezentativă conținând un diacorp cu patru catene este

prezentată în **Figura 3A**. Alternativ, sau în plus, se poate utiliza o peptidă care cuprinde domenii spiralate tandem cu încărcare opusă cum ar fi domeniile elicoidale „E-spiralate” (**SEQ ID NO:21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** sau **SEQ ID NO:23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**); și domeniile „K-spiralate” (**SEQ ID NO:22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE** sau **SEQ ID NO:24: KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE**). Un domeniu spiralat reprezentativ care conține un diacorp cu patru catene este prezentat în **Figura 3B**.

Moleculele de diacorp care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare includ în general peptide liant de intervenție suplimentare (lianți). De obicei, lianții suplimentari vor cuprinde 3-20 resturi de aminoacizi. Lianții suplimentari sau alternativi care pot fi utilizați în moleculele de diacorp care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare includ: GGG (SEQ ID NO:29), LGGGSG (SEQ ID NO:261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262), ASTKG (SEQ ID NO:30), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31), EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:32), LEPKSS (SEQ ID NO:33), APSSS (SEQ ID NO:34), și APSSSPME (SEQ ID NO:35), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:36), GGC, și GGG. **SEQ ID NO:33** poate fi utilizată în loc de GGG sau GGC pentru ușurința clonării. Suplimentar, aminoacizii GGG, sau **SEQ ID NO:33** pot fi urmați imediat de **SEQ ID NO:31** până la formarea lianților alternativi: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:263); și LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:37). Molecula de diacorp care conține regiunea Fc din prezenta divulgare poate încorpora o regiune balama IgG în plus față de, sau în locul unui liant. Exemple de regiuni balama includ: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:32) de la IgG1, ERKCCVECP (SEQ ID NO:11) de la IgG2, ESKYGPPCP (SEQ ID NO:12) de la IgG4, și ESKYGPPCP (SEQ ID NO:13) o variantă balama IgG4 care cuprinde o substituție de stabilizare pentru a reduce modificarea catenei.

Cum s-a prevăzut în **Figurile 3A-3C**, diacorpul din divulgare pot cuprinde patru catene diferite. Primul și al treilea lanț de polipeptide ale unui astfel de diacorp conțin trei domenii: (i) un domeniu care conține VL1, (ii) un domeniu care conține VH2, (iii) un domeniu de promovare al heterodimerului și (iv) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide conțin: (i) un domeniu care conține VL2, (ii) un domeniu care conține VH1 și (iii) un domeniu de promovare a heterodimerului, unde domeniul de promovare al heterodimerului promovează dimerizarea primului/celui de al treilea lanț de polipeptide cu cel de al doilea/cel de al patrulea lanț de polipeptide. Domeniile VL și/sau VH ale celui de al treilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide, și domeniile VL și/sau VH ale primului și celui de al doilea lanț de polipeptide pot fi identice sau diferite astfel încât să permită legarea tetravalentă care este fie monospecifică, bispecifică sau tetraspecifică. Notarea „VL3” și „VH3” denotă respectiv, domeniul lanțului ușor variabil și domeniul lanțului greu variabil care se leagă la „al treilea” epitop al unui astfel de diacorp. În mod similar, notarea „VL4” și „VH4” denotă respectiv, domeniul lanțului ușor variabil și domeniul lanțului greu variabil care se leagă la „al patrulea” epitop al unui astfel de diacorp. Structura generală a catenei de polipeptidă a unui diacorp reprezentativ cu patru catene care conține regiunea Fc din divulgare este furnizată în **Tabelul 2**:

| <b>Tabelul 2</b>                              |              |                                           |
|-----------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------|
| Bispecific                                    | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                               | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
| Tetraspecific                                 | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                               | A 4-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL4-VH3-HPD-COOH         |
| HPD = domeniu de promovare al heterodimerului |              |                                           |

Intr-un caz specific, diacorpul din prezenta divulgare sunt bispecifici, tetravalenți (adică, posedă patru situsuri de legare la epitop), diacorpul care conțin Fc (**Figurile 3A-3C**) care sunt compuși din patru catene totale de polipeptide. Diacorpul bispecifici, tetravalenți, care conțin Fc din divulgare cuprind două situsuri de legare la epitop imunospecifice pentru PD-1 (care pot fi capabile de legare la același epitop de PD-1 sau la epitopi diferiți de PD-1), și două situsuri de legare la epitop specifice pentru un al doilea epitop (de exemplu, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

Intr-o instanță suplimentară, diacorpul bispecifici care conțin regiunea Fc pot cuprinde trei lanțuri de polipeptide. Prima polipeptidă a unui astfel de diacorp conține trei domenii: (i) un domeniu care

- conține VL1, (ii) un domeniu care conține VH2 și (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. A doua polipeptidă a unui astfel de diacorp conține: (i) un domeniu care conține VL2, (ii) un domeniu care conține VH1 și (iii) un domeniu care promovează heterodimerizarea și legarea covalentă cu primul lanț de polipeptide al diacorpului. A treia polipeptidă a unui astfel de diacorp cuprinde o secvență CH2-CH3. Astfel, primul și al doilea lanț de polipeptide ale unui astfel de diacorp se asociază împreună pentru a forma un situs de legare VL1/VH1 care este capabil de legare la primul epitop, precum și un situs de legare VL2/VH2 care este capabil de legare la al doilea epitop. Prima și a doua polipeptidă sunt legate una cu cealaltă printr-o legătură disulfură care implică resturi de cisteină în respectivele cel de al treilea lor domeniu. Notabil, primul și al treilea lanț de polipeptide complexează unul cu celălalt pentru a forma o regiune Fc care este stabilizată printr-o legătură disulfură. Astfel de diacorpi au potență sporită. **Figurile 4A și 4B** ilustrează structuri de astfel de diacorpi. Astfel de diacorpi bispecfici care conțin regiunea Fc pot avea oricare din cele două orientări (**Tabelul 3**):

| <b>Tabelul 3</b>                              |              |                                           |
|-----------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------|
| Prima orientare                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COOH             |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                               | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
| A doua orientare                              | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COOH             |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
|                                               | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
| HPD = domeniu de promovare al heterodimerului |              |                                           |

- Intr-un caz specific, diacorii din prezenta divulgare sunt bispecfici, bivalenți (adică, posedă două situsuri de legare la epitop), diacorpi care conțin Fc (**Figurile 4A-4B**) care sunt compuși din trei lanțuri totale de polipeptide. Diacorii bispecfici, bivalenți care conțin Fc din divulgare cuprind un situs de legare la epitop imunospecific pentru PD-1, și un situs de legare la epitop specific pentru un al doilea epitop (de exemplu, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

- Intr-o instanță suplimentară, diacorii bispecfici care conțin o regiune Fc pot cuprinde un total de cinci lanțuri de polipeptide. Într-o instanță particulară, două din respectivele cele cinci lanțuri de polipeptide au aceeași secvență de aminoacizi. Primul lanț de polipeptidă al unor astfel de diacorpi conține: (i) un domeniu care conține VH1, (ii) un domeniu care conține CHI, și (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. Primul lanț de polipeptidă poate fi lanțul greu al unui anticorp care conține o VH1 și o regiune constantă a lanțului greu. Al doilea și al cincelea lanț de polipeptide ale unor astfel de diacorpi conțin: (i) un domeniu care conține VL1, și (ii) un domeniu care conține CL. Al doilea și/sau al cincelea lanț de polipeptide ale unor astfel de diacorpi pot fi lanțuri ușoare ale unui anticorp care conține o VL1 complementară la VH1 a primului/celui de al treilea lanț de polipeptidă. Primul, al doilea și/sau al cincelea lanț de polipeptide pot fi izolate de anticorpii care apar natural. Alternativ, ei pot fi construiți recombinant. Al treilea lanț de polipeptidă al unor astfel de diacorpi conține: (i) un domeniu care conține VH1, (ii) un domeniu care conține CHI, (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3, (iv) un domeniu care conține VL2, (v) un domeniu care conține VH3 și (vi) un domeniu de promovare al heterodimerului, unde domeniul de promovare al heterodimerului promovează dimerizarea celui de al treilea lanț cu al patrulea lanț. A patra polipeptidă a unor astfel de diacorpi conține: (i) un domeniu care conține VL3, (ii) un domeniu care conține VH2 și (iii) un domeniu care promovează heterodimerizarea și legarea covalentă cu al treilea lanț de polipeptidă al diacorpului.

- Astfel, primul și al doilea, și al treilea și al cincelea, lanț de polipeptide ale unor astfel de diacorpi se asociază împreună pentru a forma două situsuri de legare VL1/VH1 capabile de legare la un prim epitop. Al treilea și al patrulea lanț de polipeptide ale unor astfel de diacorpi se asociază împreună pentru a forma un situs de legare VL2/VH2 care este capabil de legare la un al doilea epitop, precum și un situs de legare VL3/VH3 care este capabil de legare la un al treilea epitop. Prima și a treia polipeptidă sunt legate una cu cealaltă printr-o legătură disulfură care implică resturi de cisteină în respectivele lor regiuni constante. Notabil, primul și cel de al treilea lanț de polipeptide complexează unul cu celălalt pentru a forma o regiune Fc. Astfel de diacorpi au potență sporită. **Figura 5** ilustrează structura unor astfel de diacorpi. Se va înțelege că domeniile VL1/VH1, VL2/VH2, și VL3/VH3 pot fi identice sau diferite astfel încât să permită legarea care este monospecifică, bispecifică sau trispecifică. Totuși, cum s-a prevăzut aici, aceste domenii sunt selectate preferabil astfel încât să se lege la PD-1 și la un al doilea epitop (de exemplu, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

Domeniile VL și VH ale lanțurilor de polipeptide sunt selectate astfel încât să formeze situsuri de legare VL/VH specifice pentru un epitop dorit. Situsurile de legare VL/VH formate prin asocierea lanțurilor de polipeptide pot fi identice sau diferite astfel încât să permită legarea tetravalentă care este monospecifică, bispecifică, trispecifică sau tetraspecifică. În particular, domeniile VL și VH pot fi selectate astfel încât un diacorp bispecific să poată cuprinde două situsuri de legare pentru un prim epitop și două situsuri de legare pentru un al doilea epitop, sau trei situsuri de legare pentru un prim epitop și un situs de legare pentru un al doilea epitop, sau două situsuri de legare pentru un prim epitop, un situs de legare pentru un al doilea epitop și un situs de legare pentru un al treilea epitop (cum s-a reprezentat în **Figura 5**). Structura generală a lanțurilor de polipeptide ale diacorpilor care conțin o regiune Fc reprezentativă cu cinci lanțuri ai divulgării este furnizată în **Tabelul 4**:

| <b>Tabelul 4</b>                              |              |                                                   |
|-----------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------|
| Bispecific (2x2)                              | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH             |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH |
|                                               | A 5-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                                               | A 4-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH2-HPD-COOH                 |
| Bispecific (3x1)                              | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH             |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
|                                               | A 5-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                                               | A 4-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                 |
| Trispecific (2x1x1)                           | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH             |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH |
|                                               | A 5-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                                               | A 4-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL3-VH2-HPD-COOH                 |
| HPD = domeniu de promovare al heterodimerului |              |                                                   |

Intr-o instanță specifică, diacorpul din prezenta divulgare sunt bispecifici, tetravalenți (adică, posedă patru situsuri de legare la epitop), diacorpi care conțin Fc care sunt compuși din cinci lanțuri totale de polipeptide având două situsuri de legare pentru un prim epitop și două situsuri de legare pentru un al doilea epitop. Intr-o instanță, diacorpul bispecifici, tetravalenți, care conțin Fc, ai divulgării cuprind două situsuri de legare la epitop, imunospecifice pentru PD-1 (care pot fi capabile de legare la același epitop de PD-1 sau la epitopi diferiți de PD-1), și două situsuri de legare la epitop specifice pentru un al doilea epitop (de exemplu, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Intr-un alt caz, diacorpul bispecifici, tetravalenți, care conțin Fc, din divulgare cuprind trei situsuri de legare la epitop imunospecifice pentru PD-1 care pot fi capabile de legare la același epitop de PD-1 sau la epitopi diferiți de PD-1, și un situs de legare la epitop specific pentru un al doilea epitop (de exemplu, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Intr-o altă instanță, diacorpul bispecifici, tetravalenți, care conțin Fc, din divulgare cuprind un situs de legare la epitop imunospecific pentru PD-1, și trei situsuri de legare la epitop specifice pentru un al doilea epitop (de exemplu, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

#### C. Regiuni Fc care conțin molecule de legare trivalente bispecifice

O instanță suplimentară a prezentei divulgări se referă la molecule de legare bispecifice, trivalente, care cuprind o regiune Fc, și sunt capabile de legarea simultană la un prim epitop, la un al doilea epitop și la un al treilea epitop, în care cel puțin unul dintre acești astfel de epitopi nu este identic cu un altul. Astfel de diacorpi bispecifici cuprind astfel domeniile „VL1” / „VH1” care sunt capabile de legare la primul epitop, domeniile „VL2” / „VH2” care sunt capabile de legare la al doilea epitop și domeniile „VL3” / „VH3” care sunt capabile de legare la al treilea epitop. Intr-o instanță, unul sau doi dintre astfel de epitopi este un epitop de PD-1 și un altul (sau altul) din astfel de epitopi nu este un epitop de PD-1 (de exemplu, un epitop de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS,

KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Astfel de molecule de legare trivalente bispecifice cuprind trei situsuri de legare la epitop, din care două sunt domenii de legare de tip diacorp, care furnizează situsul de legare A și situsul de legare B, și din care unul este un domeniu de legare de tip non-diacorp, care furnizează situsul de legare C (vezi, de exemplu, **Figurile 6A-6F**, și cererile PCT nr.: PCT/US15/33081; și PCT/US15/33076).

De obicei, moleculele de legare trivalente din prezenta divulgare vor cuprinde patru lanțuri diferite de polipeptide (vezi **Figurile 6A-6B**), totuși, moleculele pot cuprinde un număr mai mic sau mai mare de lanțuri de polipeptide, de exemplu prin fuzionarea unor astfel de lanțuri de polipeptide unul cu celălalt (de exemplu, printr-o legătură peptidă) sau prin împărțirea unui astfel de lanț de polipeptide pentru a forma lanțuri suplimentare de polipeptide, sau prin asocierea a mai puține sau suplimentare lanțuri de polipeptide prin legături disulfură. **Figurile 6B-6F** ilustrează acest aspect din prezenta divulgare prin ilustrarea schematică a unor astfel de molecule având trei lanțuri de polipeptide. Cum s-a prevăzut în **Figurile 6A-6F**, moleculele de legare trivalente din prezenta divulgare pot avea orientări alternative în care domeniile de legare de tip diacorp sunt N-terminale (**Figurile 6A, 6C și 6D**) sau C-terminale (**Figurile 6B, 6E și 6F**) la o regiune Fc.

În anumite instanțe, primul lanț de polipeptide al unor astfel de molecule de legare trivalente din prezenta divulgare conține: (i) un **domeniu care conține VL1**, (ii) un **domeniu care conține VH2**, (iii) un domeniu de promovare al heterodimerului, și (iv) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. Domeniile VL1 și VL2 sunt situate N-terminal sau C-terminal la domeniul care conține CH2-CH3 cum s-a prezentat în **Tabelul 5 (Figurile 6A și 6B)**. Al doilea lanț de polipeptidă al unor astfel de cazuri conține: (i) un domeniu care conține VL2, (ii) un domeniu care conține VH1, și (iii) un domeniu de promovare al heterodimerului. Al treilea lanț de polipeptidă al unor astfel de cazuri conține: (i) un domeniu care conține VH3, (ii) un domeniu care conține CHI și (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3. Al treilea lanț de polipeptidă poate fi lanțul greu al unui anticorp care conține o VH3 și o regiune constantă a lanțului greu. A patra polipeptidă a unor astfel de cazuri conține: (i) un domeniu care conține VL3 și (ii) un domeniu care conține CL. Al patrulea lanț de polipeptide poate fi un lanț ușor al unui anticorp care conține o VL3 complementară la VH3 a celui de al treilea lanț de polipeptidă. Al treilea sau al patrulea lanț de polipeptide pot fi izolate de anticorpii care apar natural. Alternativ, ele pot fi construite recombinant, sintetic sau prin alte mijloace.

Domeniul lanțului ușor variabil al primului și celui de al doilea lanț de polipeptide sunt separate de domeniile lanțului greu variabil ale unor astfel de lanțuri de polipeptide printr-un liant distanțier de intervenție având o lungime care este prea scurtă pentru a permite domeniilor sale VL1/VH2 (sau VL2/VH1) să se asocieze împreună pentru a forma un situs de legare la epitop capabil de legare fie la primul sau fie la cel de al doilea epitop. O peptidă distanțier de intervenție preferată (Liant 1) pentru acest scop are secvența (**SEQ ID NO:14**): GGGSGGGG. Alte domenii ale moleculelor de legare trivalente pot fi separate prin una sau mai multe peptide distanțier de intervenție, care cuprind opțional un rest de cisteină. Sunt furnizate aici exemple de lianți utili pentru generarea moleculelor de legare trivalente și sunt de asemenea furnizate în cererile PCT nr.: PCT/US15/33081; și PCT/US15/33076. Astfel, primul și al doilea lanț de polipeptide ale unor astfel de molecule de legare trivalente se asociază împreună pentru a forma un situs de legare VL1/VH1 capabil de legare la un prim epitop, precum și un situs de legare VL2/VH2 care este capabil de legare la un al doilea epitop. Al treilea și al patrulea lanț de polipeptide ale unor astfel de molecule de legare trivalente se asociază împreună pentru a forma un situs de legare VL3/VH3 care este capabil de legare la un al treilea epitop. Se va înțelege că domeniile VL1/VH1, VL2/VH2, și VL3/VH3 pot fi identice sau diferite astfel încât să permită legarea care este monospecifică, bispecifică sau trispecifică.

Cum s-a descris mai sus, moleculele de legare trivalente din prezenta divulgare pot cuprinde trei polipeptide. Moleculele de legare trivalente care cuprind trei lanțuri de polipeptide pot fi obținute prin legarea domeniilor celei de a patra polipeptide N-terminale la domeniul care conține VH3 a celei de a treia polipeptidă. Alternativ, este utilizat un al treilea lanț de polipeptidă al unei molecule de legare trivalente a divulgării conținând următoarele trei domenii: (i) un domeniu care conține VL3, (ii) un domeniu care conține VH3, și (iii) un domeniu care conține o secvență CH2-CH3, în care VL3 și VH3 sunt distanțate separat una de cealaltă printr-o peptidă distanțier de intervenție care este suficient de lungă (cel puțin 9 sau mai multe resturi de aminoacizi) astfel încât să permită asocierea acestor domenii pentru a forma un situs de legare la epitop.

Se va înțelege că domeniile VL1/VH1, VL2/VH2, și VL3/VH3 pot fi identice sau diferite astfel încât să permită legarea care este monospecifică, bispecifică sau trispecifică. Totuși, cum s-a prevăzut aici, aceste domenii sunt selectate preferabil astfel încât să se lege la PD-1 și la un al doilea epitop (sau la un al doilea și al treilea epitop) (preferabil, astfel de epitopi sunt epitopi de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

In particular, domeniile VL și VH pot fi selectate astfel încât o moleculă de legare trivalentă să cuprindă două situsuri de legare pentru un prim epitop și un situs de legare pentru un al doilea epitop, sau un situs de legare pentru un prim epitop și două situsuri de legare pentru un al doilea epitop, sau un situs de legare pentru un prim epitop, un situs de legare pentru un al doilea epitop și un situs de legare pentru un al treilea epitop. Structura generală a lanțurilor de polipeptide ale moleculelor reprezentative de legare trivalente ale divulgării este prevăzută în **Figurile 6A-6F** și în **Tabelul 5**:

| <b>Tabelul 5</b>                              |              |                                                                      |
|-----------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1-a orientare cu patru catene                 | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                                    |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH  |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH      |
|                                               | A 4-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH                                         |
| A 2-a orientare cu patru catene               | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                                    |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> --VL1-VH2-HPD COOH |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH      |
|                                               | A 4-a catenă | NH <sub>2</sub> - VL3-CL-COOH                                        |
| 1-a orientare cu trei catene                  | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                                    |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH  |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH  |
| A 2-a orientare cu trei catene                | A 2-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                                    |
|                                               | 1-a catenă   | NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -VL1-VH2-HPD COOH  |
|                                               | A 3-a catenă | NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH  |
| HPD = domeniu de promovare al heterodimerului |              |                                                                      |

Un caz din prezenta divulgare se referă la molecule de legare trivalente bispecifice care cuprind două situsuri de legare la epitop pentru PD-1 și un situs de legare la epitop pentru al doilea epitop prezent pe o moleculă, altul decât PD-1 (de exemplu B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Cele două situsuri de legare la epitop pentru PD-1 pot să se lege la același epitop sau la epitopi diferiți. Altă instanță din prezenta divulgare se referă la molecule de legare trivalente bispecifice care cuprind, un situs de legare la epitop pentru PD-1 și două situsuri de legare la epitop care se leagă un al doilea antigen prezent pe o moleculă, alta decât PD-1 (de exemplu B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clasă I sau II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Cele două situsuri de legare la epitop pentru al doilea antigen se pot lega la același epitop sau la epitopi diferiți ai antigenului (de exemplu, același sau epitopi diferiți ai LAG-3). Cum s-a prevăzut mai sus, astfel de molecule de legare trivalente bispecifice pot cuprinde trei sau patru lanțuri de polipeptide.

## VII. Domenii constante și regiuni Fc

Sunt furnizate aici domenii constante ale anticorpilor utile în generarea moleculelor de legare la PD-1 (de exemplu, anticorpi, diacorpi, molecule de legare trivalente, etc.) ale divulgării.

Un domeniu CL preferat este un domeniu kappa CL IgG uman. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de domeniu kappa CL uman este (**SEQ ID NO:8**):

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

Alternativ, un exemplu de domeniu CL este un domeniu lambda CL IgG uman. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de domeniu kappa CL uman este (**SEQ ID NO:9**):

```
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS
```

Cum s-a prevăzut aici, moleculele de legare la PD-1 ale invenției pot cuprinde o regiune Fc. Regiunea Fc a unor astfel de molecule din divulgare poate fi a oricărui izotip (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, sau IgG4). Moleculele de legare la PD-1 din divulgare pot cuprinde suplimentar un domeniu CH1

și/sau o regiune balama. Când este prezent, domeniul CH1 și/sau regiunea balama pot fi ale oricăror izotipi (de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, sau IgG4), și este preferabil să fie ale aceluiași izotip ca regiunea Fc dorită.

Un exemplu de domeniu CH1 este un domeniu CH1 IgG1 uman. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de domeniu CH1 IgG1 uman este (SEQ ID NO:10):  
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Un exemplu de domeniu CH1 Domeniu este un domeniu CH1 IgG2 uman. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de domeniu CH1 IgG2 uman este (SEQ ID NO:257):  
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKTV

Un exemplu de domeniu CH1 este un domeniu CH1 IgG4 uman. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de domeniu CH1 IgG4 uman este (SEQ ID NO:254):  
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPHKPS NTKVDKRV

Un exemplu de regiune balama este o regiune balama IgG1 umană. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de regiune balama IgG1 umană este (SEQ ID NO:32): EPKSCDKTHTCPPCP.

Un alt exemplu de regiune balama este o regiune balama IgG2 umană. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de regiune balama IgG2 umană este (SEQ ID NO:11): ERKCCVECPPCP.

Un alt exemplu de regiune balama este o regiune balama IgG4 umană. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de regiune balama IgG4 umană este (SEQ ID NO:12): ESKYGPPCPSCP. Cum s-a descris aici, o regiune balama IgG4 poate cuprinde o mutație de stabilizare cum ar fi substituția S228P. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de regiune balama IgG4 stabilizată este (SEQ ID NO:13): ESKYGPPCPSCP.

Regiunea Fc a moleculelor care conțin regiunea Fc (de exemplu, anticorpi, diacorpi, și molecule trivalente) din prezenta divulgare poate fi fie o regiune Fc completă (de exemplu, o regiune Fc IgG completă) sau numai un fragment al unei regiuni Fc. Opțional, regiunii Fc a moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare îi lipsește restul de aminoacid lizină al C-terminalului. În particular, regiunea Fc a moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare poate fi o variantă a regiunii Fc modificată genetic. Deși regiunea Fc a moleculelor bispecifice care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare poate avea abilitatea de a se lega la unul sau mai mulți receptori Fc (de exemplu, FcγR(s)), mai preferabil o astfel de variantă a regiunii Fc are legare alterată la FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) sau FcγRIIB (CD16b) (față de legarea prezentată de o regiune Fc de tip sălbatic) sau va avea o abilitate substanțial redusă sau nici o abilitate de a se lega la receptori inhibitori. Astfel, regiunea Fc a moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare poate include unele sau toate dintre domeniul CH2 și/sau unele sau toate din domeniul CH3 al unei regiuni Fc complete, sau poate cuprinde o variantă a secvenței CH2 și/sau o variantă a secvenței CH3 (care poate include, de exemplu, una sau mai multe inserții și/sau una sau mai multe deleții față de domeniile CH2 sau CH3 ale unei regiuni Fc complete). Astfel de regiuni Fc pot cuprinde porțiuni de polipeptide non-Fc, sau pot cuprinde porțiuni de regiuni Fc complete non-naturale, sau pot cuprinde orientări care apar non-natural ale domeniilor CH2 și/sau CH3 (cum ar fi, de exemplu, două domenii CH2 sau două domenii CH3, sau în direcția de la N-terminal către C-terminal, un domeniu CH3 legat la un domeniu CH2, etc.).

Modificările regiunii Fc identificate ca funcții efectoare de alterare sunt cunoscute în domeniu, incluzând modificările care cresc legarea la receptori activatori (de exemplu, FcγRIIA (CD16A) și reduc legarea la receptori inhibitori (de exemplu, FcγRIIB (CD32B) (vezi, de exemplu, Stavenhagen, J.B. și colab. (2007) „Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγgamma Receptors“, Cancer Res. 57(18):8882-8890). Exemple de variante de regiuni Fc IgG1 umane cu legare redusă la CD32B și/sau legare crescută la CD16A conțin substituțiile F243L, R292P, Y300L, V305I sau P296L. Aceste substituții de aminoacizi pot fi prezente la o regiune Fc IgG1 umană în orice combinație sau sub-combinație. Într-o instanță, varianta regiunii Fc IgG1 umană conține o substituție F243L, R292P și Y300L. Într-o altă instanță, varianta regiunii Fc IgG1 umană conține substituțiile F243L, R292P, Y300L, V305I și P296L.

În particular, este de preferat ca regiunile Fc ale lanțurilor de polipeptide ale moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare să prezinte o legare scăzută (sau substanțial nici una) la FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) sau FcγRIIB (CD16b) (față de legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (SEQ ID NO:1). Variantele regiunilor Fc și formele mutante capabile de medierea unor astfel de legări alterate sunt descrise mai sus. Într-o instanță specifică, moleculele care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare cuprind o regiune Fc IgG care prezintă funcții efectoare ADCC reduse. Într-un caz preferat, domeniul CH2-CH3 al primului și/sau celui

de al treilea lanț de polipeptide ale unor astfel de molecule care conțin regiunea Fc include oricare 1, 2, sau 3, din substituțiile: L234A, L235A, N297Q, și N297G. Într-o altă instanță, varianta regiunii Fc IgG umană conține o substituție N297Q, o substituție N297G, substituțiile L234A și L235A sau o substituție D265A, pe măsură ce aceste mutații anulează legarea FcR. Alternativ, este utilizat un domeniu CH2-CH3 al unei regiuni Fc care prezintă în mod inerent o legare scăzută (sau substanțial nici una) la FcγRIIIA (CD16a) și/sau funcții efectoare reduse (față de legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Într-o instanță specifică, moleculele care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare cuprind o regiune Fc IgG2 (**SEQ ID NO:2**) sau o regiune Fc IgG4 (**SEQ ID NO:4**). Când este utilizată o regiune Fc IgG4, divulgarea prezintă cuprinde de asemenea introducerea unei mutații de stabilizare, cum ar fi substituția S228P a regiunii balama descrisă mai sus (vezi, de exemplu, **SEQ ID NO:13**). Deoarece substituțiile N297G, N297Q, L234A, L235A și D265A anulează funcțiile efectoare, în circumstanțele în care funcția efectoare este dorită, aceste substituții ar fi preferabil să nu fie utilizate.

În particular, se preferă ca regiunile Fc ale lanțurilor de polipeptide ale moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare să prezinte o perioadă crescută de înjumătățire în ser (față de perioada de înjumătățire prezentată de Fc de tip sălbatic corespunzătoare). Regiunile Fc variante și formele mutante care prezintă o perioadă extinsă de înjumătățire în ser sunt descrise mai sus. Într-o instanță preferată, domeniul CH2-CH3 al primului și/sau celui de al treilea lanț de polipeptide ale unei astfel de molecule care conține regiunea Fc include oricare 1, 2, sau 3, dintre substituțiile: M252Y, S254T și T256E. Divulgarea cuprinde suplimentar molecule care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare cuprinzând variante ale regiunii Fc care cuprind:

(A) una sau mai multe mutații care alterează funcțiile efectoare și/sau FcγR; și

(B) una sau mai multe mutații care extind perioada de înjumătățire în ser.

O secvență IgG1 preferată pentru domeniile CH2 și CH3 ale moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare va cuprinde substituțiile L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:258**):

```
APEAAGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

O secvență IgG4 preferată pentru domeniile CH2 și CH3 ale moleculelor care conțin regiunea Fc din prezenta divulgare va cuprinde substituțiile M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:259**):

```
APEFLGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

Pentru diacorpi și moleculele de legare trivalente ale căror prim și al treilea lanț de polipeptide nu sunt identice, este de dorit să reducă sau să se prevină ca homodimerizarea să apară între domeniile CH2-CH3 ale primelor două lanțuri de polipeptide sau între domeniile CH2-CH3 a două dintre cele de al treilea lanțuri de polipeptide. Domeniile CH2 și/sau CH3 ale unor astfel de lanțuri de polipeptide nu trebuie să fie identice în secvență, și sunt modificate în mod avantajos pentru a întreține complexarea între cele două lanțuri de polipeptide. De exemplu, o substituție de aminoacizi (preferabil o substituție cu un aminoacid cuprinzând o grupare laterală grupată care formează un „nod“, de exemplu, triptofan) poate fi introdusă în domeniul CH2 sau CH3 astfel încât interferența sterică va preveni interacțiunea cu un domeniu mutat în mod similar și va obliga domeniul mutat să se împerecheze cu un domeniu în care o mutație complementară, sau conciliabilă a fost modificată genetic, adică, „gaura“ (de exemplu, o substituție cu glicină). Astfel de seturi de mutații pot fi modificate genetic în orice pereche de polipeptide care cuprinde domeniile CH2-CH3 care formează o regiune Fc. Metodele de modificare genetică ale proteinei pentru a favoriza heterodimerizarea față de homodimerizare sunt bine cunoscute în domeniu, în particular față de modificarea genetică a moleculelor cum ar fi imunoglobulina, și sunt cuprinse aici (vezi de exemplu, Ridgway și colab. (1996) “‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization“, Protein Engr. 9:617-621, Atwell și colab. (1997) „Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library“, J. Mol. Biol. 270: 26-35, și Xie și colab. (2005) „A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis“, J. Immunol. Methods 296:95-101). Preferabil „nodul“ este modificat genetic în domeniile CH2-CH3 ale primului lanț de polipeptidă și „gaura“ este modificată genetic în domeniile CH2-CH3 ale celui de al treilea lanț de polipeptidă al

diacorpilor care cuprind trei lanțuri de polipeptide. Astfel, „nodul” va ajuta la prevenirea homodimerizării primului lanț de polipeptidă prin domeniile sale CH2 și/sau CH3. Deoarece al treilea lanț de polipeptidă conține preferabil substituția „gaură”, el va heterodimeriza cu primul lanț de polipeptidă precum și va homodimeriza cu el însuși. Această strategie poate fi utilizată pentru diacorpi și moleculele de legare trivalente care cuprind trei, patru sau cinci lanțuri cum s-a detaliat mai sus, unde „nodul” este modificat genetic în domeniile CH2-CH3 ale primului lanț de polipeptidă și „gaura” este modificată genetic în domeniile CH2-CH3 ale celui de al treilea lanț de polipeptidă.

Un nod preferat este creat prin modificarea unei regiuni Fc IgG pentru a conține modificarea T366W. O gaură preferată este creată prin modificarea unei regiuni Fc IgG pentru a conține modificările T366S, L368A și Y407V. Pentru a ajuta la purificarea celui de al treilea homodimer al lanțului de peptide care poartă gaura de moleculă care conține regiunea heterodimerică bispecifică finală, situsul de legare al proteinei A al domeniilor CH2 și CH3 care poartă gaura ale celui de al treilea lanț de polipeptidă este preferabil mutat prin substituție de aminoacizi în poziția 435 (H435R). Astfel, cel de al treilea homodimer al lanțului de polipeptide care poartă gaura nu se va lega la proteina A, în timp ce heterodimerul bispecific va reține abilitatea sa de a lega proteina A prin situsul de legare al proteinei A pe primul lanț de polipeptidă. Într-o instanță alternativă, cel de al treilea lanț de polipeptidă care poartă gaura poate încorpora substituții de aminoacizi în pozițiile 434 și 435 (N434A/N435K).

O secvență de aminoacizi IgG preferată pentru domeniile CH2 și CH3 ale primului lanț de polipeptidă al unei molecule care conține regiunea Fc din prezenta divulgare va avea secvența „care poartă nod” (SEQ ID NO:6):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
ALHNHYTQKS LSLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

O secvență de aminoacizi IgG1 preferată pentru domeniile CH2 și CH3 ale celui de al lanț de polipeptidă al unei molecule care conține regiunea Fc din prezenta divulgare având două lanțuri de polipeptide (sau al treilea lanț de polipeptidă al unei molecule care conține regiunea Fc având trei, patru, sau cinci lanțuri de polipeptide) va avea secvența „care poartă gaură” (SEQ ID NO:7):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME  
ALHNRYTQKS LSLSPGX

în care, X este o lizină (K) sau este absent.

După cum se va observa, domeniile CH2-CH3 din SEQ ID NO:6, și SEQ ID NO:7 includ o substituție la poziția 234 cu alanină și 235 cu alanină, și formează astfel o regiune Fc care prezintă o legare scăzută (sau substanțial nici una) la FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) sau FcγRIIIB (CD16b) (față de legarea prezentată de regiunea Fc de tip sălbatic (SEQ ID NO:1). Divulgarea cuprinde de asemenea astfel de domenii CH2-CH3, care cuprind substituții alternative și/sau suplimentare care modifică funcțiile efectoare și/sau activitatea de legare FcR a regiunii Fc. Divulgarea cuprinde de asemenea astfel de domenii CH2-CH3, care cuprind suplimentar una sau mai multe substituții de aminoacizi care extind perioada de înjumătățire. În particular, divulgarea cuprinde astfel de domenii CH2-CH3 care poartă gaură și care poartă nod, care cuprind suplimentar M252Y/S254T/T256E.

Este de preferat ca primul lanț de polipeptidă să aibă o secvență „care poartă nod”, cum ar fi cea din SEQ ID NO:6. Totuși, după cum va fi recunoscut, un domeniu CH2-CH3 „care poartă gaură” (de exemplu, SEQ ID NO:7) ar putea fi utilizat în primul lanț de polipeptidă, în care caz, un domeniu CH2-CH3 „care poartă nod” (de exemplu, SEQ ID NO:6) ar fi utilizat în al doilea lanț de polipeptidă al unei molecule care conține regiunea Fc din prezenta divulgare având două lanțuri de polipeptide (sau în al treilea lanț de polipeptidă al unei molecule care conține regiunea Fc având trei, patru, sau cinci lanțuri de polipeptide).

Cum s-a detaliat mai sus, divulgarea cuprinde molecule care conțin regiunea Fc (de exemplu, anticorpi și diacorpi care conțin regiunea Fc) având domeniile CH2 și CH3 de tip sălbatic, sau având domeniile CH2 și CH3 cuprinzând combinații dintre substituțiile descrise mai sus. Un exemplu de secvență de aminoacizi a unui domeniu CH2-CH3 IgG1 cuprinzând astfel de variații este (SEQ ID NO:260):

APEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGPSV FLFPKPKDT LX<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>RX<sub>5</sub>PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLX<sub>6</sub>CX<sub>7</sub>VK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTPPVLDG DGSFFLX<sub>8</sub>SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>YTQKS LSLSPGX<sub>11</sub>

in care:

- (a) X<sub>1</sub> și X<sub>2</sub> sunt ambele L (de tip sălbatic), sau sunt ambele A (o legare FcγR scăzută);
- (b) X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, și X<sub>5</sub> respectiv sunt M, S și T (de tip sălbatic), sau sunt Y, T și E (perioadă de înjumătățire extinsă);
- (c) X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, și X<sub>8</sub> respectiv sunt: T, L și Y (de tip sălbatic), sau sunt W, L și Y (nod), sau S, A și V (gaură);
- (d) X<sub>9</sub> și X<sub>10</sub> respectiv sunt N și H (de tip sălbatic), sau sunt N și R (fără legare la proteina A), sau A și K (fără legare la proteina A); și
- (e) X<sub>11</sub> este K sau este absent.

In alte cazuri, divulgarea cuprinde molecule de legare PD-1 care cuprind domenii CH2 și/sau CH3 care au fost modificate genetic pentru a favoriza heterodimerizarea față de homodimerizare utilizând mutații cunoscute în domeniu, cum ar fi cele divulgate în publicațiile PCT nr. WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867.

#### VIII. Molecule de legare bispecifice la PD-1 x LAG-3

Prezenta divulgare se referă în special la molecule de legare bispecifice la PD-1 x LAG-3 (de exemplu, anticorpi bispecfici, diacorpi bispecfici, etc.) cuprinzând un fragment de legare la epitop al unui anticorp anti-PD-1, și preferabil unul dintre anticorpii PD-1 anti-umani noi furnizați aici, și un fragment de legare la epitop al unui anticorp LAG-3 anti-uman, preferabil unul dintre anticorpii LAG-3 anti-umani noi furnizați aici. Moleculele de legare bispecifică PD-1 x LAG-3 preferate din prezenta divulgare posedă fragmente de legare la epitop ale anticorpilor care le permit să fie capabile să coordoneze legarea la doi epitopi diferiți: un epitop de PD-1 și un epitop de LAG-3, astfel încât să atenueze activitățile inhibitoare ale unor astfel de molecule. Așa cum s-a utilizat în acest document, o astfel de atenuare se referă la o scădere de cel puțin 20%, o scădere de cel puțin 50%, o scădere de cel puțin 80%, sau o scădere de cel puțin 90% în activitatea detectabilă PD-1 și/sau activitatea inhibitoare LAG-3, sau eliminarea completă a activității detectabile PD-1 și/sau a activității inhibitoare LAG-3. Selecția fragmentelor de legare la epitop (de exemplu, domeniile VL și VH) ale anticorpului PD-1 anti-uman și anticorpului anti-LAG-3 este coordonată astfel încât lanțurile de polipeptidă care alcătuiesc astfel de molecule de legare bispecifice PD-1 x LAG-3 să se asambleze pentru a forma cel puțin un situs funcțional de legare al antigenului care este specific pentru primul antigen (adică, PD-1 sau LAG-3) și cel puțin un situs funcțional de legare al antigenului care este specific pentru al doilea antigen (adică, PD-1 sau LAG-3, depinzând de identitatea primului antigen).

Intr-o instanță particulară, o moleculă de legare bispecifică PD-1 x LAG-3 din prezenta divulgare este un diacorp bispecific, care cuprinde preferabil două, trei, patru, sau cinci lanțuri de polipeptide cum s-a descris aici. Intr-o altă instanță particulară, o moleculă de legare bispecifică PD-1 x LAG-3 din prezenta divulgare este un anticorp bispecific, care cuprinde preferabil două, trei, sau patru lanțuri de polipeptide cum s-a descris aici (vezi de asemenea, de exemplu, WO 2007/024715; WO2007/110205; WO 2009/080251; WO 2009/080254; WO 2009/089004; WO 2011/069104; WO 2011/117329; WO 2011/131746; WO 2011/133886; WO 2011/143545; WO 2012/023053; WO 2013/060867).

#### A. Anticorpi LAG-3 anti-umani

Exemple de anticorpi care sunt imunospecfici pentru LAG-3 umani sunt furnizate mai jos. Anticorpii suplimentari doriți pot fi făcuți prin izolarea hibridoamelor care secretă anticorpi provocați utilizând LAG-3 sau un fragment de peptidă al acestuia, sau prin selecția bibliotecilor de anticorpi recombinanți pentru legare la LAG-3 sau la un fragment de peptidă al acestuia. LAG-3 uman (incluzând o secvență semnal de 28 de resturi de aminoacizi (prezentată subliniat) și proteina matură a 497 de resturi de aminoacizi) are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:38):

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL  
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT  
 VLSVGPGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA  
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV  
 HWFRNRGQGR VPVRESPPHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN  
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP  
 PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSAQAGT YTCHIHLEQ QLNTVTLAI

ITVTPKSFSGS PGSGLKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA  
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAYVFTL SSPGAQRSGR APGALPAGHL  
 LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE  
 ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

### 1. LAG-3 mAb A

Au fost descrise anticorpii LAG-3 anti-uman BMS-986016 (25F7; Medarex/BMS), denumit aici „LAG-3 mAb A”, și variantele acestuia (vezi, de exemplu, WO 2014/008218). Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului greu al LAG-3 mAb A are secvența de aminoacizi (SEQ ID

NO:39) (regiunile CDR sunt prezentate subliniate):  
 QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE  
INHNNTNSN PSLKSRVTL LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS  
DYEYNWEDPW GQGTLVTVSS

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului ușor al LAG-3 mAb A are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:40) (regiunile CDR sunt prezentate subliniate):  
 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ

GTNLEIK

Au fost recent identificați anticorpi suplimentari LAG-3 anti-umani murini care posedă caracteristici unice de legare (vezi, cererea de brevet din Statele Unite nr. 62/172.277). Moleculele de legare bispecifice PD-1 x LAG-3 preferate din prezenta divulgare cuprind fragmentele de legare la epitop ale anticorpului LAG-3 anti-uman LAG-3 mAb 1 sau LAG-3 mAb 6, anticorpi care se leagă la noi epitopi și nu concurează pentru legare la LAG-3 cu BMS-986016. În special preferate, sunt moleculele de legare bispecifice PD-1 x LAG-3 din prezenta divulgare care posedă un domeniu VH și/sau VL umanizat de LAG-3 mAb 1 sau LAG-3 mAb 6.

### 2. LAG-1 mAb 1

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:41) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate).

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCARES  
LYDYYSMDYW GQGTSTVTVSS

|                                                 |                   |
|-------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>H1</sub> a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:42): | RNYGMN            |
| CDR <sub>H2</sub> a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:43): | WINTYTGESTYADDFEG |
| CDR <sub>H3</sub> a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:44): | ESLYDYYSMDY       |

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:45) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPQGSP  
 RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKLE IK

|                                                 |                 |
|-------------------------------------------------|-----------------|
| CDR <sub>L1</sub> a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:46): | KSSQSLHSDGKTYLN |
| CDR <sub>L2</sub> a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:47): | LVSELD          |
| CDR <sub>L3</sub> a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:48): | WQGTHTFPYT      |

Două exemple de domenii VH umanizate ale LAG-3 mAb 1 denumite aici „hLAG-3 mAb 1 VH1”, și „hLAG-3 mAb 1 VH2”, și patru exemple de domenii VL umanizate ale LAG-3 mAb 1 „hLAG-3 mAb 1 VL1”, „hLAG-3 mAb 1 VL2”, „hLAG-3 mAb 1 VL3”, și „hLAG-3 mAb 1 VL4”, sunt furnizate mai jos. Oricare din domeniile VL umanizate poate fi imperecheată cu oricare din domeniile VH umanizate pentru a genera un domeniu de legare LAG-3. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul dintre domeniile VL umanizate imperecheată cu domeniul VH umanizat este referit generic ca „hLAG-3 mAb 1”, și combinațiile particulare de domenii VH/VL umanizate sunt referite prin referință la domeniile VH/VL specifice, de exemplu un anticorp umanizat care cuprinde hLAG-3 mAb 1 VH1 și hLAG-3 mAb 1 VL2 este cel referit specific ca „hLAG-3 mAb 1(1,2)”.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hLAG-3 mAb 1 VH1 (SEQ ID NO:49) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES  
LYDYYSMDYW GQGTITVTVSS

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hLAG-3 mAb 1 VH2 (SEQ ID NO:50) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCARES  
LYDYYSMDYW GQGTITVTVSS

5 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO:51) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP  
YTFGGGTKVE IK

10 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL2 (SEQ ID NO:52) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP  
YTFGGGTKVE IK

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO:53) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP  
YTFGGGTKVE IK

15 Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL4 (SEQ ID NO:54) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniat):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP  
YTFGGGTKVE IK

20 CDR<sub>L1</sub> a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL4 cuprinde o substituție de aminoacizi de alanină cu glicină și are secvența de aminoacizi: KSSQSLHSDAKTYLN (SEQ ID NO:55), alanina substituție este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>L1</sub> ale LAG-3 mAb 1 descrise mai sus.

### 3. LAG-3 mAb 6

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:56) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniat):

EVLLQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD  
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREEA  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

25

|                                                 |                          |
|-------------------------------------------------|--------------------------|
| CDR <sub>H1</sub> a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:57): | <u>DYNMD</u>             |
| CDR <sub>H2</sub> a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:58): | <u>DINPDNGVTIYNQKFEG</u> |
| CDR <sub>H3</sub> a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:59): | <u>EADYFYFDY</u>         |

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:60) este prezentată mai jos (resturile CDR sunt prezentate subliniat):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKKASQDVS SVVAWYQQKP GQSPKLLIFS  
ASYRYTGVDP RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIK

|                                                 |                   |
|-------------------------------------------------|-------------------|
| CDR <sub>L1</sub> a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:61): | <u>KASQDVSSWA</u> |
| CDR <sub>L2</sub> a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:62): | <u>SASYRYT</u>    |
| CDR <sub>L3</sub> a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:63): | <u>HYSTPWT</u>    |

30

Două exemple de domenii VH umanizate ale LAG-3 mAb 6 denumite aici ca „hLAG-3 mAb 6 VH1“, și „hLAG-3 mAb 6 VH2“, și două exemple de domenii VL umanizate ale LAG-3 mAb 6 „hLAG-3 mAb 1 VL1“, și „hLAG-3 mAb 1 VL2“, sunt furnizate mai jos. Oricare din domeniile VL umanizate poate fi imperecheat cu oricare din domeniile VH umanizate pentru a genera un domeniu de

legare LAG-3. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul din domeniile VL umanizate împerecheat cu domeniul VH umanizat este referit generic ca „hLAG-3 mAb 6”, și combinațiile particulare de domenii VH/VL umanizate sunt referite prin referire la domeniile VH/VL specifice, de exemplu un anticorp umanizat care cuprinde hLAG-3 mAb 6 VH1 și hLAG-3 mAb 6 VL2 este cel la care se face referire specific ca „hLAG-3 mAb 6(1,2)”.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hLAG-3 mAb 6 VH1 (SEQ ID NO:294) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD  
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREEA  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

O secvență de aminoacizi a domeniului VH al hLAG-3 mAb 6 VH2 (SEQ ID NO:295) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD  
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREEA  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 6 VL1 (SEQ ID NO:296) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIK

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 6 VL2 (SEQ ID NO:297) este prezentată mai jos (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPD RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIK

CDR<sub>L1</sub> a domeniului VL al hLAG-3 mAb 6 VL1 și VL2 cuprinde o substituție de aminoacizi arginină cu lizină și are secvența de aminoacizi: RASQDVSSWA (SEQ ID NO:298), arginina substituită este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR<sub>L1</sub> ale LAG-3 mAb 6 descrise mai sus.

#### B. Exemple de diacorpi având spirale E/K, care conțin regiunea Fc cu patru lanțuri

Au fost generate patru exemple de diacorpi PD-1 X LAG-3 bispecifice, care conțin regiunea Fc cu patru lanțuri, cuprinzând domenii de promovare ale heterodimerului cu spirale E/K (denumiți „DART A”, „DART B”, „DART C”, și „DART I”). Structura acestor diacorpi care conțin regiunea Fc este detaliată mai jos. Aceste exemple de diacorpi PD-1 x LAG-3 intenționează să ilustreze, dar nu într-o manieră limitativă, domeniul divulgării.

##### 1. DART A

DART A este un diacorp bispecific, cu patru lanțuri, care conține regiunea Fc având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, o variantă a regiunii Fc IgG4 modificată genetic pentru o perioadă de înjumătățire extinsă, și domeniile de promovare ale heterodimerului cu spirale E/K care conțin cisteină. Primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART A cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal, un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1**: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2**: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); un domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat) care conține cisteină (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); o regiune balama IgG4 stabilizată (SEQ ID NO:13); o variantă a domeniului CH2-CH3 IgG4 cuprinzând substituțiile M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:259); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART A este o variantă din SEQ ID NO:267:

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDX<sub>1</sub>KTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC  
 EKEVAALEKE VAALKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP  
 KPKDTLX<sub>2</sub>IX<sub>3</sub>R X<sub>4</sub>PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKFREEQ  
 FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP  
 PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL

G

in care X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> și X<sub>4</sub> sunt selectați în mod independent, și în care X<sub>1</sub> este A sau G; X<sub>2</sub> este Y sau M; X<sub>3</sub> este T sau S; și X<sub>4</sub> este E sau T.

Secvențele de aminoacizi ale primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART A sunt **SEQ ID NO:267**, in care X<sub>1</sub> este A; X<sub>2</sub> este Y; X<sub>3</sub> este T; și X<sub>4</sub> este E.

Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide ale DART A cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal, un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)**); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO:49**); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2: GCGGGG (SEQ ID NO:15)**); un domeniu de promovare al heterodimerului (K-spiralat) care conține cisteină (KVAACK-EKVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:24**); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART A este (**SEQ ID NO:268**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYFTFN  
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL  
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAC

KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

## 2. DART B

DART B este identic cu DART A, cu excepția faptului că primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART B cuprind domeniul VL al hLAG-3 mAb 1 VL3 (**SEQ ID NO:53**), care cuprinde o substituție de aminoacizi in CDR<sub>L</sub>1. Astfel, primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART B cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL3) (**SEQ ID NO:53**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)**); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 2: GCGGGG (SEQ ID NO:15)**); un domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat) care conține cisteină (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**)); o regiune balama IgG4 stabilizată (**SEQ ID NO:13**); o variantă a domeniului CH2-CH3 IgG4 cuprinzând substituțiile M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (**SEQ ID NO:259**); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART B este **SEQ ID NO:267**, in care X<sub>1</sub> este G; X<sub>2</sub> este Y; X<sub>3</sub> este T; și X<sub>4</sub> este E.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART B este **SEQ ID NO:268**.

## 3. DART C

DART C este identic cu DART B, cu excepția faptului că primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART B cuprind un domeniu CH2-CH3 IgG4 de tip sălbatic care nu are resturi C-terminale (**SEQ ID NO:4**). Astfel, primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART C cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal, un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL3) (**SEQ ID NO:53**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)**); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 2: GCGGGG (SEQ ID NO:15)**); un domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat) care conține cisteină (EVAACEK - EVAALEK - EVAALEK - EVAALEK (**SEQ ID NO:23**)); o regiune balama IgG4 stabilizată (**SEQ ID NO:13**); un domeniu CH2-CH3 IgG4 care nu are resturi C-terminale (**SEQ ID NO:4**); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART C este **SEQ ID NO:267**, în care  $X_1$  este G;  $X_2$  este M;  $X_3$  este S; și  $X_4$  este T.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART C este **SEQ ID NO:268**.

#### 5 4. DART I

DART I este un diacorp bispecific, cu patru lanțuri, care conține regiunea Fc, având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, o variantă a regiunii Fc IgG4 modificată genetic pentru o perioadă de înjumătățire extinsă, și domenii de promovare ale heterodimerului spiralate E/K care conțin cisteină. Primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART I cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal, un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 ( $VL_{LAG-3}$  hLAG-3 mAb 6 VL1) (**SEQ ID NO:296**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 ( $VH_{PD-1}$  hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO:15**)); un domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat) care conține cisteină (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:23**)); o regiune balama IgG4 stabilizată (**SEQ ID NO:13**); o variantă a domeniului CH2-CH3 IgG4 cuprinzând substituțiile M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (**SEQ ID NO:259**); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART I este (**SEQ ID NO:290**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
ASYRYTGVPs RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG  
GTKLEIKGGG SGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCAS GYSFTSYWMN  
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS  
LRSEDIAYYY CAREHYGTSP FAYWGQGLTV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA  
ALEKEVALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT  
LYITREPEVT CVVVDVDSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY  
RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT  
LPDSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDs  
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG

Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide ale DART I cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal, un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 ( $VL_{PD-1}$  hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 ( $VH_{LAG-3}$  hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO:294**); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO:15**)); un domeniu de promovare al heterodimerului (K-spiralat) care conține cisteină (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:24**)); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART I este (**SEQ ID NO:291**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSEFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD  
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVMT TDTSTSTAYM  
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TLTIVSSGGC GGGKVAACEK  
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

#### C. Exemple de diacorpi care conțin regiunea Fc cu patru lanțuri, care au domenii CL/CH1

Au fost generate patru exemple de diacorpi PD-1 X LAG-3 bispecifici, care conțin regiunea Fc cu patru lanțuri, care cuprind domeniile CL/CH1 denumiți „DART D“, „DART E“, „DART J“ și „DART I“. Structura acestor diacorpi care conțin regiunea Fc este detaliată mai jos. Aceste exemple de diacorpi PD-1 x LAG-3 intenționează să ilustreze, dar într-o manieră nelimitativă, domeniul divulgării.

##### 1. DART D

DART D este diacorp bispecific, cu patru lanțuri, care conține regiunea Fc având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, domeniile CL/CH1, și o variantă a regiunii Fc IgG4 modificată genetic pentru o perioadă de înjumătățire extinsă. Primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART D cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 ( $VL_{PD-1}$  hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO:153**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO:14**)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 ( $VH_{LAG-3}$  hLAG-3 mAb 1

VH1) (SEQ ID NO:49); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CH1 IgG4 (SEQ ID NO:254); o regiune balama IgG4 stabilizată (SEQ ID NO: 13); o variantă a unui domeniu CH2-CH3 IgG4 cuprinzând substituțiile M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:259); și un C-terminal.

- 5 Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART D este (SEQ ID NO:269):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYFTFN

YGMNWRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL  
QISSLKAEED AVYYCARESL YDYYSM DYWG QGTTVTVSSL GGGSGASTKG  
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP  
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF  
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVSV LTVLHQDWLN GKEYCKKVS  
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCVKGFYPS  
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC  
SVMHEALHNH YTKSLSLSL G

- 10 Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide ale DART D cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CL kapa (SEQ ID NO:8); și un C-terminal.

15 Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART D este (SEQ ID NO:270):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSL L HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHF  
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGRTVAA  
PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES  
VTEQDSKDST YSLSSLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG  
EC

## 2. DART E

- 20 DART E este un alt diacorp bispecific, cu patru lanțuri, care conține regiunea Fc având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, domeniile CL/CH1, și o variantă a regiunii Fc IgG4 modificată genetic pentru o perioadă de înjumătățire extinsă. Poziția situsurilor de legare PD-1 și LAG-3 ale DART E este inversată în comparație cu DART D.

- 25 Primul și al treilea lanț de polipeptidă ale DART E cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal, un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CH1 IgG4 (SEQ ID NO:254); o regiune balama IgG4 stabilizată (SEQ ID NO: 13); o variantă a unui domeniu CH2-CH3 IgG4 care cuprinde substituțiile M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:259); și un C-terminal.

30 Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART E este (SEQ ID NO:271):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLTVVSSL GGGSGASTKG  
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP  
 CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF  
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN  
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC  
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide ale DART E cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CL Kapa (SEQ ID NO:8), și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART E este (SEQ ID NO:272):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYFTFN  
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL  
 QISSLKAEED AVYYCARESL YDYYSMYDWG QGTLTVVSSL GGGSGRTVAA  
 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES  
 VTEQDSKDSY YLSSTLTLS KADYKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG

EC

### 3. DART J

DART J este un diacorp bispecific, cu patru lanțuri, care conține regiunea Fc având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, domeniile CL/CH1, și o variantă a regiunii Fc IgG4 modificată genetic pentru o perioadă de înjumătățire extinsă. Primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART J cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 6 VL1) (SEQ ID NO:296); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CH1 IgG4 (SEQ ID NO:254); o regiune balama IgG4 stabilizată (SEQ ID NO: 13); o variantă a unui domeniu CH2-CH3 IgG4 care cuprinde substituțiile M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:259); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART J este (SEQ ID NO:292):

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDVS SVVAWYQQKPKAPKLLIYS  
 ASYRYTGVPV RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN  
 WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS  
 LRSEDITAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLTV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP  
 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP  
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CTVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSLG

Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide ale DART J cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1

(VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 6 VH1) (SEQ ID NO:294); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CL Kapa (SEQ ID NO:8); și un C-terminal.

5 Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART J este (SEQ ID NO:293):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVMTT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSLGG GSGRTVAAPS
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
```

#### 4. DART 1

10 DART 1 este un diacorp bispecific, cu patru lanțuri, care conține regiunea Fc având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, domeniile CL/CH1, și o regiune Fc IgG1 variantă modificată genetic pentru legare FcγR redusă. Primul și al treilea lanț de polipeptide ale DART 1 cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> PD-1 mAb A VL) (SEQ ID NO:65); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> LAG-3 mAb A VH1) (SEQ ID NO:39); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CH1 IgG1 (SEQ ID NO:10); o regiune balama IgG1 (SEQ ID NO: 32); o variantă a unui domeniu CH2-CH3 IgG1 cuprinzând substituțiile L234A/L235A și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:5); și un C-terminal.

20 Secvența de aminoacizi a primului și celui de al treilea lanț de polipeptide ale DART 1 este (SEQ ID NO:284):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSSS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
GTNLEIKGGG SGGGQVQLV ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
WVRQAPGKGL EWVAWIYDYG SKRYADSVK GRFTISRDNK KNTLFLQMNS
LRAEDTAVYY CATNDYWGQ GTLVTVSSLG GSGGASTKGP SVFPLAPSSK
STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLN
SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE
AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSLKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
NHYTQKSLSL SPG
```

25 Al doile și al patrulea lanț de polipeptide ale DART 1 cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> LAG-3 mAb A VL) (SEQ ID NO:40); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> PD-1 mAb A VH) (SEQ ID NO:64); o peptidă liant de intervenție (Liant 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); un domeniu CL Kapa (SEQ ID NO:8); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART 1 este (SEQ ID NO:285):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSTLCAVY GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRVS
TAADTAVYYC AFGYSDEYN WFDWPWGQTL VTVSSLGGGS GRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
30 DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

#### D. Exemple de diacorpi care conțin regiunea Fc cu cinci lanțuri

Au fost generate două exemple de diacorpi PD-1 X LAG-3 bispecfici, care conțin regiunea Fc cu cinci lanțuri, care cuprind domeniile CL/CH1 și domeniile de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate denumiți „DART F”, și „DART G”. Structura acestor diacorpi care conțin regiunea Fc este

detaliată mai jos. Aceste exemple de diacorpi PD-1 x LAG-3 intenționează să ilustreze, dar nu într-o manieră limitativă, domeniul divulgării.

### 1. DART F

DART F este un diacorp bispecific, cu cinci lanțuri, care conține regiunea Fc care are trei situsuri de legare specifice pentru PD-1, un situs de legare specific pentru LAG-3, domeniile CL/CH1, o variantă a regiunii Fc IgG1 care poartă nod/gaură modificată genetic pentru legare FcγR redusă și perioadă de înjumătățire extinsă, și domenii de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate. Primul lanț de polipeptide al DART F cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); un domeniu CH1 IgG1 (**SEQ ID NO:10**); o regiune balama IgG1 (**SEQ ID NO:32**); un domeniu CH2-CH3 IgG1 care poartă gaură cuprinzând substituțiile L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K și care nu are resturi C-terminale

(**SEQ ID NO:260**, în care X<sub>1</sub> este A, X<sub>2</sub> este A; X<sub>3</sub> este Y, X<sub>4</sub> este T, X<sub>5</sub> este E, X<sub>6</sub> este S, X<sub>7</sub> este A, X<sub>8</sub> este V, X<sub>9</sub> este A, X<sub>10</sub> este K, și X<sub>11</sub> este absent); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului lanț de polipeptide al DART F este (**SEQ ID NO:273**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTSLVTSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHNKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
DSDGSFFLVLS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG

Al doilea și al cincelea lanț de polipeptide ale DART F cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**), un domeniu CL Kapa (**SEQ ID NO:8**), și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și a celui de al cincelea lanț de polipeptide ale DART F este (**SEQ ID NO:274**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLV STLTLSKADY EKHVKYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC

Al treilea lanț de polipeptide al DART F cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); un domeniu CH1 IgG1 (**SEQ ID NO:10**); o regiune balama IgG1 (**SEQ ID NO:32**); un domeniu CH2-CH3 IgG1 care poartă nod cuprinzând substituțiile L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (**SEQ ID NO:260**, în care X<sub>1</sub> este A, X<sub>2</sub> este A; X<sub>3</sub> este Y, X<sub>4</sub> este T, X<sub>5</sub> este E, X<sub>6</sub> este W, X<sub>7</sub> este L, X<sub>8</sub> este Y, X<sub>9</sub> este N, X<sub>10</sub> este H, și X<sub>11</sub> este absent); o peptidă liant de intervenție (GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:262**)); un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1**: GGGSGGG (**SEQ ID NO:14**)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină

(**Liant 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO:15**)); un domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:21**)); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al treilea lanț de polipeptidă a DART F este (**SEQ ID NO:275**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
 YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY  
 ICNVNHNKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
 DTLYITREPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
 TYRVSVSLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
 YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV  
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG  
 GSGGSGGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI SCKSSQSLH SDAKTYLNWL  
 LQKPGQPPER LIYLVSELDG GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDVGVY  
 YCWQGTHTFPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS  
 CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT  
 VDKSTSTAYM ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG  
 CGGGEVAAL KEVAALKEV AALEKEVAAL EK

Al patrulea lanț de polipeptidă al DART F cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1:** GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2:** GGCGGG (SEQ ID NO:15)); un domeniu de promovare al heterodimerului (K-spiralat) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al patrulea lanț de polipeptide ale DART F este (SEQ ID NO:276):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN  
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASTAYL  
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL  
 KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

## 2. DART G

DART G este un diacorp bispecific, cu cinci lanțuri, care conține regiunea Fc având două situsuri de legare specifice pentru PD-1, două situsuri de legare specifice pentru LAG-3, domeniile CL/CH1, o variantă a regiunii Fc IgG1 care poartă nod/gaură modificată genetic pentru legare FcγR redusă și perioadă de înjumătățire extinsă, și domenii de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate. Primul lanț de polipeptidă al DART G cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); un domeniu CH1 IgG1 (SEQ ID NO:10); o regiune balama IgG1 (SEQ ID NO:32); un domeniu CH2-CH3 IgG1 care poartă gaură cuprinzând substituțiile L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:260, în care X<sub>1</sub> este A, X<sub>2</sub> este A, X<sub>3</sub> este Y, X<sub>4</sub> este T, X<sub>5</sub> este E, X<sub>6</sub> este S, X<sub>7</sub> este A, X<sub>8</sub> este V, X<sub>9</sub> este A, X<sub>10</sub> este K, și X<sub>11</sub> este absent); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului lanț de polipeptide al DART G este (SEQ ID NO:277):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES  
 LYDYYSMYDW GQTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPVAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
 YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKPK  
 KDTLYITREP EVTCVVDVSH HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
 STYRVSVSLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
 VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV  
 LDSGGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG

Al doilea și al cincelea lanț de polipeptide ale DART G cuprind, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54), un domeniu CL Kapa (SEQ ID NO:8), și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea și a celui de al cincelea lanț de polipeptide ale DART G este (SEQ ID NO:278):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTF  
YTFGGGKTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

- Al treilea lanț de polipeptide al DART G cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal:
- 5 un N-terminal; un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); un domeniu CH1 IgG1 (SEQ ID NO:10); o regiune balama IgG1 (SEQ ID NO:32); un domeniu CH2-CH3 IgG1 care poartă nod cuprinzând substituțiile L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E și care nu are resturi C-terminale (SEQ ID NO:260, în care X<sub>1</sub> este A, X<sub>2</sub> este A; X<sub>3</sub> este Y, X<sub>4</sub> este T, X<sub>5</sub> este E, X<sub>6</sub> este W, X<sub>7</sub> este L, X<sub>8</sub> este Y, X<sub>9</sub> este N, X<sub>10</sub> este H, și X<sub>11</sub> este absent); o peptidă liant de intervenție (GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262)); un domeniu VL
- 10 al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (Liant 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); un domeniu de promovare a heterodimerului (E-spiralat) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); și un
- 15 C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al treilea lanț de polipeptide al DART G este (SEQ ID NO:279):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES  
LYDYYSM DYW GQGTITVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP  
KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV  
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG  
GGSGGGSGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF  
QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY  
FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS  
CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT  
VDKSTSTAYM ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG  
CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

- Al patrulea lanț de polipeptide al DART G cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); o peptidă liant de intervenție (Liant 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (Liant 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); un domeniu de promovare al heterodimerului (K-spiralat) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); și un C-terminal.
- 25

Secvența de aminoacizi a celui de al patrulea lanț de polipeptide al DART G este (SEQ ID NO:280):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGKTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS  
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT VDKSTSTAYM  
ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK  
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

- 30 **E. Exemple de diacorpi care conțin regiunea Fc cu trei lanțuri având spirale E/K**

Prezenta divulgare furnizează suplimentar diacorpi PD-1 X LAG-3 bispecfici, care conțin regiunea Fc cu trei lanțuri, cuprinzând domenii de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate. A fost generat un exemplu de diacorp PD-1 X LAG-3 bispecific, care conține regiunea Fc cu trei lanțuri, cuprinzând domenii de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate denumit „DART H”. Structura

acestui diacorp care conține regiunea Fc este detaliată mai jos. Acest exemplu de diacorp PD-1 x LAG-3 intenționează să ilustreze, dar nu într-o manieră limitativă, domeniul divulgării.

DART H este un diacorp bispecific, cu trei lanțuri, care conține regiunea Fc având un situs de legare specific pentru PD-1, un situs de legare specific pentru LAG-3, o variantă a regiunii Fc IgG1 care poartă nod/gaură modificată genetic pentru legare FcγR redusă, și domenii de promovare ale heterodimerului E/K-spiralat.

Primul lanț de polipeptide al DART H cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1:** GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2:** GGCGGG (SEQ ID NO:15)); un domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); un liant de intervenție (**Distanțier-Liant 3:** GGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:263)); un domeniu CH2-CH3 IgG1 care poartă nod cuprinzând substituțiile L234A/L235A și având restul de lizină C-terminal (SEQ ID NO:6); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului lanț de polipeptide al DART H este (SEQ ID NO:281):  
 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN  
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASTAYL  
 QISSLKAEEDT AVYYCARESL YDYYSM DYWG QGTTVT TVSSG GCGGGEVAAL  
 EKEVAALEKE VAALKEKVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
 PGK

Al doilea lanț de polipeptide al DART H cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); o peptidă liant de intervenție (**Liant 1:** GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); o peptidă liant de intervenție care conține cisteină (**Liant 2:** GGCGGG (SEQ ID NO:15)); un domeniu de promovare al heterodimerului (K-spiralat) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea lanț de polipeptidă al DART H este (SEQ ID NO:282):  
 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTF  
 YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVT TVSSG GCGGKVAAL  
 KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

Al treilea lanț de polipeptide al DART H cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; o regiune balama (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31); un domeniu CH2-CH3 IgG1 care poartă gaură cuprinzând substituțiile L234A/L235A și având retul de lizină C-terminal (SEQ ID NO:7); și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al treilea lanț de polipeptide al DART H este (SEQ ID NO:283):  
 DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK  
 GFYPDIHAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDSD DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
 NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGK

#### F. Exemple de anticorp bispecific

A fost generat un exemplu de anticorp bispecific PD-1 X LAG-3 cu patru lanțuri denumit „BSAB A”. Structura acestui anticorp bispecific este detaliată mai jos. Acest exemplu de anticorp bispecific PD-1 x LAG-3 intenționează să ilustreze, dar nu într-o manieră limitativă, domeniul divulgării.

BSAB A este un anticorp bispecific care are un situs de legare specific pentru PD-1, un situs de legare specific pentru LAG-3, o variantă a regiunii Fc IgG1 modificată genetic pentru a reduce legarea FcγR și pentru a întreține complexarea între cele două polipeptide diferite ale lanțului greu (vezi, de exemplu, WO 2011/143545).

- 5 Primul lanț de polipeptide al BSAB A cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); un domeniu CH1 IgG1 (SEQ ID NO:10); o variantă a regiunii balama IgG1 cuprinzând substituțiile D221E/P228E (numerotate prin indicele EU ca în Kabat și subliniate în SEQ ID NO:286, mai jos); o variantă a domeniului CH2-CH3 IgG1 cuprinzând substituțiile
- 10 L234A/L235A/L368E (subliniate în SEQ ID NO:286, mai jos) și care nu are resturile C-terminale; și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a primului lanț de polipeptide al BSAB A este (SEQ ID NO:286):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHNKPSN TKVDKRVEPK SCEKTHTCPE CPAPEAAAGP SVFLFPPKPK  
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
YTLPPSREEM TKNQVSLTCE VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV  
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

- 15 Al doilea lanț de polipeptide al BSAB cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO: 153); un domeniu CL Kapa (SEQ ID NO:8), și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al doilea lanț de polipeptide al BSAB este (SEQ ID NO:287):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASEVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC

- 20 Al treilea lanț de polipeptide al BSAB A cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VH al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); un domeniu CH1 IgG1 (SEQ ID NO:10); o variantă a regiunii balama IgG1 cuprinzând substituțiile D221R/P228R (subliniate în SEQ ID NO:288, mai jos); o variantă a domeniului CH2-CH3 IgG1 cuprinzând substituțiile L234A/L235A/L409R (subliniate în SEQ ID NO:288, mai jos) și care nu are resturi C-terminale; și un C-terminal.

- 25 Secvența de aminoacizi al celui de al treilea lanț de polipeptide al BSAB A este (SEQ ID NO:288):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES  
LYDYYSMDYW GQGTITVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPVAVLQSS GLYSLSVSVT VPSSSLGTQT  
YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAAG PSVFLFPPKPK  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

- 30 Al patrulea lanț de polipeptide al BSAB A cuprinde, în direcția de la N-terminal spre C-terminal: un N-terminal; un domeniu VL al unui anticorp monoclonal capabil de legare la LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); un domeniu CL Kapa (SEQ ID NO:8), și un C-terminal.

Secvența de aminoacizi a celui de al patrulea lanț de polipeptide al BSAB A este (SEQ ID NO:289):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 YTFGGGKTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
 VTHQGLSSPV TKSFNREGC

## IX. Anticorpi de referință

### A. Anticorpi de referință PD-1 anti-umani

Pentru a evalua și caracteriza noile molecule de legare PD-1 anti-umane din prezenta divulgare, au fost utilizați următorii anticorpi de referință: nivolumab (cunoscut de asemenea ca 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, și comercializat ca OPDIVO® de Bristol-Myers Squibb), un anticorp IgG4 uman denumit aici ca „PD-1 mAb A;” și pembrolizumab (cunoscut anterior ca lambrolizumab, cunoscut de asemenea ca MK-3475, SCH-900475, și comercializat ca KEYTRUDA® de Merck) un anticorp IgG4 umanizat denumit aici ca „PD-1 mAb B“.

#### 1. Nivolumab („PD-1 mAb A“)

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului greu al PD-1 mAb A are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:64) (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):  
 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV  
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND  
DYWGQGTLLV TSS

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului ușor al PD-1 mAb A are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:65) (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):  
 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ  
 GTKVEIK

#### 2. Pembrolizumab („PD-1 mAb B“)

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului greu al PD-1 mAb B are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:66) (resturile CDR<sub>H</sub> sunt prezentate subliniate):  
 QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG  
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD  
YRFDMGFDFY W GQGTTVTSS

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului ușor al PD-1 mAb B are secvența de aminoacizi (SEQ ID NO:67) (resturile CDR<sub>L</sub> sunt prezentate subliniate):  
 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL  
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL  
TFGGGGTKVEIK

## X. Metode de producție

O polipeptidă PD-1 anti-umană, și alți agoniști, antagoniști și modulatori PD-1 pot fi creați din polinucleotide și/sau secvențe de anticorpi anti-PD-1, PD-1 mAb 1-15, prin metode cunoscute în domeniu, de exemplu, sintetic sau recombinant. O metodă pentru producerea unor astfel de agoniști, antagoniști și modulatori de peptide implică sinteza chimică a polipeptidei, urmată de tratament sub condiții adecvate de oxidare pentru a obține conformația nativă, care este, adică legăturile corecte de legături disulfură. Acest lucru poate fi realizat utilizând metodologii bine cunoscute celor calificați în domeniu (vezi, de exemplu, Kelley, R. F. și colab. (1990) în: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pag. 1-19; Stewart, J.M și colab. (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chimic Co., Rockford, IL; vezi de asemenea brevetele din Statele Unite nr. 4.105.603; 3.972.859; 3.842.067; și 3.862.925).

Polipeptidele din divulgare pot fi preparate convenabil utilizând sinteza peptidei în fază solidă (Merrifield, B. (1986) „Solid Phase Synthesis“, Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) „General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) „Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century“, Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

În încă o altă alternativă, anticorpii complet umani având una sau mai multe din regiunile CDR ale PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15, sau care concurează cu PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15, pentru legare la PD-1 uman sau la o formă solubilă a acestuia, pot fi obținuți prin utilizarea șoarecilor disponibili comercial care au fost modificați genetic

pentru a exprima specific proteinele de imunoglobulină umană. Animalele transgenice care sunt concepute pentru a produce un răspuns imun mai dorit (de exemplu, anticorpi complet umani) sau mai robust pot fi de asemenea utilizate pentru generarea de anticorpi umanizați sau umani. Exemple de astfel de tehnologii sunt XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) și HUMAB-MOUSE® și TC

5 MOUSE™ (ambele de la Medarex, Inc., Princeton, NJ).

Intr-o alternativă, anticorpul pot fi făcuți recombinant și exprimați utilizând orice metodă cunoscută în domeniu. Anticorpul pot fi făcuți recombinant prin izolarea prima dată a anticorpilor făcuți din animale gazdă, obținând secvența genică, și utilizând secvența genică pentru a exprima anticorpul recombinant în celule gazdă (de exemplu, celule CHO). O altă metodă care poate fi utilizată este de a exprima secvența anticorpului în plante (de exemplu, tutun) sau lapte transgenic. Metodele adecvate pentru exprimarea anticorpilor recombinanți în plante sau lapte au fost divulgate (vezi, de exemplu, Peeteri și colab. (2001) „Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants“, Vaccine 19:2756; Lonberg, N. și colab. (1995) „Human Antibodies From Transgenic Mice“, Int. Rev. Immunol 13:65-93; și Pollock și colab. (1999) „Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies“, J. Immunol Methods 231:147-157). Metodele adecvate pentru fabricarea derivaților de anticorpi, de exemplu, umanizați, monocatenari, etc. sunt cunoscute în domeniu. Intr-o altă alternativă, anticorpul pot fi făcuți recombinant prin tehnologie de afișare pe bacteriofagi (vezi, de exemplu, brevetele S.U.A. numerele 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; și Winter, G. și colab. (1994) „Making Antibodies By Phage Display Technology“, Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

20 Anticorpul sau proteina de interes pot fi supuse la secvențiere prin degradare Edman, care este bine cunoscută celor calificați în domeniu. Informația referitoare la peptida generată din spectrometria de masă sau degradarea Edman poate fi utilizată pentru a proiecta sonde sau inițiatori care sunt utilizați pentru a clona proteina de interes.

O metodă alternativă de clonare a proteinei de interes este prin „panoramare“ utilizând PD-1 purificat sau porțiuni ale acestuia pentru celulele care exprimă un anticorp sau proteină de interes care posedă una sau mai multe din regiunile CDR ale PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15, sau ale unui anticorp care concurează cu PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15, pentru legare la PD-1 uman. Procedura de „panoramare“ poate fi efectuată prin obținerea unei biblioteci de ADNc-uri din țesuturi sau celule care exprimă PD-1, supraexprimă ADNc-urile într-un al doilea tip de celulă, și selecționează celulele transfectate ale celui de al doilea tip de celulă pentru o legare specifică la PD-1 în prezența sau absența de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15. Descrierea detaliată a metodelor utilizate în clonarea genelor de mamifer care codifică proteinele de suprafață celulară prin „panoramare“ poate fi găsită în domeniu (vezi, de exemplu, Aruffo, A. și colab. (1987) „Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 și Stephan, J. și colab. (1999) „Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation“, Endocrinol. 140:5841-5854).

45 Vectorii care conțin polinucleotide de interes pot fi introduși în celula gazdă prin oricare dintr-un număr de mijloace adecvate, incluzând electroporație, transfectare utilizând clorură de calciu, clorură de rubidiu, fosfat de calciu, DEAE- dextran, sau alte substanțe; bombardament cu microproiectile; lipofecție; și infecție (de exemplu, unde vectorul este un agent infecțios cum ar fi virusul vaccinia). Alegerea introducerii de vectori sau polinucleotide va depinde adesea de caracteristicile celulei gazdă.

Orice celulă gazdă capabilă să supraexprime heterolog ADN-urile poate fi utilizată în scopul izolării genelor care codifică anticorpul, polipeptida sau proteina de interes. Exemple nelimitative de celule gazdă adecvate de mamifer includ dar nu se limitează la, celule COS, HeLa, și CHO. Preferabil, celulele gazdă exprimă ADNc-urile la un nivel de aproximativ 5 ori mai ridicat, mai preferabil de 10 ori mai ridicat, chiar mai preferabil de 20 de ori mai ridicat decât cel al anticorpului endogen corespunzător sau al proteinei de interes, dacă este prezentă, în celulele gazdă. Selectarea celulelor gazdă pentru o legare specifică la PD-1 este efectuată printr-un imunotest sau FACS. Poate fi identificată o celulă care supraexprimă anticorpul sau proteina de interes.

55 Divulgarea include polipeptide care cuprind o secvență de aminoacizi a anticorpilor din această divulgare. Polipeptida acestei divulgări poate fi făcută prin proceduri cunoscute în domeniu. Polipeptida poate fi produsă prin degradarea proteolitică sau prin alte degradări ale anticorpilor, prin metode recombinante (adică, polipeptide singure sau de fuziune) cum s-a descris mai sus sau prin sinteză chimică. Polipeptidele anticorpilor, în special polipeptidele mai scurte de până la aproximativ de 50 aminoacizi, sunt făcute convenabil prin sinteză chimică. Metodele de sinteză chimică sunt cunoscute în domeniu și

sunt disponibile comercial. De exemplu, o polipeptidă PD-1 anti-umană ar putea fi produsă printr-un sintetizator automat de polipeptide care utilizează metoda fazei solide.

Divulgarea include variante de anticorpi PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15 și fragmentele lor de polipeptide care se leagă la PD-1, incluzând anticorpii echivalenți funcțional și polipeptidele de fuziune care nu afectează semnificativ proprietățile unor astfel de molecule, precum și variante care au o activitate sporită sau scăzută. Modificarea de polipeptide este practică de rutină în domeniu și nu trebuie să fie descrisă aici în detaliu. Exemple de polipeptide modificate includ polipeptidele cu substituții conservative ale resturilor de aminoacid, una sau mai multe deleții sau adăugări de aminoacizi care nu modifică dăunător semnificativ activitatea funcțională, sau utilizarea unor analogi chimici. Resturile de aminoacizi care pot fi substituite conservativ unul cu celălalt includ, dar nu sunt limitate la: glicină/alanină; serină/treonină; valină/izoleucină/leucină; asparagină/glutamină; acid aspartic/acid glutamic; lizină/arginină; și fenilalanină/tirozină. Aceste polipeptide includ de asemenea polipeptidele glicozilate și non-glicozilate, precum și polipeptidele cu alte modificări post-tranlaționale, cum ar fi, de exemplu, glicozilarea cu diferite zaharuri, acetilarea, și fosforilarea. Preferabil, substituțiile de aminoacizi ar fi conservative, adică, aminoacidul substituit ar poseda proprietăți chimice similare cu cele ale aminoacidului original. Astfel de substituții conservative sunt cunoscute în domeniu, și exemple au fost furnizate mai sus. Modificările de aminoacizi pot varia de la schimbarea sau modificarea unuia sau mai multor aminoacizi până la reproiectarea completă a unei regiuni, cum ar fi domeniul variabil. Modificările în domeniul variabil pot altera afinitatea de legare și/sau specificitatea. Alte metode de modificare includ utilizarea tehnicilor de cuplare cunoscute în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, mijloace enzimactice, substituție oxidativă și chelare. Modificările pot fi utilizate, de exemplu, pentru atașarea de etichete pentru imunotest, cum ar fi atașarea de radicali radioactivi pentru radioimunotest. Polipeptidele modificate sunt făcute utilizând procedurile stabilite din domeniu și pot fi selectate utilizând teste standard cunoscute în domeniu.

Divulgarea cuprinde proteine de fuziune care cuprind una sau mai multe polipeptide sau anticorpi PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15 ai acestei divulgări. Într-o instanță, este prevăzută o polipeptidă de fuziune care cuprinde un lanț ușor, un lanț greu sau ambele lanțuri ușor și greu. Într-o altă instanță, polipeptida de fuziune conține o regiune constantă a imunoglobulinei heterologe. Într-o altă instanță, polipeptida de fuziune conține un domeniu variabil al lanțului ușor și un domeniu variabil al lanțului greu ale unui anticorp produs dintr-un hibridom depozitat public. În scopurile acestei divulgări, o proteină de fuziune a anticorpului conține unul sau mai multe domenii ale polipeptidei care se leagă specific la PD-1 și la o altă secvență de aminoacizi care nu este atașată în molecula nativă, de exemplu, o secvență heteroloagă sau o secvență omoloagă dintr-o altă regiune.

#### **XI. Utilizările moleculelor de legare PD-1 din prezenta divulgare**

Prezenta divulgare cuprinde compoziții, incluzând compoziții farmaceutice, care cuprind moleculele de legare PD-1 din prezenta divulgare (de exemplu, anticorpi anti-PD-1, diacorpi bispecfici anti-PD-1, etc.), polipeptide derivate din astfel de molecule, polinucleotide care cuprind secvențe care codifică astfel de molecule sau polipeptide, și alți agenți cum s-a descris aici.

##### **A. Utilizări terapeutice**

Cum s-a discutat mai sus, PD-1 joacă un rol important în reglarea negativă a proliferării, funcționării și homeostazei celulei T. Anumite molecule de legare PD-1 din prezenta divulgare au abilitatea de a inhiba funcționarea PD-1, și de a inversa astfel inhibarea sistemului imunitar mediat de PD-1. Ca atare, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, și PD-1 mAb 15, derivații lor umanizați, și moleculele care cuprind fragmentele lor de legare PD-1 (de exemplu, anticorpi bispecfici, diacorpi bispecfici (incluzând, dar fără a se limita la, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I, și DART-J), etc.), sau care concurează pentru legare cu astfel de anticorpi, pot fi utilizați pentru a bloca inhibarea sistemului imunitar mediată de PD-1, și pentru a promova prin urmare activarea sistemului imunitar.

Astfel de molecule de legare PD-1 bispecifice din prezenta divulgare care se leagă la PD-1 și o altă moleculă implicată în reglarea unui punct de control imun prezent pe suprafața celulei (de exemplu, LAG-3) mărește sistemul imunitar prin blocarea inhibării sistemului imunitar mediată de PD-1 și de astfel de molecule ale punctului de control imunitar. Astfel, astfel de molecule de legare la PD-1 ale divulgării sunt utile pentru mărețarea unui răspuns imun (de exemplu, răspunsul imun mediat de celula T) al unui subiect. În particular, astfel de molecule de legare PD-1 ale divulgării pot fi utilizate pentru a trata orice boală sau afecțiune asociată cu un sistem imunitar suprimat nedorit, incluzând

cancerul și bolile care sunt asociate cu prezența unui patogen (de exemplu, o bacterie, o infecție fungică, virală sau de la protozoare).

Canceralele care pot fi tratate cu astfel de molecule de legare la PD-1 ale prezentei divulgări includ canceralele caracterizate prin prezența unei celule canceroase selectate din grupul constând dintr-o celulă de: o tumoră suprarenală de glandă, un cancer asociat cu SIDA, un sarcom alveolar parțial ușor, o tumoră astrocitică, cancer la vezică, cancer osos, un cancer la creier și măduva spinării, o tumoră cerebrală metastatică, un cancer la sân, o tumoră carotidă a corpului, un cancer de col uterin, a condrosarcom, un cordon, un carcinom cromofob cu celule renale, un carcinom cu celule clare, un cancer la colon, un cancer colorectal, un histiocitom fibros benign cutanat, o tumoră desmoplastică a celulei rotunde mici, un ependimom, o tumoră Ewing, un condrosarcom mixoid extraskeletal, o fibrogenază imperfectă a osiului, o displazie fibroasă a osului, un cancer al vezicii biliare sau canalului biliar, cancer gastric, o boală trofoblastică gestațională, o tumoră a celulei germinale, un cancer la cap și gat, carcinom hepatocelular, o tumoră cu celule insulare, un sarcom Kaposi, un cancer la rinichi, o leucemie, o tumoră lipomatoasă lipomă/benignă, un liposarcom/tumoră lipomatoasă malignă, un cancer hepatic, un limfom, un cancer pulmonar, un meduloblastom, un melanom, un meningiom, o neoplazie endocrină multiplă, un mielom multiplu, un sindrom mielodisplazic, un neuroblastom, o tumoră neuroendocrină, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un carcinom tiroidian papilar, o tumoră paratiroidă, un cancer pediatric, o tumoră a tecii nervoase periferice, un feocromocitom, o tumoră pituitară, un cancer la prostată, un melanom uveal posterior, o tulburare hematologică rară, un cancer renal metastatic, o tumoră rabdoidă, un rabdomiosarcom, un sarcom, un cancer la piele, un sarcom de țesut ușor, un cancer al celulei scuamoase, un cancer la stomac, un sarcom sinovial, un cancer testicular, un carcinom timic, un timom, un cancer metastatic de tiroidă, și un cancer uterin.

În particular, astfel de molecule de legare la PD-1 ale prezentei divulgări pot fi utilizate în tratamentul de cancer colorectal, carcinom hepatocelular, gliom, cancer la rinichi, cancer la sân, mielom multiplu, cancer la vezică, neuroblastom, sarcom, limfom non-Hodgkin, cancer pulmonar nonmicrocelular, cancer ovarian, cancer pancreatic și cancer rectal.

Bolile asociate patogenilor care pot fi tratate cu astfel de molecule de legare la PD-1 din prezenta divulgare includ infecțiile cronice virale, bacteriene, fungice și parazitice. Infecțiile cronice care pot fi tratate cu moleculele de legare PD-1 ale prezentei divulgări includ virusul Epstein Barr, virusul hepatitei A (HAV); virusul hepatitei B (HBV); virusul hepatitei C (HCV); virusurile herpes (de exemplu HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), virusul imunodeficienței umane (HIV), virusul Vesicular Stomatitis (VSV), *Bacilli*, *Citrobacter*, *Holeră*, *Difterie*, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Meningococci*, micobacterii, *Pseudomonas*, *Pneumococci*, bacteria rickettsia, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus* (fumigatus, niger, etc.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis*, *Borrelia burgdorferi*, paraziți helminți (hookworm, tapeworms, flukes, viermi plăți (de exemplu *Schistosomia*), *Giardia lamblia*, *trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Tripanosoma brucei*, *Tripanosoma cruzi*, și *Leishmania donovani*.

Astfel de molecule de legare la PD-1 ale divulgării pot fi combinate cu alți agenți anti-cancer, în particular, molecule care se leagă specific la un antigen al cancerului (de exemplu, anticorpi, diacorpi). Terapiile împotriva cancerului care pot fi combinate cu moleculele de legare la PD-1 ale divulgării includ molecule care se leagă specific la mai mulți antigeni ai cancerului incluzând: **19.9** cum s-a găsit în cancerul la colon, mucinii de cancer gastric; **4.2**; **A33** (un antigen al carcinomului colorectal; Almquist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998); **ADAM-9** (publicația brevetului din Statele Unite nr. 2006/0172350; publicația PCT nr. WO 06/084075); **AH6** cum s-a găsit în cancerul gastric; **ALCAM** (publicația PCT nr. WO 03/093443); **APO-1** (antigenul limfocitei umane maligne) (Trauth și colab. (1989) „Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis“, Science 245:301-304); **B1** (Egloff, A.M. și colab. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); **B7-H3** (Collins, M. și colab. (2005) „The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands“, Genom Biol. 6:223,1-223,7). Chapoval, A. și colab. (2001) „B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production“, Nature Immunol. 2:269-274; Sun, M. și colab. (2002) „Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes“, J. Immunol. 168:6294-6297); **BAGE** (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); **beta-catenin** (Prange W. și colab. 2003 J Pathol. 201(2):250-9); **grupa sanguină ALe<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>** cum s-a găsit în adenocarcinomul colonic; limfom Burkitt **antigen-38.13**, **C14** cum s-a găsit în adenocarcinomul colonic; **CA125** (antigenul carcinomului ovarian) (Bast, R.C. Jr. și colab. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81; Yu și colab. (1991) „Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants“, Cancer Res. 51(2):468-475); **Carboxipeptidază M** (publicația de brevet din Statele Unite nr. 2006/0166291); **CD5** (Calin, G.A. și colab. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73); **CD19** (Ghetie și colab. (1994) „Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest“, Blood

- 83:1329-1336; Troussard, X. și colab. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); **CD20** (Reff și colab. (1994) „Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20“, Blood 83:435-445; Thomas, D.A. și colab. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); **CD22** (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); **CD23** (Rosati, S. și colab. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107); **CD25** (Troussard, X. și colab. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); **CD27** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD28** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD33** (Sgouros și colab. (1993) „Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia“, J. Nucl. Med. 34:422-430); **CD36** (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); **CD40/CD154** (Messmer, D. și colab. 2005 Ann NY Acad Sci. 1062:51-60); **CD45** (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); **CD56** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD46** (brevetul din Statele Unite nr. 7.148.038; publicația PCT nr. WO 03/032814); **CD52** (Eketorp, S.S. și colab. (2014) „Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients“, Ann Hematol. 93(10):1725-1733; Suresh, T. și colab. (2014) „New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy“, J. Hematol. Oncol. 7:58; Hoelzer, D. (2013) „Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia“, Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706); **CD56** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD79a/CD79b** (Troussard, X. și colab. 1998 Hematol Celulă Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. și colab. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morfol. 9(2):97-106); **CD103** (Troussard, X. și colab. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); **CD317** (Kawai, S. și colab. (2008) „Interferon- $\alpha$  Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models“, Cancer Science 99(12):2461-2466; Wang, W. și colab. (2009) HM1.24 (CD317) „Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody“, Cancer Immunology, Immunotherapy 58(6):967-976; Wang, W. și colab. (2009) „Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer“, 63(1):23-31; Sayeed, A. și colab. (2013) „Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells“, PLoS ONE 8(6):e67191, pp. 1-10); **CDK4** (Lee, Y.M. și colab. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); **CEA** (carcinoembryonic antigen; Foon și colab. (1995) „Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotypic Antibody Vaccine“, J. Clin. Invest. 96(1):334-42); Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. și colab. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); **CEACAM9/CEACAM6** (Zheng, C. și colab. (2011) „A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity“, PLoS One 6(6):e21146, pag. 1-11); **CO17-1A** (Ragnhammar și colab. (1993) „Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced“, Int. J. Cancer 53:751-758); **CO-43** (grupă de sânge Le<sup>b</sup>); **CO-514** (grupă de sânge Le<sup>a</sup>) cum s-a găsit în adenocarcinom; **CTA-1**; **CTLA-4** (Peggs, K.S. și colab. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); **Citokeratină 8** (publicația PCT nr. WO 03/024191); **D1.1**; **D156-22**; **DR5** (Abdulghani, J. și colab. (2010) „TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics“, Expert Opin. Ther. Targets 14(10): 1091-1108; Andera, L. (2009) „Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family“, Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3): 173-180; Carlo-Stella, C. și colab. (2007) „Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy“, Clin. Cancer 13(8):2313-2317; Chaudhari, B.R. și colab. (2006) „Following the TRAIL to Apoptosis“, Immunologic Res. 35(3):249-262); seriile **E<sub>1</sub>** (grupă de sânge B) cum s-a găsit în cancerul pancreatic; **EGFR** (receptor pentru factorul de creștere epidermal; Adenis, A. și colab. 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); **receptori Ephrin** (și în particular **EphA2** (brevetul din Statele Unite nr. 7.569.672; publicația PCT nr. WO 06/084226); **Erb** (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. și colab. 2002 Oncogene 21(57):8732-8740; Rimon, E. și colab. 2004 Int J Oncol. 24(5): 1325-1338); **GAGE** (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. și colab. 2006 Int J Cancer. 118(1): 123-128); **GD2/GD3/GM2** (Livingston, P.O. și colab. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-1025); **gangliosidă GD2** (G<sub>D2</sub>; Saleh și colab. (1993) „Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen“, J.Immunol., 151, 3390-3398); **gangliosidă GD3** (G<sub>D3</sub>; Shitara și colab. (1993) „A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities“, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380); **gangliosidă GM2** (G<sub>M2</sub>; Livingston și colab. (1994) „Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside“, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044); **gangliosidă GM3** (G<sub>M3</sub>; Hoon și colab. (1993) „Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers“, Cancer Res. 53:5244-5250); **GICA 19-9** (Herlyn și colab. (1982) „Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma“, J. Clin. Immunol. 2:135-140); **gp100** (Lotem, M. și colab. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); **Gp37** (antigenul celulei T al

- leucemiei umane; Bhattacharya-Chatterjee și colab. (1988) „Idiotypic Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotypic Cascade (Abl, Ab2, and Ab3)“, J. Immunol. 141:1398-1403); **gp75** (antigen de melanom; Vijayasardahl și colab. (1990) „The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product“, J. Exp. Med. 171(4): 1375-1380); **gpA33** (Heath, J.K. și colab. (1997) „The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily“, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 94(2):469-474; Ritter, G. și colab. (1997) „Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium“, Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686; Wong, N.A. și colab. (2006) „EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia“, J. Clin. Pathol. 59(3):260-263); **antigen HER2** (HER2/neu, p185<sup>HER2</sup>; Kumar, Pal S și colab. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); **HMFG** (antigen al globulelor grase din lapte uman; WO1995015171); **virusul papiloma uman-E6/virusul papiloma uman-E7** (DiMaio, D. și colab. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59; **HMW-MAA** (antigen al melanomului cu masă moleculară mare; Natali și colab. (1987) „Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance“, Cancer 59:55-63; Mittelman și colab. (1990) „Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies“, J. Clin. Invest. 86:2136-2144); **antigen I** (antigen de diferențiere; Feizi (1985) „Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens“, Nature 314:53-57); **IL13Ra2** (publicația PCT nr. WO 2008/146911; Maro, C.E. și colab. (2013) „Glioma IL13Ra2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis“, PLoS One. 18;8(10):e77769; Barderas, R. și colab. (2012) „High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis“, Cancer Res. 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. și colab. (2011) „IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Ra2“, J. Immunol. 187(1):561-569; Bozinov, O. și colab. (2010) „Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ralpha2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas“, Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621; Fujisawa, T. și colab. (2009) „A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis“, Cancer Res. 69(22):8678-8685); **Integrină β6** (publicația PCT nr. WO 03/087340); **JAM-3** (publicația PCT nr. WO 06/084078); **KID3** (publicația PCT nr. WO 05/028498); **KID31** (publicația PCT nr. WO 06/076584); **KS 1/4 antigen pan-carcinom** (Perez și colab. (1989) „Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker“ J. Immunol. 142:3662-3667; Moller și colab. (1991) „Bi-specific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes“, Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); **L6** și **L20** (antigeni pulmonari de carcinom uman; Hellstrom și colab. (1986) „Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma“, Cancer Res. 46:3917-3923); **LEA**; **LUCA-2** (publicația de brevet din Statele Unite nr. 2006/0172349; publicația PCT nr. WO 06/083852); **M1:22:25:8**; **M18**; **M39**; **MAGE** (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); **MART** (Kounalakis, N. și colab. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):377-82; **mesotelin** (Chang K, și Pastan I. 1996 „Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers“, Proc Natl Acad Sci SUA 93:136-40); **MUC-1** (Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); **MUM-1** (Castelli, C. și colab. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); **Myl**; **N-acetilglucosaminiltransferază** (Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6;1473(1):21-34); **neoglicoproteină**; **NS-10** cum s-a găsit în adenocarcinomi; **OFA-1**; **OFA-2**; **Oncostatin M** (receptor beta oncostatin; brevetul din Statele Unite nr. 7.572.896; publicația PCT nr. WO 06/084092); **p15** (Gil, J. și colab. 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77); **p97** (antigen asociat cu melanomul; Estin și colab. (1989) „Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97“, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454); **PEM** (mucine epiteliale polimorfice; Hilkens și colab. (1992) „Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property“, Trends in Biochem. Sci. 17:359-363); **PEMA** (antigen mucin epitelial polimorfic); **PIPA** (brevetul din Statele Unite nr. 7.405.061; publicația PCT nr. WO 04/043239); **PSA** (antigen specific prostatei; Henttu și colab. (1989) „cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes“, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli și colab. (1993) „Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen“, Cancer Res. 53:227-230; Cracco, C.M. și colab. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); **PSMA** (antigen membranar specific prostatei; Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-180); **fosfat acid prostatic** (Tailor și colab. (1990) „Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone“, Nucl. Acids Res. 18(16):4928); **R24** cum s-a găsit în melanom; **ROR1** (brevetul din Statele Unite nr. 5.843.749); **sfingolipide**; **SSEA-1**; **SSEA-3**;

**SSEA-4**; **sTn** (Holmberg, L.A. 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91); **peptidă derivată din receptorul** celulei T dintr-un limfom cutanat al celulei T (vezi Edelson (1998) „Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy“, Cancer J Sci Am. 4:62-71); **TsA7** găsit în celule mieloid; **TAG-72** (Yokota și colab. (1992) „Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms“, Cancer Res. 52:3402-3408); **TL5** (grupă de sânge A); **receptor TNF** (receptor TNF- $\alpha$ , receptor TNF- $\beta$ ; **receptor TNF- $\gamma$**  (van Horssen, R. și colab. 2006 Oncologist. 11(4):397-408; Gardnerova, M. și colab. 2000 Curr Drug Targets. 1(4):327-64); **TRA-1-85** (grupă de sânge H); **receptor transferină** (brevetul din Statele Unite nr. 7.572.895; publicația PCT nr. WO 05/121179); **5T4** (TPBG, glicoproteină trofoblastă; Boghaert, E.R. și colab. (2008) „The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin“, Int. J. Oncol. 32(1):221-234; Eisen, T. și colab. (2014) „Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin“, Curr. Oncol. Rep. 16:370, pp. 1-6); **TSTA (antigen de transplantare specific tumorii)** cum ar fi antigenii tumorali induși viral incluzând virușii tumorali ADN ai antigenului T și antigenii de anvelopare ai virusurilor tumorale ARN, antigen-alfa-fetoproteina oncofetală cum ar fi CEA de colon, antigenul oncofetal al tumorii de vezică (Hellstrom și colab. (1985) „Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas“, Cancer. Res. 45:2210-2188); **VEGF** (Pietrantonio, F. și colab. (2015) „Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians“, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95(3):272-281; Grabowski, J.P. (2015) „Current Management Of Ovarian Cancer“, Minerva Med. 106(3):151-156; Field, K.M. (2015) „Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies“, Cancer 121(7):997-1007; Suh, D.H. și colab. (2015) „Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014“, J. Gynecol. Oncol. 26(2):156-167; Liu, K.J. și colab. (2015) „Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer“, Tumour Biol. 36(3): 1323-1327; Di Bartolomeo, M. și colab. (2015) „Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer“, Clin. Interv. Aging 10:127-133); **receptor VEGF** (O'Dwyer. P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-998); **VEP8**; **VEP9**; **VIM-D5**; și **Y haptan**, **Le<sup>y</sup>** cum s-a găsită în celulele de carcinom embrional.

În anumite cazuri, astfel de molecule de legare anti-PD-1 ale divulgării sunt utilizate în combinație cu una sau mai multe molecule care se leagă specific la 5T4, B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, anticorpii VEGF-A, și/sau VEGFR2.

Astfel de molecule de legare la PD-1 ale divulgării pot fi combinate cu un agent imunogenic cum ar fi un vaccin tumoral. Astfel de vaccinuri pot cuprinde antigeni tumorali purificați (incluzând proteine recombinante, peptide, și molecule de carbohidrat) celule tumorale autologe sau alogene. A fost descris un număr de strategii de vaccinare tumorală (vezi de exemplu, Palena, C., și colab., (2006) „Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies“, Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I., și colab. (2011) „Cancer immunotherapy comes of age“, Nature 480, 480-489; Zhang, X. M. și colab. (2008) „The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides“, Oncol. Rep. 20, 245-252; Disis, M. L. și colab. (2002) „Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines“, J. Clin. Oncol. 20, 2624-2632; Vermeij, R. și colab. (2012) „Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study“, Int. J. Cancer 131, E670-E680). Astfel de molecule de legare la PD-1 ale divulgării pot fi combinate cu regimuri chimioterapeutice. În aceste cazuri, poate fi posibilă reducerea dozei de reactiv chimioterapeutic administrat (Mokyr și colab. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304).

Astfel de molecule de legare la PD-1 ale divulgării pot fi combinate cu alte molecule imunostimulatoare cum ar fi anticorpii care activează responsivitatea imună a gazdei pentru a furniza niveluri crescute de activare ale celulelor T. În particular, s-a demonstrat că anticorpii anti-PD-1, anticorpii anti-PD-L1 și/sau anticorpii anti-CTLA-4 activează sistemul imunitar (vezi, de exemplu, del Rio, M-L. și colab. (2005) „Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation“, Eur. J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. și colab. (2006) „Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection“, Nature 439, 682-687; Iwai, Y. și colab. (2002) „Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade“, Proc. Natl Acad. Sci. SUA 99, 12293-12297; Leach, D. R., și colab., (1996) „Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade“, Science 271, 1734-1736). Molecule imunostimulatoare suplimentare care pot fi combinate cu moleculele de legare PD-1 ale divulgării includ anticorpi la moleculele de pe suprafața celulelor dendritice care activează funcționarea celulei dendritice (DC) și prezentarea antigenului, anticorpi anti-CD40 capabili să substituie activitatea ajutătoare a celulei T, și anticorpi activatori la moleculele costimulatoare ale celulei T cum ar fi PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB, și ICOS (vezi, de exemplu, Ito și colab. (2000) „Effective Priming Of

Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies“, *Immunobiology* 201:527-40; brevetul S.U.A. nr. 5.811.097; Weinberg și colab. (2000) „Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity“, *Immunol* 164:2160-2169; Melero și colab. (1997) „Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors“, *Nature Medicine* 3: 682-685; Hutloff și colab. (1999) „ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related To CD28“, *Nature* 397: 263-266; și Moran, A.E. și colab. (2013) „The TNFRs OX40, 4-14BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy“, *Curr Opin Immunol.* aprilie 2013; 25(2): 10,1016/j.coi,2013,01,004), și/sau receptori stimulatori ai antigenului himeric (**CAR-uri**) cuprinzând un domeniu de legare la antigen direcționat împotriva unui antigen al bolii fuzionat la unul sau mai multe domenii de semnalizare intracelulară de la diferiți receptori costimulatori de proteină (de exemplu, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, etc.) care servesc pentru a stimula celulele T după legarea la antigen (vezi, de exemplu, Tettamanti, S. și colab. (2013) „Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor“, *Br. J. Haematol.* 161:389-401; Gill, S. și colab. (2014) „Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells“, *Blood* 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. și colab. (2013) „T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia“, *Blood* 122:3138-3148; Pizzitola, I. și colab. (2014) „Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo“, *Leucemie* doi: 10,1038/leu,2014,62).

Astfel de molecule de legare la PD-1 ale divulgării pot fi combinate cu receptori inhibitori ai antigenului himeric (**iCAR-uri**) pentru a devia răspunsurile țintă de imunoterapie. iCAR-urile unui domeniu de legare al antigenului direcționate împotriva unui antigen al bolii fuzionat la unul sau mai multe domenii de semnalizare intracelulară de la diferiți receptori inhibitori de proteină (de exemplu, CTLA-4, PD-1, etc.) care servesc pentru a restrânge răspunsurile celulei T după legarea la antigen (vezi, de exemplu, Fedorov V.D. (2013) „PD-1-and CTLA-4 Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses“, *Sci. Tranl. Med.* 5:215ra172 doi:10,1126/scitranslmed,3006597).

În particular, astfel de molecule de legare la anti-PD-1 ale divulgării sunt utilizate în combinație cu un anticorp anti-CD137, un anticorp anti-CTLA-4, un anticorp anti-OX40, un anticorp anti-LAG-3, un anticorp anti-PD-L1, un anticorp anti-TIGIT, un anticorp anti TIM-3 și/sau un vaccin contra cancerului.

#### **B. Utilitate diagnostică și teranostică**

Anumite molecule de legare PD-1- ale prezentei divulgări prezintă o capacitate redusă de a bloca legarea între PD-1 și ligandul PD-1L. Ca atare, anticorpii PD-1 mAb 2 și PD-1 mAb 4, derivații lor umanizați, și moleculele care cuprind fragmentele lor de legare PD-1 (de exemplu, diacorpi bispecfici, etc.) sau care concurează pentru legare cu astfel de anticorpi pot fi marcați detectabil (de exemplu, cu radicali radioactivi, enzimatici, fluorescenți, chemiluminiscenți, paramagnetici, diamagnetici, sau cu alți radicali de marcăre) și utilizați în detecția de PD-1 în mostre sau în imagistica de PD-1 pe celule. Deoarece astfel de molecule nu afectează activitatea biologică a PD-1, ele sunt în special utile în metodele de determinare a extensiei, locației și modificării în expresia PD-1 la subiecți (de exemplu, la subiecții care sunt tratați pentru cancer asociat cu expresia sau țintirea de PD-1).

#### **XII. Compoziții farmaceutice**

Compozițiile din divulgare includ compoziții medicamentoase vrac utile în fabricarea compozițiilor farmaceutice (de exemplu, compoziții impure sau non-sterile) și compoziții farmaceutice (adică, compoziții care sunt adecvate pentru administrare la un subiect sau pacient) care pot fi utilizate în prepararea formelor de dozare unitare. Astfel de compoziții cuprind o cantitate eficientă profilactic sau terapeutic de molecule de legare la PD-1 ale prezentei divulgări, sau o combinație de astfel de agenți și un purtător acceptabil farmaceutic. Preferabil, compozițiile divulgării cuprind o cantitate eficientă profilactic sau terapeutic de molecule de legare la PD-1 ale prezentei divulgări și un purtător acceptabil farmaceutic. Divulgarea cuprinde în special astfel de compoziții farmaceutice în care molecula de legare la PD-1 este: un PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15; un PD-1 mAb 1 umanizat; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15; un fragment de legare la PD-1 al oricărui astfel de anticorpi; sau în care molecula de legare la PD-1 este un diacorp PD-1 bispecific (de exemplu, un diacorp bispecific PD-1 x LAG-3). Sunt în special cuprinse astfel de molecule care cuprind cele 3 CDR<sub>L</sub>-uri și cele 3 CDR<sub>H</sub>-uri ale anticorpului PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15; un PD-1 mAb 1 umanizat; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4,

PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15.

Divulgarea cuprinde de asemenea astfel de compoziții farmaceutice care includ suplimentar un al doilea anticorp terapeutic (de exemplu, anticorp monoclonal specific tumorii) care este specific pentru un anumit antigen al cancerului, și un purtător acceptabil farmaceutic.

Intr-un caz specific, termenul „acceptabil farmaceutic” înseamnă aprobat de o agenție de reglementare a guvernului federal sau de stat sau listat în Farmacopeia U.S. sau a altor farmacopei recunoscute în general pentru utilizare la animale, și mai în ales la oameni. Termenul „purtător” se referă la un diluant, adjuvant (de exemplu, adjuvant Freund (complet și incomplet), excipient, sau vehicul cu care este administrat agentul terapeutic. Astfel de purtători farmaceutici pot fi lichide sterile, cum ar fi apă și uleiuri, incluzându-le pe cele de petrol, de origine animală, vegetală sau sintetică, cum ar fi uleiul de arahide, uleiul de soia, uleiul mineral, uleiul de susan și altele asemenea. Apa este un purtător preferat când compoziția farmaceutică este administrată intravenos. Soluțiile saline și dextroza apoasă și soluțiile cu glicerol pot fi de asemenea utilizate ca purtători lichizi, în special pentru soluțiile injectabile. Excipienții farmaceutici adecvați includ amidon, glucoză, lactoză, zaharoză, gelatină, malț, orez, făină, cretă, gel de siliciu, stearat de sodiu, monostearat de glicerol, talc, clorură de sodiu, lapte degresat uscat, glicerol, propilenă, glicol, apă, etanol și altele asemenea. Compoziția, dacă se dorește, poate conține de asemenea cantități minore de agenți de umezire sau de emulsionare, sau agenți de tamponare pH. Aceste compoziții pot lua forma de soluții, suspensii, emulsii, tablete, pilule, capsule, pulberi, formulări cu eliberare susținută și altele asemenea.

În general, ingredientele compozițiilor din divulgare sunt furnizate fie separat sau fie amestecate împreună sub formă de doză unitară, de exemplu, ca pulbere liofilizată uscată sau concentrată fără apă într-un recipient etanșat ermetic cum ar fi o fiolă sau pliculeț care indică cantitatea de agent activ. Unde compoziția trebuie administrată prin perfuzie, ea poate fi eliberată cu o sticlă de perfuzie care conține apă sau soluție salină sterilă de calitate farmaceutică. Unde compoziția trebuie administrată prin injecție, poate fi furnizată o fiolă de apă sterilă pentru injecție sau soluție salină astfel încât ingredientele să poată fi amestecate înainte de administrare.

Compozițiile din divulgare pot fi formulate ca forme neutre sau de sare. Sărurile acceptabile farmaceutic includ, dar nu se limitează la, cele formate cu anioni cum ar fi cele derivate din acid clorhidric, fosforic, acetic, oxalic, tartric, etc., și cele formate cu cationi cum ar fi cele derivate din sodiu, potasiu, amoniu, calciu, hidroxizi ferici, izopropilamină, trietilamină, 2-etilamino etanol, histidină, procaină, etc.

Divulgarea furnizează de asemenea un pachet sau trusă farmaceutică care cuprinde unul sau mai multe recipiente umplute cu o moleculă de legare la PD-1 a prezentei divulgări (și mai preferabil, un anticorp PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15; un umanizat PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15; un fragment de legare la PD-1 al oricărui astfel de anticorpi; sau în care molecula de legare la PD-1 este un diacorp PD-1 bispecific (de exemplu, un diacorp bispecific PD-1 x LAG-3)). În special cuprinse, sunt astfel de molecule care cuprind cele 3 CDR<sub>L</sub>-uri și cele 3 CDR<sub>H</sub>-uri ale PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, sau PD-1 mAb 15, singuri sau cu astfel de purtători acceptabil farmaceutic. Suplimentar, unul sau mai mulți alți agenți profilactici sau terapeutici utili pentru tratamentul unei boli pot fi de asemenea incluși în pachetul sau trusa farmaceutică. Divulgarea furnizează de asemenea un pachet sau trusă farmaceutică care cuprinde unul sau mai multe recipiente umplute cu unul sau mai multe din ingredientele compozițiilor farmaceutice ale divulgării. Asociată opțional cu astfel de recipiente, poate fi o notidicare în forma prescrisă de o agenție guvernamentală care reglementează fabricarea, utilizarea sau vânzarea de produse farmaceutice sau biologice, care notificare reflectă aprobarea de către agenție a fabricării, utilizării sau vanzării pentru administrare umană.

Prezenta divulgare furnizează truse care pot fi utilizate în metodele de mai sus. O trusă poate cuprinde orice moleculă de legare la PD-1 din prezenta divulgare. Trusa poate cuprinde suplimentar unul sau mai mulți alți agenți profilactici și/sau terapeutici utili pentru tratamentul cancerului, în unul sau mai multe recipiente; și/sau trusa poate cuprinde suplimentar unul sau mai mulți anticorpi citotoxici care se leagă la unul sau mai mulți antigeni ai cancerului asociați cu cancerul. În anumite cazuri, celălalt agent profilactic sau terapeutic este un agent chimioterapeutic. În alte cazuri, agentul profilactic sau terapeutic este un agent terapeutic biologic sau hormonal.

**XIII. Metode de administrare**

Compozițiile din prezenta divulgare pot fi furnizate pentru tratamentul, profilaxia, și ameliorarea unuia sau mai multor simptome asociate cu o boală, tulburare sau infecție prin administrarea la un subiect a unei cantități eficiente a unei proteine de fuziune sau a unei molecule conjugat a divulgării, sau a unei compoziții farmaceutice care cuprinde o proteină de fuziune sau o moleculă conjugat a divulgării. Într-un aspect preferat, astfel de compoziții sunt substanțial purificate (adică, substanțial fără substanțe care să limiteze efectul lor sau să producă efecte secundare nedorite). Într-un caz specific, subiectul este un animal, preferabil un mamifer cum ar fi o non-primată (de exemplu, bovine, echine, feline, canine, rozătoare, etc.) sau o primată (de exemplu, maimuță cum ar fi, o maimuță cynomolgus, om, etc.). Într-un caz preferat, subiectul este un om.

Sunt cunoscute și pot fi utilizate diferite sisteme de livrare pentru a administra compozițiile din divulgare, de exemplu, încapsularea în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime anticorpii sau proteina de fuziune, endocitoza mediata de receptor (vezi, de exemplu, Wu și colab. (1987) „Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System“, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcția unui acid nucleic ca parte a unui vector retroviral sau a altui vector, etc.

Metodele de administrare a unei molecule a divulgării includ, dar nu se limitează la, administrare parenterală (de exemplu, intradermală, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă și subcutanată), epidurală, și mucozală (de exemplu, intranasală și pe căi orale). Într-un caz specific, moleculele de legare la PD-1 ale prezentei divulgări sunt administrate intramuscular, intravenos, sau subcutanat. Compozițiile pot fi administrate pe orice cale convenabilă, de exemplu, prin perfuzie sau injecție bolus, prin absorbție prin căptușelile epitelială sau mucocutanată (de exemplu, mucoasa orală, rectală și intestinală, etc.) și pot fi administrate împreună cu alți agenți activi biologic. Administrarea poate fi sistemică sau locală. În plus, administrarea pulmonară poate fi de asemenea utilizată, de exemplu, prin utilizarea unui inhalator sau nebulizator, și a unei formulări cu un agent de aerosolizare. Vezi, de exemplu, brevetele S.U.A. numerele 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; și 4.880.078; și publicațiile PCT numerele WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; și WO 99/66903.

Divulgarea prevede de asemenea că moleculele de legare la PD-1 ale prezentei divulgări sunt ambalate într-un recipient etanșat ermetic cum ar fi o fiolă sau săculeț care indică cantitatea de moleculă. Într-un caz, astfel de molecule sunt furnizate ca pulbere liofilizată sterilizată uscată sau concentrată fără apă într-un recipient etanșat ermetic și pot fi reconstituite, de exemplu, cu apă sau soluție salină la concentrația adecvată pentru administrare la un subiect. Preferabil, moleculele de legare PD-1 ale prezentei divulgări sunt furnizate ca pulbere liofilizată sterilă uscată într-un recipient etanșat ermetic.

Moleculele de legare PD-1 liofilizate ale prezentei divulgări ar trebui să fie depozitate între 2°C și 8°C în recipientul lor original și moleculele ar trebui să fie administrate în 12 ore, preferabil în 6 ore, în 5 ore, în 3 ore, sau la 1 oră după ce au fost reconstituite. Într-o instanță alternativă, astfel de molecule sunt furnizate în formă lichidă într-un recipient etanșat ermetic care indică cantitatea și concentrația de moleculă, proteină de fuziune, sau moleculă conjugată. Preferabil, astfel de molecule de legare la PD-1 când sunt furnizate în formă lichidă sunt furnizate într-un recipient etanșat ermetic.

Cantitatea de compoziție a divulgării care va fi eficientă în tratamentul, prevenirea sau ameliorarea unuia sau mai multor simptome asociate cu o tulburare poate fi determinată prin tehnici clinice standard. Doza precisă care va fi utilizată în formulare va depinde de asemenea de calea de administrare, și gravitatea afecțiunii, și ar trebui să fie decisă în conformitate cu raționamentul practicianului și fiecare din circumstanțele pacientului. Dozele eficiente pot fi extrapolate din curbele de răspuns la doză derivate din sistemele de testare in vitro sau pe modele la animale.

Așa cum s-a utilizat în acest document, o „cantitate eficientă“ a unei compoziții farmaceutice, într-un caz, este o cantitate suficientă pentru a obține rezultate benefice sau dorite incluzând, fără limitare, rezultatele clinice cum ar fi scăderea simptomelor care rezultă din boală, atenuarea unui simptom al infecției (de exemplu, încărcare virală, febră, durere, septicemie, etc.) sau unui simptom al cancerului (de exemplu, proliferarea celulelor canceroase, prezența tumorii, metastaze tumorale, etc.), crescând prin urmare calitatea vieții celor care suferă de boală, scăzând doza altor medicații necesare pentru a trata boala, amplificând efectul altei medicații cum ar fi prin țintire și/sau internalizare, întârziind progresul bolii, și/sau prelungind supraviețuirea indivizilor.

O cantitate eficientă poate fi administrată în una sau mai multe administrări. În scopurile acestei divulgări, o cantitate eficientă de medicament, compus, sau compoziție farmaceutică este o cantitate suficientă pentru a reduce proliferarea (sau efectul) prezenței virale și pentru a reduce și/sau întârzia dezvoltarea bolii virale, fie direct sau fie indirect. În unele cazuri, o cantitate eficientă a unui medicament, compus, sau compoziție farmaceutică poate sau nu poate să fie obținută în conjuncție cu un alt medicament, compus, sau compoziție farmaceutică. Astfel, o „cantitate eficientă“ poate fi considerată în contextul administrării unuia sau mai multor agenți chimioterapeutici, și un singur agent poate fi considerat administrat într-o cantitate eficientă dacă, în conjuncție cu unul sau mai mulți alți agenți, poate

fi sau este obținut un rezultat dorit. În timp ce necesitățile individuale variază, determinarea intervalelor optime ale cantităților eficiente ale fiecărei componente este de competența abilităților în domeniu.

Pentru moleculele de legare la PD-1 cuprinse de divulgare, dozajul administrat unui pacient este determinat preferabil pe baza greutatei corporale (kg) a subiectului destinat. Pentru moleculele de legare la PD-1 cuprinse de divulgare, dozajul administrat unui pacient este de obicei de cel puțin aproximativ 0,01 μg/kg, cel puțin aproximativ 0,05 μg/kg, cel puțin aproximativ 0,1 μg/kg, cel puțin aproximativ 0,2 μg/kg, cel puțin aproximativ 0,5 μg/kg, cel puțin aproximativ 1 μg/kg, cel puțin aproximativ 2 μg/kg, cel puțin aproximativ 5 μg/kg, cel puțin aproximativ 10 μg/kg, cel puțin aproximativ 20 μg/kg, cel puțin aproximativ 50 μg/kg, cel puțin aproximativ 0,1 mg/kg, cel puțin aproximativ 1 mg/kg, cel puțin aproximativ 3 mg/kg, cel puțin aproximativ 5 mg/kg, cel puțin aproximativ 10 mg/kg, cel puțin aproximativ 30 mg/kg, cel puțin aproximativ 50 mg/kg, cel puțin aproximativ 75 mg/kg, cel puțin aproximativ 100 mg/kg, cel puțin aproximativ 125 mg/kg, cel puțin aproximativ 150 mg/kg sau mai mult din greutatea corporală a subiectului.

Dozajul și frecvența administrării unei molecule de legare PD-1 a prezentei divulgări pot fi reduse sau alterate prin absorbția amplificării și penetrarea tisulară a moleculei prin modificări cum ar fi, de exemplu, lipidarea.

Dozajul unei molecule de legare la PD-1 a divulgării administrate unui pacient poate fi calculat pentru utilizare ca terapie cu un singur agent. Alternativ, molecula poate fi utilizată în combinație cu alte compoziții terapeutice și dozajul administrat pacientului este mai scăzut decât când respectivele molecule sunt utilizate ca terapie cu un singur agent.

Compozițiile farmaceutice ale divulgării pot fi administrate local ariei care are nevoie de tratament; acest lucru poate fi obținut, de exemplu, și nu pe cale limitativă, prin perfuzie locală, prin injecție, sau prin intermediul unui implant, respectivul implant fiind al unui material poros, non-poros, sau gelatinos, incluzând membrane, cum ar fi membranele sialastice, sau fibrele. Preferabil, când se administrează o moleculă a divulgării, trebuie avută grijă să fie utilizate materiale pe care molecula nu le absoarbe.

Compozițiile din divulgare pot fi livrate într-o veziculă, în particular un lipozom (vezi Langer (1990) „New Methods Of Drug Delivery“, Science 249:1527-1533); Treat și colab., în LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein și Fidler (eds.), Liss, New York, pag. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pag. 3 17-327).

Compozițiile din divulgare pot fi livrate într-un sistem cu eliberare controlată sau cu eliberare susținută. Orice tehnică cunoscută unei persoane calificate în domeniu poate fi utilizată pentru a produce formulări cu eliberare susținută cuprinzând una sau mai multe dintre moleculele de legare la PD-1 ale divulgării. Vezi, de exemplu, brevetul S.U.A. nr. 4.526.938; publicația PCT WO 91/05548; publicația PCT WO 96/20698; Ning și colab. (1996) „Intratunoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel, “ Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song și colab. (1995) „Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions“, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek și colab. (1997) „Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application“, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; și Lam și colab. (1997) „Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery“, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. Intr-un caz, poate fi utilizată o pompă într-un sistem cu eliberare controlată (vezi Langer, mai sus; Sefton, (1987) „Implantable Pumps“, CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald și colab. (1980) „Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis“, Surgery 88:507-516; și Saudek și colab. (1989) „A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery“, N. Engl. J. Med. 321:574-579). Intr-un alt caz, pot fi utilizate materiale polimerice pentru a obține eliberarea controlată a moleculelor (vezi de exemplu, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer și Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen și Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy și colab. (1985) „Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate“, Science 228:190-192; During și colab. (1989) „Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization“, Ann. Neurol. 25:351-356; Howard și colab. (1989) „Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits“, J. Neurosurg. 7(1): 105-112); brevetul S.U.A. nr. 5.679.377; brevetul S.U.A. nr. 5.916.597; brevetul S.U.A. nr. 5.912.015; brevetul S.U.A. nr. 5.989.463; brevetul S.U.A. nr. 5.128.326; publicația PCT nr. WO 99/15154; și publicația PCT nr. WO 99/20253). Exemple de polimeri utilizați în formulările cu eliberare susținută includ, dar nu se limitează la, poli(2-hidroxi etil metacrilat), poli(metil metacrilat), poli(acid acrilic), poli(etilen-co-acetat de vinil), poli(acid metacrilic), poliglicolidă (PLG), polianhidridă, poli(N-vinil pirolidonă), poli(vinil alcool), poli(acrilamidă), poli(etilen glicol), polilactidă (PLA), poli(lactide-co-glicolide) (PLGA), și poliortoesteri.

Un sistem cu eliberare controlată poate fi plasat în proximitatea țintei terapeutice (de exemplu, plămâni), necesitând astfel numai o fracțiune de doză sistemică (vezi, de exemplu, Goodson, in *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, mai sus, vol. 2, pag. 115-138 (1984)). Pot fi utilizate compoziții polimerice utile ca implanturi cu eliberare controlată în conformitate cu Dunn și colab. (vezi U.S. 5.945.155). Această metodă particulară se bazează pe efectul terapeutic al eliberării controlate in situ a materialului bioactiv din sistemul polimeric. Implantarea poate apare în general oriunde în corpul pacientului care are nevoie de tratament terapeutic. Poate fi utilizat un sistem non-polimeric de livrare susținută, în care un implant non-polimeric în corpul subiectului este utilizat ca un sistem de livrare al medicamentului. După implantarea în corp, solventul organic al implantului se va disipa, dispersa, sau extrage din compoziție în fluidul țesutului înconjurător, și materialul non-polimeric se va coagula sau precipita gradual pentru a forma o matrice solidă, microporoasă (vezi U.S. 5.888.533).

Sistemele cu eliberare controlată sunt discutate în revizuirea lui Langer (1990, „New Methods Of Drug Delivery“, *Science* 249:1527-1533). Poate fi utilizată orice tehnică cunoscută unei persoane calificate în domeniu pentru a produce formulări cu eliberare susținută cuprinzând unul sau mai mulți agenți terapeutici ai divulgării. Vezi, de exemplu, brevetul S.U.A. nr. 4.526.938; publicațiile internaționale numerele WO 91/05548 și WO 96/20698; Ning și colab. (1996) „Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel“, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song și colab. (1995) „Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions“, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek și colab. (1997) „Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application“, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; și Lam și colab. (1997) „Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery“, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760.

Unde compoziția din divulgare este un acid nucleic care codifică o moleculă de legare la PD-1 a prezentei divulgării, acidul nucleic poate fi administrat in vivo pentru a promova expresia moleculei sale de legare la PD-1 codificate prin construcția ei ca parte a unui vector de expresie adecvat al acidului nucleic și administrarea lui astfel încât să devină intracelular, de exemplu, prin utilizarea unui vector retroviral (vezi brevetul S.U.A. nr. 4.980.286), sau prin injecție directă, sau prin utilizarea de bombardament cu microparticule (de exemplu, un tun de gene; Biolistic, Dupont), sau prin acoperire cu lipide sau receptori de pe suprafața celulară sau cu agenți de transfectare, sau prin administrare în legătură cu o peptidă de tip homeobox care este cunoscută că intră în nucleu (vezi de exemplu, Joliot și colab. (1991) „Antennapedia Peptide Regulates Neural Morphogenesis“, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1864-1868), etc. Alternativ, un acid nucleic poate fi introdus intracelular și încorporat în ADN-ul celulei gazdă pentru expresie prin recombinare omoloagă.

Tratamentul unui subiect cu o cantitate eficientă terapeutic sau profilactic a unei molecule de legare la PD-1 a prezentei divulgării poate include un singur tratament sau, preferabil, poate include o serie de tratamente. Într-un exemplu preferat, un subiect este tratat cu un astfel de diacorp o dată pe săptămână timp de aproximativ 1 până la 10 săptămâni, preferabil între 2 până la 8 săptămâni, mai preferabil între aproximativ 3 până la 7 săptămâni, și chiar mai preferabil timp de aproximativ 4, 5, sau 6 săptămâni. Compozițiile farmaceutice ale divulgării pot fi administrate o dată pe zi, de două ori pe zi, sau de trei ori pe zi. Alternativ, compozițiile farmaceutice pot fi administrate o dată pe săptămână, de două ori pe săptămână, o dată la fiecare două săptămâni, o dată pe lună, o dată la fiecare șase săptămâni, o dată la fiecare două luni, de două ori pe an sau o dată pe an. Se va aprecia de asemenea că dozajul eficient al moleculelor utilizate pentru tratament poate crește sau scade pe parcursul unui anumit tratament.

#### **Exemple**

Următoarele exemple ilustrează diferite metode pentru compozițiile din metodele de diagnostic sau de tratament ale divulgării. Exemplele intenționează să ilustreze, dar nu într-o manieră limitativă, domeniul divulgării.

#### **Exemplul 1**

##### **Caracterizarea anticorpilor monoclonali PD-1 anti-umani**

Cincisprezece anticorpi monoclonali murini au fost izolați ca fiind capabili de legare specifică atât la PD-1 uman cât și la PD-1 de maimuță cynomolgus, și au fost denumiți „PD-1 mAb 1“, „PD-1 mAb 2“, „PD-1 mAb 3“, „PD-1 mAb 4“, „PD-1 mAb 5“, „PD-1 mAb 6“, „PD-1 mAb 7“, „PD-1 mAb 8“, „PD-1 mAb 9“, „PD-1 mAb 10“, „PD-1 mAb 11“, „PD-1 mAb 12“, „PD-1 mAb 13“, „PD-1 mAb 14“, și „PD-1 mAb 15“. Regiunile CDR ale acestor anticorpi au fost găsite că diferă și sunt furnizate mai sus. Legarea la domeniul extracelular de PD-1 uman și de maimuță cynomolgus a fost evaluată după cum urmează, plăcile cu fund plat maxisorb cu 96 de godeuri au fost acoperite cu PD-1 solubil uman sau de maimuță cynomolgus (domeniul extracelular al PD-1 uman a fuzionat la o etichetă His (shPD-1 His) sau la o regiune Fc umană (shPD-1 hFc), sau domeniul extracelular al PD-1 de maimuță cynomolgus a fuzionat cu o regiune Fc umană (scyno-PD1 Fc)) fiecare la 0,5 sau 1 μg/mL, plăcile au fost spălate și incubate cu unul dintre anticorpii anti-PD-1 izolați PD-1 mAb 1-15. Pentru aceste studii

anticorpilor anti-PD-1 au fost utilizați la 3, 1,0, 0,3333, 0,1111, 0,0370, 0,0123, sau 0,0041  $\mu\text{g/mL}$  (de trei ori diluții seriale). A fost evaluată cantitatea de legare a anticorpului la PD-1 imobilizat (uman sau de maimuță cynomolgus) utilizând un anticorp secundar IgG-HRP anti-șoarece de capră. Toate mostrele au fost analizate pe un cititor de placă (Victor 2 Wallace, Perkin Elmers). Curbele de legare reprezentative pentru PD-1 solubil uman și de maimuță cynomolgus sunt prezentate în **Figurile 7A-7D** și respectiv **Figurile 8A-8C**.

Rezultatele acestor teste de legare (**Figurile 7A-7D** și **Figurile 8A-8C**) arată că toți anticorpilor anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se leagă la ambele PD-1 solubile, uman și de maimuță cynomolgus.

Pentru a caracteriza suplimentar anticorpilor anti-PD-1 murini, a fost evaluată abilitatea lor de a bloca legarea PD-L1 uman solubil până la PD-1 uman solubil în două teste diferite. Într-un test a fost examinată abilitatea anticorpilor de a bloca legarea PD-1 uman până la PD-L1 imobilizat pe o suprafață. Pentru acest test fiecare dintre anticorpilor anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, sau anticorpul de referință anti-PD-1 (PD-1 mAb A) a fost amestecat cu proteina de fuziune shPD-1 His, (la 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ) și a fost incubat separat cu PD-L1 uman solubil marcat cu biotină (domeniul extracelular al PD-L1 a fuzionat cu Fc umană (sPD-L1)) la 1  $\mu\text{g/mL}$  imobilizat pe o placă acoperită cu streptavidină. Pentru aceste studii au fost utilizați anticorpilor anti-PD-1 la 10, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, sau 0,1563  $\mu\text{g/mL}$  (de două ori diluții seriale). Cantitatea de shPD-1 His care se leagă la sPD-L1 imobilizat a fost evaluată prin marcarea His utilizând un anticorp secundar HRP marcat anti-His. Toate mostrele au fost analizate pe un cititor de placă (Victor 2 Wallace, Perkin Elmers). Rezultatele acestui experiment sunt prezentate în **Figurile 9A-9D**.

Rezultatele acestor teste de inhibare (**Figurile 9A-9D**) arată că anticorpilor anti-PD PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, și PD-1 mAb 15, au fost capabili să blocheze legarea la PD-L1 uman solubil până la PD-1 uman solubil în grade diferite în timp ce PD-1 mAb 2 și PD-1 mAb 4 au prezentat o activitate scăzută până la nici una în acest format de testare.

În al doilea test a fost examinată abilitatea anticorpilor anti-PD-1 murini PD-1 mAb 1-15 de a bloca legarea ligandului PD-1 (adică, PD-L1 uman sau PD-L2 uman) la PD-1 exprimată pe suprafața celulelor NSO. Pentru acest test fiecare din anticorpilor anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, sau un anticorp anti-PD-1 de referință (PD-1 mAb A sau PD-1 mAb B) a fost amestecat separat cu un PD-L1 uman solubil biotinitat (proteină de fuziune shPD-L1) sau proteină de fuziune PD-L2-mulGfFc umană solubilă biotinitată (shPD-L2; Ancell Cat# 573-030), fiecare la 0,1  $\mu\text{g/test}$ , și incubată cu celule NSO care exprimă PD-1 uman (~250,000 celule/godeu) în tampon de blocare (FACS + 10% albumină din ser uman). Pentru aceste studii au fost utilizați anticorpi anti-PD-1 la 4,0, 1,0, 2,5  $\times 10^{-1}$ , 6,25  $\times 10^{-2}$ , 1,56  $\times 10^{-2}$ , 3,90  $\times 10^{-3}$ , 9,76  $\times 10^{-4}$ , 2,4  $\times 10^{-4}$ , 0,6  $\times 10^{-4}$   $\mu\text{g/test}$  (de patru ori diluții seriale). Cantitatea de shPD-L1 (sau shPD-L2) care se leagă la suprafața celulelor NSO a fost determinată utilizând un anticorp secundar de streptavidină conjugat PE prin analiză FACS. Au fost determinate valorile IC<sub>50</sub> pentru inhibarea legării PD-1/PD-L1 și este furnizată media mostrei ( $\square$ ) din cel puțin două experimente (exceptând unde indicat) în **Tabelul 6**.

| <b>Tabelul 6</b>                              |                                                        |                           |                                                        |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Anticorp anti-PD-1</b>                     | <b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g/test}</math>)</b> | <b>Anticorp anti-PD-1</b> | <b>IC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{g/test}</math>)</b> |
| PD-1 mAb A                                    | 0,0044                                                 | PD-1 mAb 8                | 0,6611 $\ddagger$                                      |
| PD-1 mAb B                                    | 0,0064                                                 | PD-1 mAb 9                | 0,0154                                                 |
| PD-1 mAb 1                                    | 0,0048                                                 | PD-1 mAb 10               | 0,0057                                                 |
| PD-1 mAb 2                                    | 0,0110                                                 | PD-1 mAb 11               | 0,0259 $\ddagger$                                      |
| PD-1 mAb 3                                    | 0,0361 $\ddagger$                                      | PD-1 mAb 12               | 0,0238 $\ddagger$                                      |
| PD-1 mAb 4                                    | 0,0156 $\ddagger$                                      | PD-1 mAb 13               | 0,0117                                                 |
| PD-1 mAb 5                                    | 0,0039                                                 | PD-1 mAb 14               | 0,0149 $\ddagger$                                      |
| PD-1 mAb 6                                    | 0,0051                                                 | PD-1 mAb 15               | 0,0060                                                 |
| PD-1 mAb 7                                    | 0,0024                                                 |                           |                                                        |
| $\ddagger$ Rezultă dintr-un singur experiment |                                                        |                           |                                                        |

Rezultatele testelor de inhibare shPD-L1 (**Tabelul 6**) arată că anticorpilor anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, și PD-1 mAb 15, au fost capabili să blocheze legarea PD-L1 uman până la PD-1 uman exprimat pe suprafața celulelor NSO. În particular, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 10, și PD-1 mAb 15 au blocat legarea

shPD-L1 precum și la fel sau mai bine decât anticorpul PD-1 de referință (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B), în timp ce PD-1 mAb 8 a fost în mod esențial non-blocat în acest format de test. Ambii PD-1 mAb 2 și PD-1 mAb 4 au fost capabili să blocheze legarea PD-1/PD-L1 în acest format de test.

- 5 În mod similar, anticorpul anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, și PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, au fost capabili să blocheze legarea de PD-L2 uman la PD-1 uman exprimat pe suprafața celulelor NSO, în timp ce PD-1 mAb 8 a fost în mod esențial non-blocat în acest format de test. În particular, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, și PD-1 mAb 10 au blocat legarea shPD-L2 precum și la fel, sau mai bine decât anticorpul PD-1 de referință (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B).
- 10 Anticorpul PD-1 PD-1 mAb 11 și PD-1 mAb 15 nu au fost testați în acest test. Rezultatele pentru cațiva anticorpi anti-PD-1 umanizați incluzând hPD-1 mAb 15 sunt furnizate mai jos.

## Exemplul 2

### Umanizarea și caracterizarea suplimentară

- 15 Domeniile variabile ale anticorpilor anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 au fost umanizate, unde epitopii antigenici au fost identificați, anticorpul au fost deimmunizați în continuare pentru a genera domeniile variabile umanizate finale. Umanizarea PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, și PD-1 mAb 15 a dat un domeniu VH umanizat și un domeniu VL umanizat pentru fiecare anticorp denumite aici ca „hPD-1 mAb 1 VH1”, și „hPD-1 mAb 1 VL1”, „hPD-1 mAb 2 VH1”, și „hPD-1 mAb 2 VL1”, și „hPD-1 mAb 15 VH1”, și „hPD-1 mAb 15 VL1”. Umanizarea PD-1 mAb 7 a dat două domenii VH umanizate, denumite aici ca „hPD-1 mAb 7 VH1”, și „hPD-1 mAb 7 VH2”, și trei domenii VL umanizate denumite aici ca „hPD-1 mAb 1 VL1”, „hPD-1 mAb 7 VL2”, și „hPD-1 mAb 7 VL3”. Umanizarea PD-1 mAb 9 a dat două domenii VH umanizate, denumite aici ca „hPD-1 mAb 9 VH1”, și „hPD-1 mAb 9 VH2”, și două domenii VL umanizate denumite aici ca „hPD-1 mAb 9 VL1”, și „hPD-1 mAb 1 VL2”. Unde au fost generate mai multe domenii variabile umanizate, domeniile variabile umanizate ale lanțului greu și ușor ale unui anumit anticorp anti-PD-1 (de exemplu, PD-1 mAb 7) pot fi utilizate în orice combinație și combinațiile particulare de lanțuri umanizate sunt referite prin referința la domeniile VH/VL specifice, de exemplu un anticorp umanizat cuprinzând hPD-1 mAb 7 VH1 și hPD-1 mAb 7 VL2 este referit specific ca „hPD-1 mAb 7(1,2)”. Anticorpul umanizat cu lungime completă au fost generați fie cu o regiune constantă IgG1 umană cuprinzând substituțiile L234A/L235A (IgG1 (AA)) sau fie cu o regiune constantă IgG4 umană cuprinzând substituția S228P (IgG4 (P)).
- 30

Lanțurile grele ale anticorpului umanizat IgG1 cu lungime completă au fost construite după cum urmează: C-terminalul domeniului VH umanizat a fost fuzionat la N-terminalul unei regiuni constante IgG1 umane care are un domeniu CH2-CH3 variant (cuprinzând substituțiile L234A/L235A (AA)) și care nu are restul de lizină C-terminal (**SEQ ID NO:255**):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP  
KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVDS  
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCL  
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
35 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

În **SEQ ID NO:255**, resturile 1-98 de aminoacizi corespund domeniului CH1 IgG1 (**SEQ ID NO: 10**), resturile 99-113 de aminoacizi corespund regiunii balamă IgG1 (**SEQ ID NO: 32**) și resturile 114-329 de aminoacizi corespund domeniului CH2-CH3 IgG1 care cuprinde substituțiile L234A/L235A (subliniate) (**SEQ ID NO:5**) dar care nu au restul de lizină C-terminal.

- 40 Secvența de aminoacizi a unui lanț greu al unui exemplu de anticorp umanizat ((hPD-1 mAb 7(1,2)) având o regiune constantă a lanțului greu IgG1 care cuprinde mutația L234A/L235A și care nu are restul de lizină C-terminal este (**SEQ ID NO:265**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV  
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

In **SEQ ID NO: 265**, resturile 1-119 de aminoacizi corespund domeniului VH al hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO: 147**), resturile 120-217 de aminoacizi corespund domeniului CH1 IgG1 (**SEQ ID NO: 10**), resturile 218-232 corespund regiunii balama IgG1 (**SEQ ID NO: 32**) și resturile 233-448 corespund domeniului CH2-CH3 IgG1 cuprinzând substituțiile L234A/L235A (sublinate) (**SEQ ID NO:5**) dar care nu are restul de lizină C-terminal.

Lanțurile grele ale anticorpului umanizat IgG4 cu lungime completă au fost construite după cum urmează: C-terminalul domeniului VH umanizat a fost fuzionat la N-terminal dintr-o regiune constantă IgG4 umană având o regiune balama stabilizată (cuprinzând substituția S228P) și care nu are restul de lizină

C-terminal (**SEQ ID NO:256**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES  
KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED  
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPSSQEEMTK NQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG  
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LLSLGL

In **SEQ ID NO:256**, resturile 1-98 de aminoacizi corespund domeniului CH1 IgG4 (**SEQ ID NO:254**), resturile 99-110 de aminoacizi corespund regiunii balama IgG4 stabilizate care cuprinde substituțiile S228P (sublinate) (**SEQ ID NO: 13**) și resturile 111-326 de aminoacizi corespund domeniului CH2-CH3 IgG4 (**SEQ ID NO:4**) dar care nu are restul de lizină C-terminal.

Secvența de aminoacizi a unui lanț greu al unui exemplu de anticorp umanizat ((hPD-1 mAb 7(1,2)) având o regiune constantă a lanțului greu IgG4 cuprinzând o regiune balama stabilizată având mutația S228P și care nu are restul de lizină C-terminal, este (**SEQ ID NO:266**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD  
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAYVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGKTKY  
TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL  
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR  
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL  
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPDSIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDS  
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSLGL

In **SEQ ID NO:266**, resturile 1-119 de aminoacizi corespund domeniului VH al hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO:147**), resturile 120-217 de aminoacizi corespund domeniului CH1 IgG4 (**SEQ ID NO:254**), resturile 218-229 de aminoacizi corespund regiunii balama IgG4 stabilizate cuprinzând substituțiile S228P (sublinate) (**SEQ ID NO:13**) și resturile 230-445 de aminoacizi corespund domeniului CH2-CH3 IgG4 (**SEQ ID NO:4**) dar care nu are restul de lizină C-terminal.

Lanțurile ușoare ale anticorpului umanizat cu lungime completă au fost construite după cum urmează: C-terminalul domeniului VL umanizat a fost fuzionat la N-terminalul unei regiuni kapa a lanțului ușor uman (**SEQ ID NO:8**). Același lanț ușor este împerecheat cu lanțurile grele IgG1 (AA) și IgG4 (P).

Secvența de aminoacizi a unui lanț ușor al unui exemplu de anticorp PD-1 umanizat (hPD-1 mAb 7(1,2)) având o regiune constantă kapa este (**SEQ ID NO:264**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC

In **SEQ ID NO:264**, resturile 1-111 de aminoacizi corespund domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL2 (**SEQ ID NO:153**), și resturile 112-218 de aminoacizi corespund regiunii constantă kapa a lanțului ușor (**SEQ ID NO: 8**).

Anticorpii anti-PD-1 având regiuni constante alternative, de exemplu regiuni Fc modificate genetic, sunt cu ușurință generați prin incorporarea diferitelor regiuni constante și/sau prin introducerea uneia sau mai multor substituții de aminoacizi, adiiții sau deleții. De exemplu, unde este dorit un anticorp bispecific sunt utilizate domeniile CH2-CH3 care poartă nod și care poartă gaură pentru a facilita heterodimerizarea. Anticorpii anti-PD-1 himerici cuprinzând domeniile variabile murine și regiunile constante umane, sunt generați cum s-a descris mai sus.

Anticorpul umanizat (IgG1 (AA) și/sau IgG4 (P)) au fost testați pentru activitatea de legare și de blocare cum s-a descris mai sus. Legarea la PD-1 uman (shPD-1 His, și shPD-1 hFc) și la PD-1 de maimuță cynomolgus (shPD-L1 hFc) a anticorpilor umanizați a fost comparabilă cu cea a anticorpului murin corespunzător. În plus, anticorpul umanizat a reținut abilitatea de a bloca legarea PD-L1 uman la PD-1 uman într-un test ELISA.

Cineticile de legare ale anticorpilor murini PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 15, anticorpilor umanizați hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1,2), hPD-1 mAb 9(1,1), hPD-1 mAb 15, și anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B au fost investigate utilizând analiza Biacore. Anticorpul anti-PD-1 a fost capturat pe proteină A imobilizată și au fost incubati cu PD-1 uman solubil marcat His (shPD-1-His) sau cu fuziune de Fc PD-1 de maimuță cynomolgus umană solubilă (scyno PD-1 hFc) clivați pentru a îndepărta porțiunea Fc, și cineticile de legare au fost determinate prin analiză Biacore. În studiile suplimentare, anticorpul anti-PD-1 hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), și PD-1 mAb B IgG4 (P), au fost capturați pe Fc anti-uman de capră F(ab)<sub>2</sub> imobilizat și cineticile de legare au fost determinate prin analiză Biacore cum s-a descris mai sus. Valorile  $k_a$ ,  $k_d$  și KD calculate din aceste studii sunt prezentate în Tabelul 7.

| Tabelul 7                                                               |                                    |                                     |         |                                    |                                     |              |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| Captura proteinei A                                                     |                                    |                                     |         |                                    |                                     |              |
| Anticorp anti-PD-1                                                      | Uman <sup>a</sup>                  |                                     |         | Maimuță cynomolgus <sup>b</sup>    |                                     |              |
|                                                                         | k <sub>a</sub> (x10 <sup>4</sup> ) | k <sub>d</sub> (x10 <sup>-4</sup> ) | KD (nM) | k <sub>a</sub> (x10 <sup>4</sup> ) | k <sub>d</sub> (x10 <sup>-4</sup> d | KD (nM)      |
| PD-1 mAb A                                                              | 60                                 | 18                                  | 3       | 14                                 | 9,6                                 | 6,9          |
| PD-1 mAb B                                                              | 140                                | 35                                  | 2,5     | 37                                 | 12                                  | 3,2          |
| PD-1 mAb 7                                                              | 21                                 | 2,8                                 | 1,3     | 17                                 | 6                                   | 3,5          |
| hPD-1 mAb 7(1,2)                                                        | 110                                | 4,3                                 | 0,39    | 37                                 | 6,4                                 | 1,7          |
| PD-1 mAb 9                                                              | 4,3                                | 4,2                                 | 9,8     | 2,2                                | 16                                  | 72,7         |
| hPD-1 mAb 9(1,1)                                                        | 1,8                                | 6,5                                 | 36,1    | 1,5                                | 11                                  | 73,3         |
| PD-1 mAb 15                                                             | 4,5                                | 1,3                                 | 2,9     | 2,7                                | 11                                  | 40,7         |
| hPD-1 mAb 15                                                            | 2,4                                | 3,2                                 | 13,3    | 2,3                                | 18                                  | 78,3         |
| PD-1 mAb 2                                                              | 5,5                                | 5,6                                 | 10,2    | 4,2                                | 6,0                                 | 14,3         |
| hPD-1 mAb 2                                                             | 3,2                                | 1,6                                 | 5,0     | 2,3                                | 3,9                                 | 17           |
| Captură Fc anti-uman de capră F(ab) <sub>2</sub>                        |                                    |                                     |         |                                    |                                     |              |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)                                                    |                                    |                                     | 13      | 8,4                                | 6,5                                 | 8,1 4,5 5,6  |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)                                                     |                                    |                                     | 13      | 7,9                                | 6,1                                 | 8,4 5,0 6,0  |
| PD-1 mAb B IgG1 (AA)                                                    |                                    |                                     | 25      | 28                                 | 11,2                                | 20 6,4 3,2   |
| PD-1 mAb B IgG4 (P)                                                     |                                    |                                     | 26      | 25                                 | 9,6                                 | 20 7,9 4,0   |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA)                                              |                                    |                                     | 25      | 3,8                                | 1,5                                 | 16 7,8 4,9   |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P)                                               |                                    |                                     | 27      | 4,1                                | 1,5                                 | 17 7,8 4,6   |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA)                                              |                                    |                                     | 5,6     | 6,1                                | 10,9                                | 5,6 5,2 9,3  |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P)                                               |                                    |                                     | 6,1     | 5,8                                | 9,5                                 | 4,9 7,4 15,1 |
| <sup>a</sup> PD-1 uman solubil matcat His (shPD-1 His)                  |                                    |                                     |         |                                    |                                     |              |
| <sup>b</sup> PD-1 solubil de maimuță cynomolgus (scyno PD-1 hFc) clivat |                                    |                                     |         |                                    |                                     |              |

Rezultatele demonstrează că PD-1 mAb 7 și hPD-1 mAb 7(1,2) umanizați prezintă cinetici de legare mai bune față de anticorpul anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B. PD-1 mAb 2, și hPD-1 mAb 2 prezintă cinetici de legare în limita a aproximativ de două ori a anticorpilor anti-PD-1 de referință în timp ce PD-1 mAb 9, hPD-1 mAb 9(1,1), PD-1 mAb 15, și hPD-1 mAb 15 prezintă cinetici de legare în limita a aproximativ de 2-6 ori a anticorpilor anti-PD-1 de referință.

A fost investigată specificitatea țesutului anticorpului PD-1 anti-uman PD-1 mAb 7. Țesutul normal a fost pus în contact cu PD-1 mAb 7 sau cu un control cu izotip (0,313  $\mu\text{g/mL}$ ) și s-a vizualizat extinderea colorării. Bloxall a fost utilizat pentru blocarea enzimei endogene pentru a reduce colorarea mucinei non-specifice în țesutul colonului. Așa cum se arată în **Figura 10A, Panourile i-xii**, PD-1 mAb 7 și controlul cu izotip au eșuat ambele în marcarea celulelor de colon normal, ficat, plămân, pancreas, rinichi și țesut al inimii. În plus, PD-1 mAb 7 și controlul cu izotip au eșuat în colorarea normală a pielii (**Figura 10B, panourile i-ii**). În schimb, s-a descoperit că PD-1 mAb 7 marchează puternic limfocitele prezente în țesutul tonsil normal și celulele NSO transfectate PDCD1 care exprimă PD-1 (**Figura 10B, Panourile iii și v**), în timp ce controlul cu izotip a eșuat să fie marcat (**Figura 10B, Panourile iv și vi**). Rezultatele prezentate în **Figurile 10A-10B** au indicat astfel că PD-1 mAb 7 a fost capabil de legare specifică la limfocite și la celulele care exprimă PD-1.

A fost examinat profilul saturației de legare al hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), și al anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B. Pe scurt, fiecare din anticorpilor anti-PD-1, PD-1 mAb 1-15, sau anticorpilor anti-PD-1 de referință (PD-1 mAb A și PD-1 mAb B) a fost amestecat cu celule NSO care exprimă PD-1 uman ( $\square 250.000$  celule/godeu) în tampon de blocare (FACS + 10% albumină din ser uman). Pentru aceste studii, anticorpilor anti-PD-1 au fost utilizați la 50, 12,5, 3,13, 2,0  $\times 10^{-1}$ , 4,9  $\times 10^{-2}$ , 1,2  $\times 10^{-2}$ , 3,0  $\times 10^{-3}$ , 1,9  $\times 10^{-4}$ , 7,6  $\times 10^{-4}$ , 4,75  $\times 10^{-5}$ , sau 1,19  $\times 10^{-5}$   $\mu\text{g/test}$  (de patru ori diluții seriale). Cantitatea de legare a anticorpului la suprafața celulelor NSO a fost determinată utilizând anticorpul secundar anti-uman-APC de capră prin analiză FACS. Curbele reprezentative de saturație sunt prezentate în **Figura 11**. Valorile EC50 și EC90 au fost determinate și media mostrei (SM) și deviația standard (SD  $\sigma$ ) din patru experimente separate sunt furnizate în **Tabelul 8**.

| <b>Tabelul 8</b>           |                                             |                               |                                             |                               |
|----------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|
|                            | <b>Legare la saturație</b>                  |                               |                                             |                               |
|                            | <b>EC50 (<math>\mu\text{g/test}</math>)</b> |                               | <b>EC90 (<math>\mu\text{g/test}</math>)</b> |                               |
|                            | <b>SM</b>                                   | <b>SD <math>\sigma</math></b> | <b>SM</b>                                   | <b>SD <math>\sigma</math></b> |
| <b>Anticorp anti-PD-1</b>  |                                             |                               |                                             |                               |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)       | 0,1991                                      | 0,1309                        | 1,4528                                      | 0,8040                        |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)        | 0,1581                                      | 0,1161                        | 1,5464                                      | 1,7690                        |
| PD-1 mAb B IgG1 (AA)       | 0,1347                                      | 0,0681                        | 1,3917                                      | 0,9573                        |
| PD-1 mAb B IgG4 (P)        | 0,1398                                      | 0,0951                        | 1,1619                                      | 1,2681                        |
| hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)      | 0,4431                                      | 0,1997                        | 2,4374                                      | 1,2637                        |
| hPD-1 mAb 7(1,1) IgG1 (AA) | 0,1069                                      | 0,0500                        | 0,9102                                      | 0,5476                        |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA) | 0,1872                                      | 0,1553                        | 0,6810                                      | 0,3226                        |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P)  | 0,1376                                      | 0,0926                        | 0,6609                                      | 0,3437                        |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA) | 0,3123                                      | 0,2291                        | 1,6486                                      | 0,9117                        |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P)  | 0,5128                                      | 0,2228                        | 3,0563                                      | 0,9437                        |
| hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)     | 0,2927                                      | 0,1333                        | 2,0640                                      | 0,6096                        |

Studiile saturației de legare demonstrează că versiunile umanizate ale PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 au profile favorabile pentru legarea la suprafața celulară PD-1. În particular, PD-1 mAb 7 umanizat (hPD-1 mAb 7(1,1), și hPD-1 mAb 7(1,2) având fie o regiune Fc IgG1 (AA) sau fie o regiune Fc IgG4 (P)) au cele mai scăzute valori EC90 dintre toți anticorpilor examinați.

Pentru a caracteriza suplimentar anticorpilor anti-PD-1 umanizați hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P), și hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), a fost examinată abilitatea lor de a bloca legarea PD-L1 uman (shPD-L1) și PD-L2 uman (shPD-L2) la PD-1 exprimat pe suprafața celulelor NSO. Aceste teste au fost efectuate în mod esențial cum s-a descris mai sus. Curbele reprezentative pentru inhibarea legării sPD-L1 și sPD-L2 la PD-1 exprimat pe celulele NSO sunt prezentate în **Figurile 12A** și respectiv **12B**. Valorile IC50 și IC90 au fost determinate și media mostrei (SM) și deviația standard (SD  $\sigma$ ) din trei experimente separate sunt furnizate în **Tabelul 9**.

| Tabelul 9        |           |                |        |                |        |                |        |                |        |
|------------------|-----------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
|                  |           | sPD-L1         |        |                |        | sPD-L2         |        |                |        |
|                  |           | IC50 (μg/test) |        | IC90 (μg/test) |        | IC50 (μg/test) |        | IC90 (μg/test) |        |
| Anticorp         | anti-PD-1 | SM             | SD σ   | SM             | SD σ   | SM             | SD σ   | SM             | SD σ   |
| PD-1 mAb A       | IgG1 (AA) | 0,0203         | 0,0089 | 0,2985         | 0,3279 | 0,0414         | 0,0124 | 0,1601         | 0,066  |
| PD-1 mAb A       | IgG4 (P)  | 0,0156         | 0,0096 | 0,0776         | 0,0208 | 0,0280         | 0,0070 | 0,1594         | 0,1153 |
| PD-1 mAb B       | IgG1 (AA) | 0,0148         | 0,0008 | 0,1034         | 0,0100 | 0,0280         | 0,0059 | 0,1190         | 0,060  |
| PD-1 mAb B       | IgG4 (P)  | 0,0143         | 0,0013 | 0,0798         | 0,0239 | 0,0280         | 0,0055 | 0,0924         | 0,0065 |
| hPD-1 mAb 2      | IgG1 (AA) | 0,0578         | 0,0124 | 0,2480         | 0,050  | 0,1294         | 0,0143 | 0,3813         | 0,0656 |
| hPD-1 mAb 7(1,1) | IgG1 (AA) | 0,0166         | 0,0032 | 0,0674         | 0,0041 | 0,0283         | 0,0147 | 0,0886         | 0,0166 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) | IgG1 (AA) | 0,0118         | 0,0027 | 0,0678         | 0,0031 | 0,0212         | 0,0031 | 0,0672         | 0,0043 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) | IgG4 (P)  | 0,0103         | 0,0023 | 0,0520         | 0,0033 | 0,0213         | 0,0019 | 0,0616         | 0,0063 |
| hPD-1 mAb 9(1,1) | IgG1 (AA) | 0,0593         | 0,0036 | 0,3238         | 0,0508 | 0,4002         | 0,5000 | 0,4573         | 0,1805 |
| hPD-1 mAb 9(1,1) | IgG4 (P)  | 0,0460         | 0,0118 | 0,2461         | 0,0513 | 0,1105         | 0,0146 | 0,2914         | 0,0526 |
| hPD-1 mAb 15     | IgG1 (AA) | 0,0440         | 0,0092 | 0,2068         | 0,035  | 0,0945         | 0,0022 | 0,3093         | 0,0588 |

Studiile de inhibare a legării ligandului demonstrează că versiunile umanizate de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 sunt capabile să inhibe legarea sPD-L1 și sPD-L2 la PD-1 pe suprafața celulei. În particular, PD-1 mAb 7 umanizat (hPD-1 mAb 7(1,1), și hPD-1 mAb 7(1,2)) au cele mai scăzute valori IC90 dintre toți anticorpii examinați.

### Exemplul 3

#### Blocada punctului de control PD-1/PD-L1 prin anticorpi PD-1 anti-umani umanizați

Abilitatea hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), și a anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B de a antagoniza axa PD-1/PD-L1 (adică, de a bloca interacțiunea PD-1/PD-L1 și a preveni reglarea negativă a răspunsurilor celulei T) a fost examinată într-un test reporter luciferază Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1. Pe scurt, celulele CHO care exprimă PD-L1 (CHO/PD-L1) au fost placcate la 40.000/godeu în 100 μL de mediu de cultură (RPMI + 10% FBS + 100 μg/mL higromicină B + 100 μg/mL G418) și incubate peste noapte. În următoarea zi mediul a fost îndepărtat și s-au adugat celule MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat (Promega) la 50.000 celule/godeu în 40 μL de tampon de testare (RPMI + 2% FBS), și anticorpi anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, sau un anticorp anti-PD-1 de referință (PD-1 mAb A și PD-1 mAb B) (0-25 μg/mL; de opt 2,5 ori diluții seriale în tampon de testare) în fiecare godeu și s-au incubat timp de 6 ore la 37°C urmate de o incubare de 5-10 minute la temperatura ambiantă. S-au adăugat apoi 80 μL de substrat BioGlo (Promega) în fiecare godeu și placa a fost incubată timp de încă 5-10 minute suplimentare la temperatura ambiantă, luminescența a fost măsurată într-un cititor de placă Victor. Curbele reprezentative de saturație sunt prezentate în **Figura 13**. Au fost determinate valorile EC50 și EC90 și media mostrei (SM) și deviația standard (SD σ) din patru experimente separate sunt furnizate în **Tabelul 10**.

Tabelul 10

| Anticorp anti-PD-1         | Semnalizare reporter |        |                |        |
|----------------------------|----------------------|--------|----------------|--------|
|                            | EC50 (µg/test)       |        | EC90 (µg/test) |        |
|                            | SM                   | SD σ   | SM             | SD σ   |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)       | 0,2549               | 0,0480 | 2,4474         | 1,2228 |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)        | 0,2049               | 0,0719 | 2,5535         | 1,2139 |
| PD-1 mAb B IgG1 (AA)       | 0,2119               | 0,1781 | 2,2036         | 2,0118 |
| PD-1 mAb B IgG4 (P)        | 0,1142               | 0,0323 | 0,9418         | 0,2863 |
| hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)      | 0,3539               | 0,0983 | 3,8975         | 2,0054 |
| hPD-1 mAb 7(1,1) IgG1 (AA) | 0,1080               | 0,0386 | 1,1992         | 0,5103 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA) | 0,0944               | 0,0153 | 0,6452         | 0,2615 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P)  | 0,0965               | 0,0169 | 0,6885         | 0,1858 |
| hPD-1 mAb 9 IgG1 (AA)      | 0,2835               | 0,0530 | 2,9968         | 0,8866 |
| hPD-1 mAb 9 IgG4 (P)       | 0,3154               | 0,0872 | 5,0940         | 4,0496 |
| hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)     | 0,2585               | 0,0592 | 3,3138         | 1,0532 |

Studiile de semnalizare reporter demonstrează că versiunile umanizate de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 pot bloca axa PD-1/PD-L1 și vor preveni reglarea negativă a răspunsurilor celulei T. În particular, PD-1 mAb 7 umanizat (hPD-1 mAb 7(1,1), și hPD-1 mAb 7(1,2) având fie o regiune Fc IgG1 (AA) sau fie o regiune Fc IgG4 (P)) au cele mai scăzute valori EC50/EC90.

#### Exemplul 4

##### Activitatea funcțională a anticorpilor PD-1 anti-umani

Enterotoxina de tip B *Staphylococcus aureus* (SEB) este un superantigen microbial capabil de activarea unei proporții mari de celule T (5-30%) la donatorii responsivi la SEB. SEB se leagă la MHC II în afara grupului de legare al peptidei și astfel este dependent de MHC II, dar nerestricționat și mediat de TCR. Stimularea SEB a celulelor T conduce la proliferarea oligoclonală a celulelor T și producția de citokine (deși poate fi observată variabilitatea donatorului și unii donatori nu vor răspunde). În 48 ore de stimulare cu SEB, PMBC-urile reglează pozitiv PD-1 și LAG-3 cu o sporire suplimentară văzută în ziua 5, după cultura secundară într-o placă cu 96 de godeuri cu stimulare cu SEB. Reglarea pozitivă a proteinelor PD-1 și LAG-3 ale punctului de control imun după stimularea cu SEB a PBMC-urilor limitează eliberarea citokinelor după restimulare. A fost examinată abilitatea anticorpilor anti-PD-1 singuri și în combinație cu anticorpi anti-LAG-3 de a spori eliberarea citokinelor prin inhibarea punctului de control.

Pe scurt, PBMC-urile au fost purificate utilizând metode de centrifugare cu gradient de densitate Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului din sângele integral obținut sub consimțământ informat de la donatori sănătoși (Biological Specialty Corporation) și celulele T au fost apoi purificate utilizând trusa de celule T umane neatinsse Dynabeads® (Life Technologies) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. PBMC-urile purificate au fost cultivate în mediu RPMI + 10% FBS inactivat termic + 1% penicilină/streptomycină în flacoane vrac T-25 timp de 2-3 zile singure sau cu SEB (Sigma-Aldrich) la 0,1 ng/mL (stimulare primară). La sfârșitul primei runde de stimulare SEB, PBMC-urile au fost spălate de două ori cu PBS și placate imediat în plăci de cultură de țesut cu 96 de godeuri la o concentrație de  $1-5 \times 10^5$  celule/godeu în mediu singur, mediu cu un control sau un anticorp anti-PD-1, mediu cu SEB la 0,1 ng/mL (stimulare secundară) și nici un anticorp, sau mediu cu SEB și un control IgG sau un anticorp anti-PD-1 +/- un anti-LAG-3 mAb, și cultivate timp de 2-3 zile suplimentare. La sfârșitul celei de a doua stimulări, supernatantii au fost recoltați pentru a măsura secreția de citokine utilizând truse ELISA umane DuoSet pentru IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, și IL-4 (R&D Systems) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului.

A fost examinată abilitatea PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 singuri, sau în combinație cu anticorpii unici anti-LAG-3 LAG-3 mAb 1 de a spori eliberarea citokinelor prin inhibarea punctului de control. Aceste studii au inclus de asemenea unul sau mai mulți din următorii anticorpi anti-PD-1 de referință: PD-1 mAb A; PD-1 mAb B; și LAG-3 mAb A, singur sau în combinație. **Figura 14** prezintă profilele de secreție IFN $\gamma$  din PBMC-urile stimulate SEB (0,1 ng/mL) de la un donator responsiv reprezentativ (D:38941), tratat cu: nici un anticorp; anticorp de control al

izotipului; PD-1 mAb 7 și/sau LAG-3 mAb 7; PD-1 mAb 9 și/sau LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 15 și/sau LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 2 și/sau LAG-3 mAb 1; sau anticorpi anti-PD-1 de referință PD-1 mAb B și/sau LAG-3 mAb A (anticorpii au fost utilizați la 10 μg/mL).

- În studii suplimentare, a fost examinată abilitatea versiunilor umanizate ale PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 (cuprinzând o regiune Fc IgG1 umană (AA) sau o regiune Fc IgG4 umană (P)) precum și a anticorpilor anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B de a spori eliberarea citokinelor prin inhibarea punctului de control. Pentru aceste studii anticorpii au fost utilizați la 0,625, 2,5, și 10 μg/mL. **Figurile 15A-15B** prezintă IFN $\gamma$  (**Figura 15A**) și TNF $\alpha$  (**Figura 15B**), profilurile de secreție de la PBMC-urile stimulate cu SEB (0,2 ng/mL) de la un donator respondent reprezentativ (D:57709), tratat fără anticorp sau cu unul dintre următorii anticorpi: control cu izotip; hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P); hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P); hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA); sau anticorpii anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), PD-1 mAb B IgG4 (P). A fost determinat pg/mg total al IFN $\gamma$  în mostrele tratate cu SEB+Ab pentru mostrele tratate cu anticorpi anti-PD-1 la 0,625, 2,5 și 10 μg/mL și media mostrei (SM) și deviația standard (SD  $\sigma$ ) de la 3 donatori respondenți diferiți (cu excepția unde este notat) sunt furnizate în **Tabelul 11**. Raportul de IFN $\gamma$  secretată în mostra tratată cu versiunile umanizate ale PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 (cuprinzând o regiune Fc IgG1 umană (AA) sau o regiune Fc IgG4 umană (P)) față de anticorpii anti-PD-1 de referință PD-1 mAb A și PD-1 mAb B (adică, anti-PD-1/PD-1 mAb A umanizat, și anti-PD-1/PD-1 mAb B umanizat) este prezentat în **Tabelul 12** și respectiv **Tabelul 13**.

**Tabelul 11**

|                                              | Secreție de IFN $\gamma$ (pg/mL) |              |                |             |               |             |
|----------------------------------------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------|---------------|-------------|
| $\mu$ g/mL anticorp anti-PD1                 | 0,625 $\mu$ g/mL                 |              | 2,5 $\mu$ g/mL |             | 10 $\mu$ g/mL |             |
| Anticorp anti-PD-1                           | SM                               | SD $\sigma$  | SM             | SD $\sigma$ | SM            | SD $\sigma$ |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)                         | 221,18                           | 110,89       | 341,13         | 247,93      | 347,46        | 144,72      |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)                          | 281,36                           | 132,65       | 495,15         | 190,57      | 399,41        | 117,56      |
| PD-1 mAb B IgG1 (AA)                         | 366,69                           | 196,64       | 387,682        | 215,51      | 387,32        | 282,81      |
| PD-1 mAb B IgG4 (P)                          | 348,40                           | 185,96       | 433,382        | 163,23      | 551,68        | 125,08      |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA)                   | 302,05                           | 185,71       | 610,70         | 209,77      | 414,63        | 272,65      |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P)                    | 384,57 $\pm$                     | 323,79 $\pm$ | 411,40         | 398,59      | 370,06        | 108,12      |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA)                   | 340,81                           | 207,76       | 442,598        | 303,70      | 655,29        | 567,91      |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P)                    | 309,82                           | 130,30       | 468,62         | 350,15      | 424,35        | 288,95      |
| hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)                       | 360,00                           | 274,28       | 373,32         | 160,25      | 541,83        | 444,22      |
| hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)                        | 275,88                           | 135,23       | 372,73         | 53,53       | 496,70        | 235,37      |
| Control IgG                                  | 137,14                           | 76,61        | 100,65         | 48,67       | 138,10        | 120,81      |
| No Anticorp                                  | 120,05                           | 73,90        | 120,05         | 73,90       | 109,46        | 85,18       |
| $\pm$ Rezultă de la doi donatori respondenți |                                  |              |                |             |               |             |

**Tabelul 12**

|                              | Raport de secreție IFN $\gamma$ (anti-PD-1/PD-1 mAb A nou) |                |               |
|------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------|---------------|
| $\mu$ g/mL anticorp anti-PD1 | 0,625 $\mu$ g/mL                                           | 2,5 $\mu$ g/mL | 10 $\mu$ g/mL |

| Anticorp anti-PD-1         | SM    | SD $\sigma$ | SM   | SD $\sigma$ | SM   | SD $\sigma$ |
|----------------------------|-------|-------------|------|-------------|------|-------------|
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)       | 1,00  | 0,00        | 1,00 | 0,00        | 1,00 | 0,00        |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)        | 1,00  | 0,00        | 1,00 | 0,00        | 1,00 | 0,00        |
| PD-1 mAb B IgG1 (AA)       | 1,77  | 0,92        | 1,28 | 0,36        | 1,07 | 0,42        |
| PD-1 mAb B IgG4 (P)        | 1,23  | 0,16        | 0,92 | 0,27        | 1,40 | 0,12        |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA) | 1,36  | 0,37        | 2,46 | 1,85        | 1,17 | 0,41        |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P)  | 1,20+ | 0,35‡       | 0,79 | 0,54        | 0,95 | 0,22        |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA) | 1,48  | 0,19        | 1,46 | 0,71        | 1,70 | 0,84        |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P)  | 1,13  | 0,13        | 0,91 | 0,42        | 1,02 | 0,46        |
| hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)     | 1,50  | 0,39        | 1,51 | 1,23        | 1,48 | 0,71        |
| hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)      | 1,32  | 0,53        | 1,48 | 0,86        | 1,42 | 0,12        |
| Control IgG                | 0,63  | 0,2         | 0,33 | 0,08        | 0,39 | 0,24        |
| No Anticorp                | 0,54  | 0,12        | 0,39 | 0,14        | 0,31 | 0,17        |

‡ Rezultă de la doi donatori respondenți

Tabelul 13

| Raport de secreție IFN $\gamma$ (anti-PD-1/PD-1 mAb B nou) |                        |             |                      |             |                     |             |
|------------------------------------------------------------|------------------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------|-------------|
| $\mu\text{g/mL}$ anticorp anti-PD1                         | 0,625 $\mu\text{g/mL}$ |             | 2,5 $\mu\text{g/mL}$ |             | 10 $\mu\text{g/mL}$ |             |
| Anticorp anti-PD-1                                         | SM                     | SD $\sigma$ | SM                   | SD $\sigma$ | SM                  | SD $\sigma$ |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)                                       | 0,37                   | 0,37        | 0,82                 | 0,20        | 1,06                | 0,48        |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)                                        | 0,82                   | 0,12        | 1,16                 | 0,38        | 0,72                | 0,07        |
| PD-1 mAb B IgG1 (AA)                                       | 1,0                    | 0,00        | 1,0                  | 0,00        | 1,0                 | 0,00        |
| PD-1 mAb B IgG4 (P)                                        | 1,0                    | 0,00        | 1,0                  | 0,00        | 1,0                 | 0,00        |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA)                                 | 0,84                   | 0,22        | 1,77                 | 0,81        | 1,11                | 0,07        |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P)                                  | 0,91‡                  | 0,26‡       | 0,83                 | 0,50        | 0,68                | 0,17        |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG1 (AA)                                 | 1,04                   | 0,59        | 1,12                 | 0,29        | 1,60                | 0,42        |
| hPD-1 mAb 9(1,1) IgG4 (P)                                  | 0,92                   | 0,09        | 0,99                 | 0,36        | 0,75                | 0,39        |
| hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)                                     | 1,01                   | 0,48        | 1,07                 | 0,57        | 1,34                | 0,15        |
| hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)                                      | 0,78                   | 0,12        | 1,10                 | 0,38        | 1,46                | 0,53        |
| Control cu IgG                                             | 0,39                   | 0,08        | 0,27                 | 0,08        | 0,34                | 0,13        |
| Nici un anticorp                                           | 0,34                   | 0,11        | 0,31                 | 0,03        | 0,28                | 0,08        |

‡ Rezultă de la doi donatori respondenți

- 5 Rezultatele acestor studii demonstrează că anticorpul PD-1 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, și PD-1 mAb 15 au sporit dramatic producția de IFN $\gamma$  (Figurile 14 și 15A, și Tabelele 11-13), și TNF $\alpha$  (Figura 15B) de la PBMC-urile stimulate cu SEB după restimulare. În plus, combinația de anticorpi anti-PD-1 cu anticorpi anti-LAG-3 a condus la o sporire suplimentară a eliberării de citokine (Figura 14) de la PBMC-urile stimulate cu SEB după restimulare. În particular, combinația de

PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, sau PD-1 mAb 15 cu anticorpii anti-LAG-3 unic LAG-3 mAb 1 a furnizat cea mai mare sporire.

#### Exemplul 5

#### Studii de legare ale moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3

- 5 A fost generat un număr de molecule bispecifice PD-1 x LAG-3, incluzând diacorpi care conțin regiunea Fc, cuprinzând trei, patru, și cinci lanțuri și un anticorp bispecific. Au fost generați patru diacorpi având patru lanțuri și cuprinzând domenii de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate și li s-au acordat denumirile „DART A“, „DART B“, „DART C“, și „DART I“. Au fost generați patru diacorpi având patru lanțuri și cuprinzând domeniile CH1/CL și li s-au acordat denumirile „DART D“, „DART E“, „DART J“, și „DART I“. Au fost generați doi diacorpi având cinci lanțuri și cuprinzând domeniile de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate și domeniile CH1/CL și li s-au acordat denumirile „DART F“, și „DART G“. A fost generat un diacorp având trei lanțuri și cuprinzând domeniile de promovare ale heterodimerului E/K-spiralate și i-a fost acordată denumirea „DART H“. A fost generat un anticorp bispecific având patru lanțuri și i-a fost acordată denumirea „BSAB A“. Structura și secvențele de aminoacizi ale acestor molecule bispecifice PD-1 x LAG-3 sunt furnizate mai sus și sunt rezumate în **Tabelul 14** mai jos.

| Tabelul 14 |                   |                 |         |                                                                                         |                                        |
|------------|-------------------|-----------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Nume       | mAb-uri parentale | Fc <sup>‡</sup> | Lanțuri | SEQ ID NO:                                                                              | Alte componente                        |
| DART A     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4 (YTE)      | 4       | 267 (X <sub>1</sub> =A; X <sub>2</sub> =Y; X <sub>3</sub> =T; X <sub>4</sub> =E) și 268 | E/K-spiralate; vezi Figura 3B          |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART B     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4 (YTE)      | 4       | 267 (X <sub>1</sub> =G; X <sub>2</sub> =Y; X <sub>3</sub> =T; X <sub>4</sub> =E) și 268 | E/K-spiralate; vezi Figura 3B          |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,3) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART C     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4            | 4       | 267 (X <sub>1</sub> =G; X <sub>2</sub> =M; X <sub>3</sub> =S; X <sub>4</sub> =T) și 268 | E/K-spiralate; vezi Figura 3B          |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,3) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART D     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4 (YTE)      | 4       | 269 și 270                                                                              | CL/CH1; vezi Figura 3C                 |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART E     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4 (YTE)      | 4       | 271 și 272                                                                              | CL/CH1; vezi Figura 3C                 |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART F     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG1 (AA/YTE)   | 5       | 273, 274, 275, și 276                                                                   | CL/CH1 și E/K-spiralate; vezi Figura 5 |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART G     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG1 (AA/YTE)   | 5       | 277, 278, 279, și 280                                                                   | CL/CH1 și E/K-spiralate; vezi Figura 5 |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                                                                                         |                                        |
| DART H     | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG1 (AA)       | 3       | 281, 282, și 283                                                                        | E/K spiralate; Vezi Figura 4A          |
|            | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                                                                                         |                                        |

**Tabelul 14**

| Nume   | mAb-uri parentale | Fc <sup>‡</sup> | Lanțuri | SEQ ID NO:            | Alte componente                                  |
|--------|-------------------|-----------------|---------|-----------------------|--------------------------------------------------|
| DART I | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4 (YTE)      | 4       | 290 și 291            | E/K-spiralate; vezi Figura 3B                    |
|        | hLAG-3 mAb 6(1,1) |                 |         |                       |                                                  |
| DART J | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG4 (YTE)      | 4       | 292 și 293            | CL/CH1; vezi Figura 3C                           |
|        | hLAG-3 mAb 6(1,1) |                 |         |                       |                                                  |
| DART 1 | PD-1 mAb A        | IgG1 (AA)       | 4       | 284 și 285            | CL/CH1; vezi Figura 3C                           |
|        | LAG-3 mAb A       |                 |         |                       |                                                  |
| BSAB A | hPD-1 mAb 7(1,2)  | IgG1 (AA)       | 4       | 286, 287, 288, și 289 | mAb cu încărcarea regiunii Fc modificată genetic |
|        | hLAG-3 mAb 1(1,4) |                 |         |                       |                                                  |

<sup>‡</sup> Molecule care încorporează regiunile Fc IgG4 de asemenea încorporate ale regiunii balama IgG4 stabilizate.

Moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 suplimentare care cuprind situsuri alternative de legare la epitop PD-1 și/sau LAG-3 pot fi cu ușurință generate prin încorporarea diferitelor domenii VH și VL. În mod similar, legarea moleculelor la un antigen altul decât LAG-3 poate fi generată prin încorporarea VH și VL având specificitatea dorită.

Profilurile de legare de saturație ale construcțiilor de diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, și DART 1; anticorpii anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) și PD-1 mAb A IgG4 (P); și anticorpii anti-LAG-3: hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG1 (AA), și LAG-3 mAb A IgG1 (AA) au fost examinate în mod esențial cum s-a descris mai sus. Construcțiile de diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3 au fost testate pentru ambele legări PD-1 și LAG-3, în timp ce anticorpii anti-PD-1 și anti-LAG-3 au fost testați doar pentru legarea la respectivii lor antigeni. Pentru aceste studii, au fost utilizate celule NSO care exprimă PD-1 sau LAG-3. Au fost utilizați diacorpi și anticorpi (170,0-0,013  $\mu$ M sau 85,0-0,0021  $\mu$ M (de patru ori diluții seriale). Valorile EC<sub>50</sub> și EC<sub>90</sub> au fost determinate și sunt prezentate în **Tabelele 15-16**. Unde au fost efectuate 2 sau mai multe experimente separate, sunt furnizate media mostrei (SM) și deviația standard (SD  $\sigma$ ).

**Tabelul 15**

| Moleculă                  | Saturație de legare PD-1    |             |                             |             |
|---------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
|                           | EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |             | EC <sub>90</sub> ( $\mu$ M) |             |
|                           | SM                          | SD $\sigma$ | SM                          | SD $\sigma$ |
| DART A                    | 1,9297                      | 0,4324      | 9,6027                      | 0,4801      |
| DART B                    | 1,7640 <sup>§</sup>         |             | 12,2700 <sup>§</sup>        |             |
| DART D                    | 2,2267                      | 0,4140      | 10,9313                     | 2,6351      |
| DART E                    | 3,2180                      | 0,5742      | 23,840                      | 3,2385      |
| DART F                    | 1,4320 <sup>§</sup>         |             | 14,5800 <sup>§</sup>        |             |
| DART G                    | 1,1488                      | 0,6227      | 3,4220                      | 2,4600      |
| DART H                    | 4,5310 <sup>§</sup>         |             | 22,6600 <sup>§</sup>        |             |
| DART I                    | 1,3232                      | 0,4890      | 7,8135                      | 4,0821      |
| DART 1                    | 2,1329                      | 1,4850      | 13,8113                     | 9,0256      |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P) | 1,2083                      | 0,8112      | 3,9340                      | 1,8746      |

| Tabelul 15                           |                           |        |                     |         |
|--------------------------------------|---------------------------|--------|---------------------|---------|
| Moleculă                             | Saturație de legare PD-1  |        |                     |         |
|                                      | EC50 (μM)                 |        | EC90 (μM)           |         |
|                                      | SM                        | SD σ   | SM                  | SD σ    |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)                  | 2,3470                    | 1,2362 | 22,7770             | 15,0690 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA)           | 1,0879                    | 0,3958 | 7,4153              | 3,0794  |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)                 | 1,6733                    | 0,5464 | 9,9543              | 6,6569  |
| § rezultă dintr-un singur experiment |                           |        |                     |         |
| Tabelul 16                           |                           |        |                     |         |
| Moleculă                             | Saturație de legare LAG-3 |        |                     |         |
|                                      | EC50 (μM)                 |        | EC90 (μM)           |         |
|                                      | SM                        | SD σ   | SM                  | SD σ    |
| DART A                               | 0,8402                    | 0,2231 | 4,4448              | 2,4770  |
| DART B                               | 1,0750 <sup>§</sup>       |        | 9,8580 <sup>§</sup> |         |
| DART D                               | 0,8985                    | 0,5326 | 5,7967              | 4,7329  |
| DART E                               | 0,9250                    | 0,8075 | 5,6450              | 5,6809  |
| DART F                               | 5,0090                    | 0,5770 | 19,3350             | 4,7447  |
| DART G                               | 0,9396                    | 0,3045 | 8,5507              | 4,7448  |
| DART H                               | 2,3840 <sup>§</sup>       |        | 9,7810              | 4,2412  |
| DART I                               | 0,5321                    | 0,0547 | 4,198               | 3,2188  |
| DART 1                               | 20,0233                   | 2,1454 | 115,97              | 15,2425 |
| hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG4 (P)           | 1,0057                    | 0,1969 | 5,1360              | 4,7904  |
| LAG-3 mAb A IgG4 (P)                 | 0,5968                    | 0,1376 | 2,0833              | 0,3244  |
| hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG1 (AA)          | 0,6069                    | 0,3430 | 3,6373              | 2,4762  |
| LAG-3 mAb A IgG1 (AA)                | 0,4523                    | 0,1660 | 2,0187              | 0,7035  |
| § rezultă dintr-un singur experiment |                           |        |                     |         |

Studiile de saturație de legare demonstrează că construcțiile de diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3 rețin legarea la PD-1 și au profiluri de legare care sunt similare cu profilurile de legare ale anticorpilor anti-PD-1 parentali. În mod similar, construcțiile de diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3 rețin legarea la LAG-3 și, cu excepția DART 1, au profiluri de legare care sunt similare cu profilurile de legare ale anticorpilor anti-LAG-3 parentali.

#### Exemplul 6

#### Studii de inhibare ale moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3

Abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 și BSAB A; și anticorpilor anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) și PD-1 mAb A IgG4 (P), de a bloca legarea PD-L1 uman (shPD-L1) și PD-L2 uman (shPD-L2) la PD-1 exprimat pe suprafața celulelor NSO a fost examinată în mod esențial cum s-a descris mai sus. Diacorpii și anticorpilor au fost utilizați la 33,75-0,002 μM sau 107,5-0,0001 μM (de patru ori diluții seriale).

Au fost determinate valorile IC50 și IC90 și sunt prezentate în Tabelul 17. Unde s-au efectuat 2 sau mai multe experimente separate, sunt furnizate media mostrei (SM) și deviația standard (SD σ).

| Tabelul 17 |                              |                              |
|------------|------------------------------|------------------------------|
| Moleculă   | blocarea legării sPD-L1/PD-1 | blocarea legării sPD-L2/PD-1 |

|                           | IC50 (μM) |        | IC90 (μM) |        | IC50 (μM) |        | IC90 (μM) |        |
|---------------------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
|                           | SM        | SD σ   | SM        | SD σ   | SM        | SD σ   | SM        | SD σ   |
| DART A                    | 0,9645    | 0,1485 | 5,6312    | 1,5247 | 1,6273    | 0,4285 | 6,9335    | 3,9849 |
| DART B                    | 1,1515    | 0,0007 | 4,8615    | 0,2199 | 2,1150    | 0,3154 | 7,9550    | 0,0933 |
| DART D                    | 1,5548    | 0,1692 | 7,8950    | 2,5135 | 3,1255    | 0,5869 | 9,2973    | 5,5426 |
| DART E                    | 1,6533    | 0,3307 | 7,8470    | 1,1642 | 2,9460    | 0,7736 | 6,6135    | 0,0177 |
| DART F                    | 0,5697    | 0,1729 | 2,0360    | 0,1174 | 0,8389    | 0,0846 | 1,7995    | 0,2171 |
| DART G                    | 1,6013    | 0,3581 | 8,1953    | 1,5708 | 2,5540    | 0,7891 | 7,4810    | 0,2333 |
| DART H                    | 3,3950    | 0,1018 | 18,640    | 9,5742 | 6,2065    | 3,6847 | 29,395    | 3,8679 |
| DART I                    | 0,8363    | 0,1302 | 5,3115    | 0,3125 | 1,286     | 0,3125 | 6,2485    | 1,3951 |
| DART 1                    | 1,7467    | 0,3097 | 5,4533    | 1,0214 | 2,8355    | 1,8250 | 7,2735    | 3,9831 |
| BSAB A                    | 2,1590    | 0,3097 | 11,075    | 0,8132 | 4,8775    | 0,5438 | 15,580    | 1,3294 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P) | 0,5186    | 0,1668 | 3,8050    | 1,2227 | 1,0425    | 0,2563 | 3,4880    | 0,5459 |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)       | 0,9209    | 0,3256 | 4,3023    | 0,7069 | 1,3859    | 0,3882 | 5,1675    | 0,2943 |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1(AA) | 0,7320    | 0,2337 | 3,2048    | 1,1479 | 0,9769    | 0,2893 | 2,8437    | 1,4801 |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)      | 1,0765    | 0,2393 | 5,2775    | 0,9933 | 1,9510    | 0,8814 | 5,0880    | 1,3831 |

Studiile de inhibare a legării ligandului demonstrează că construcțiile de diacorpi bispecifice PD-1 x LAG-3 rețin abilitatea de a inhiba legarea SPD-L1 și SPD-L2 la PD-1 pe suprafața celulei.

- 5 In plus, a fost examinată abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 și BSAB A; și anticorpii anti-LAG-3: hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG1 (AA), și LAG-3 mAb A IgG1 (AA), de a bloca legarea LAG-3 uman la MHC nativ de clasă II pe suprafața celulelor Daudi. Pe scurt, fiecare moleculă bispecifică PD-1 x LAG-3 și anticorp anti-LAG-3 de control au fost amestecate cu o proteină de fuziune LAG-3-Fc umană solubilă biotinilată (shLAG-3), (la 0,5 μg/ml) și au fost incubate separat cu celule Daudi pozitive MHC II (2,5 x 10<sup>6</sup> celule). Cantitatea de legare LAG-3 la
- 10 suprafața celulelor Daudi a fost determinată utilizând un anticorp secundar de streptavidină conjugat PE prin analiză FACS. Diacorpii și anticorpii au fost utilizați la 27,5-0,026 μM (de două ori diluții seriale) sau 107,5-0,0001 μM (de patru ori diluții seriale), sau 35-0,002 μM (de patru ori diluții seriale).

- 15 Au fost determinate valorile IC50 și IC90 și sunt prezentate în **Tabelul 18**. Unde au fost efectuate 2 sau mai multe experimente separate, sunt furnizate media mostrei (SM) și deviația standard (SD σ).

| <b>Tabelul 18</b> |                                                 |             |                  |             |
|-------------------|-------------------------------------------------|-------------|------------------|-------------|
| <b>Moleculă</b>   | <b>Blocarea legării shLAG-3/MHC de clasă II</b> |             |                  |             |
|                   | <b>EC50 (μM)</b>                                |             | <b>EC90 (μM)</b> |             |
|                   | <b>SM</b>                                       | <b>SD σ</b> | <b>SM</b>        | <b>SD σ</b> |
| DART A            | 1,3835                                          | 1,6465      | 8,396102         | 8,3962      |
| DART B            | 0,4081                                          | 0,1104      | 3,0645           | 0,3924      |
| DART D            | 1,1843                                          | 1,1398      | 8,0041           | 7,3317      |
| DART E            | 3,2706                                          | 2,9177      | 28,9683          | 24,1694     |
| DART F            | 1,5347                                          | 1,2674      | 10,3920          | 11,2555     |
| DART G            | 2,0618                                          | 3,3552      | 11,4422          | 12,4964     |
| DART H            | 2,8967                                          | 4,9817      | 17,2533          | 21,1420     |
| DART I            | 0,4864                                          | 0,1549      | 2,339            | 1,1780      |

Tabelul 18

| Moleculă                    | Blocarea legării shLAG-3/MHC de clasă II |         |           |         |
|-----------------------------|------------------------------------------|---------|-----------|---------|
|                             | EC50 (μM)                                |         | EC90 (μM) |         |
|                             | SM                                       | SD σ    | SM        | SD σ    |
| DART 1                      | 15,9610                                  | 14,0883 | 87,1486   | 109,533 |
| BSAB A                      | 0,7101                                   | 0,0571  | 7,2470    | 1,0706  |
| hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG4 (P)  | 0,4815                                   | 0,2176  | 3,4837    | 1,7564  |
| LAG-3 mAb A IgG4 (P)        | 0,7011                                   | 0,1900  | 2,4232    | 0,3481  |
| hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG1 (AA) | 0,3637                                   | 0,1409  | 9,4422    | 7,9319  |
| LAG-3 mAb A IgG1 (AA)       | 0,5923                                   | 0,3407  | 2,1451    | 1,1139  |

Studiile de inhibarea legării ligandului demonstrează că construcțiile de diacorpi bispecifice PD-1 x LAG-3 rețin abilitatea de a inhiba legarea unei proteine de fuziune shLAG-3-Fc la MHC de clasă II pe suprafața celulei. Cu excepția DART 1 moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 au profiluri de inhibare similare cu ale anticorpilor anti-LAG-3 parentali.

#### Exemplul 7

##### Blocarea punctului de control al PD-1/PD-L1 cu molecule bispecifice PD-1 x LAG-3

A fost examinată abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 și BSAB A; și a anticorpilor anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) și PD-1 mAb A IgG4 (P), de a antagoniza axa PD-1/PD-L1 (adică, de a bloca interacțiunea PD-1/PD-L1 și de a preveni reglarea negativă a răspunsurilor celulei T) într-un test reporter luciferază Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 (utilizând celule CHO/PD-L1 și celule MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat) în mod esențial cum s-a descris mai sus. Diacorpii și anticorpii au fost utilizați la 100-0,0065 μM (de patru ori diluții seriale) sau 100-0,0013 μM (de cinci ori diluții seriale).

Au fost determinate valorile IC50 și IC90 și sunt prezentate în Tabelul 19. Unde au fost efectuate 2 sau mai multe experimente separate, sunt furnizate media mostrei (SM) și deviația standard (SD σ).

Tabelul 19

| Moleculă                  | Semnalizare reporter |         |           |           |
|---------------------------|----------------------|---------|-----------|-----------|
|                           | IC50 (μM)            |         | IC90 (μM) |           |
|                           | SM                   | SD σ    | SM        | SD σ      |
| DART A                    | 0,8804               | 0,1949  | 7,9115    | 1,3232    |
| DART B                    | 1,079                | 0,1535  | 7,5413    | 3,1483    |
| DART D                    | 1,4044               | 0,2584  | 12,0786   | 3,6616    |
| DART E                    | 1,4060               | 0,1222  | 13,7867   | 1,4981    |
| DART F                    | 0,3404               | 0,0103  | 1,8710    | 0,481     |
| DART G                    | 0,6914               | 0,0206  | 4,2090    | 0,7331    |
| DART H                    | 36,6167              | 20,8078 | 968,300   | 811,8471  |
| DART I                    | 1,3335               | 0,3641  | 12,146    | 6,8787    |
| DART 1                    | 11,8807              | 3,4905  | 1048,2000 | 1508,9992 |
| BSAB A                    | 9,7825               | 1,0288  | 113,3350  | 22,2951   |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4 (P) | 0,6460               | 0,3035  | 6,0736    | 2,5513    |
| PD-1 mAb A IgG4 (P)       | 1,328                | 0,7439  | 16,5138   | 9,7149    |
| hPD-1 mAb 7(1,2) IgG1(AA) | 0,5214               | 0,1541  | 4,7592    | 2,1044    |
| PD-1 mAb A IgG1 (AA)      | 1,4514               | 1,0049  | 35,7382   | 40,9858   |

Studiile de semnalizare reporter demonstrează că majoritatea dintre construcțiile de diacorpi bispecifice PD-1 x LAG-3 rețin abilitatea de a inhiba legarea SPD-L1 la PD-1 pe suprafața celulei. Construcțiile de diacorpi bispecifice PD-1 x LAG-3 tetravalente, DART A, DART B, DART D, DART-E, DART F, DART G și DART I au fost cei mai puternici inhibitori în acest test. Rezultate similare au fost

#### Exemplul 8

##### Activitatea funcțională a moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3

A fost examinată abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3 de a spori eliberarea de citokine prin inhibarea punctului de control la PBMC-urile stimulate cu SEB după restimulare în mod

esențial cum s-a descris mai sus cu excepția unde s-a notat. În studiile inițiale, a fost examinată abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H; și anticorpii anti-PD-1 și anti-LAG: PD-1 mAb A IgG4 (P) și LAG-3 mAb A IgG4 (P), singuri sau în combinație, de a spori eliberarea de citokine prin inhibarea punctului de control. În aceste teste, moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 și anticorpii au fost

utilizate la o concentrație totală de 3,125, 12,5, sau 50 nM, și PBMC-urile au fost stimulate cu 0,2 ng/mL de SEB (studiile anterioare au utilizat 0,1 ng/mL). Pentru aceste studii, unde este utilizată o combinație a anticorpilor, fiecare anticorp este prevăzut la o jumătate din concentrația totală, (adică, 1,563, 6,25, sau 25 nM). **Figurile 16A și 16B** prezintă profilurile de secreție IFN $\gamma$  de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la doi donatori respondenți reprezentativi, D: 35644 și respectiv D: 59697.

Cum s-a notat, nu toți donatorii răspund la SEB la 0,1 sau 0,2 ng/mL. Pentru a spori stimularea cu SEB a PBMC-urilor de la un număr mai mare de donatori, SEB a fost utilizat la o concentrație ridicată de 85 ng/mL, sau la o concentrație medie de 0,5 ng/mL în studiile suplimentare. La aceste concentrații, stimularea cu SEB este mai robustă pentru mai mulți donatori, deși se poate încă vedea variabilitatea de la donator la donator.

Intr-un astfel de studiu, a fost examinată abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B; anticorpii anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpii anti-LAG-3: LAG-3 mAb 1(1,4) IgG4(P); și combinația de: PD-1 mAb A IgG4 (P) și LAG-3 mAb A IgG4 (P), de a spori eliberarea de citokine prin inhibarea punctului de control. În aceste teste moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 și anticorpii au fost utilizați la o concentrație de 0,019, 0,078, 0,3125, 1,25, 5, sau 20 nM și PBMC-urile au fost stimulate cu 85 ng/mL de SEB. Pentru acest test, unde este utilizată o combinație a anticorpilor, fiecare anticorp a fost furnizat la concentrația indicată și astfel concentrația totală de anticorp este de două ori concentrația utilizată pentru fiecare anticorp (adică, 0,038, 0,156, 0,625, 2,5, 10, sau 40 nM). **Figurile 17A și 17B** prezintă profilurile secreției de IFN $\gamma$  de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la doi donatori reprezentativi, D: 55515 și respectiv D: 54024.

Intr-un alt studiu, au fost examinate moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART C; anticorpii anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpii anti-LAG-3: LAG-3 mAb 1(1,4) IgG4(P); și combinația de: PD-1 mAb A IgG4 (P) și LAG-3 mAb A IgG4 (P), pentru a spori eliberarea de citokine prin inhibarea punctului de control. În aceste teste, moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 și anticorpii au fost utilizați la o concentrație totală de 0,048, 0,195, 0,78, 3,125, 12,5, sau 50 nM și PBMC-urile au fost stimulate cu 0,5 ng/mL de SEB. Pentru aceste studii, unde a fost utilizată o combinație a anticorpilor, fiecare anticorp este prevăzut la o jumătate din concentrația totală (adică, 0,024, 0,098, 0,39, 1,563, 6,25, sau 25 nM). **Figurile 18A și 18B** prezintă profilurile secreției de IFN $\gamma$  de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la doi donatori reprezentativi (D: 20990 și respectiv D: 54947).

Intr-un studiu suplimentar, a fost examinată eliberarea de citokine IL-2. Specific, au fost

examinat moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3: DART D, DART H; anticorpii anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpii anti-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P) și LAG-3 mAb 1(1,4) IgG4(P); și combinația de: PD-1 mAb A IgG4 (P) și LAG-3 mAb A IgG4 (P), și hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P) și LAG-3 mAb 1(1,4) IgG4(P), pentru a spori eliberarea de IL-2 prin inhibarea punctului de control. În aceste teste, moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 și anticorpii au fost utilizate la o concentrație totală de 3,125, 12,5, sau 50 nM și PBMC-urile au fost stimulate cu concentrația ridicată de 85 ng/mL de SEB. Pentru aceste studii, unde este utilizată o combinație a anticorpilor, fiecare anticorp este prevăzut la o jumătate din concentrația totală (adică, 1,563, 6,25, sau 25 nM). **Figura 19** prezintă profilul de secreție IL-2 de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la un donator reprezentativ (D: 54024).

În studii suplimentare, au fost examinate moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3: DART B, și

DART I; anticorpii anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), și hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpii anti-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG4(P), și hLAG-3 mAb 6(1,1) IgG4 (P); și combinații de: PD-1 mAb A IgG4 (P) și LAG-3 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P) și hLAG-3 mAb 1(1,4) IgG4(P), și hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P) și hLAG-3 mAb 6(1,1) IgG4 (P) pentru a spori eliberarea de citokine prin inhibarea punctului de control. În aceste teste, moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 și anticorpii au fost utilizate la o concentrație de 0,0061, 0,024, 0,09, 0,39, 1,56, 6,25 sau 25 nM și PBMC-urile au fost stimulate cu 0,5 ng/mL de SEB. Pentru aceste studii, unde este utilizată o combinație

A fost examinată abilitatea moleculei bispecifice PD-1 x LAG-3 DART I; combinația de anticorp anti-PD-1 PD-1 mAb A IgG4 și anticorp anti-LAG-3 LAG-3 mAb A IgG4 (P); și un anticorp de control negativ pentru a spori răspunsurile celulei T specifice antigenului utilizând un test de rechemare Tetanus-Toxoid. În particular, răspunsul secreției sporite specifice antigenului, de citokine a fost măsurat utilizand toxoidul tetanus ca antigen de rechemare în sistemul de testare de cocultură. Pe scurt, celulele T de memorie CD4 ( $0,5 - 1,0 \times 10^5$  celule/godeu) au fost izolate utilizand truse de izolare cu selecție negativă (Miltenyi Biotec, San Diego, CA și Invitrogen, Carlsbad, CA) din sânge periferic uman și cultivate timp de 5-7 zile cu monocite iradiate ( $0,01 - 0,05 \times 10^5$  celule/godeu, 3500 rad) de la același donator în prezența sau absența a  $5 \mu\text{g/mL}$  toxoid de tetanus al antigenului de rechemare (TTd) și diluție (incepand la  $25\text{nM}$ ) de DART I, PD-1 mAb A IgG4 + LAG-3 mAb A IgG4(P), sau un control cu izotip. În plăci paralele, proliferarea a fost măsurată prin încorporarea timidinei tritiate și IL-2 și IFN $\gamma$  au fost măsurate utilizând ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) în zilele 5-7. **Figurile 21A-D** prezintă profilurile secreției de IFN $\gamma$  (**Figurile 21A, 21C**) și IL-2 (**Figurile 21B, 21D**) în ziua 7, de la doi donatori reprezentativi (D50702 și D54267).

## 25 Exemplul 9

Farmacocineticele unei molecule bispecifice PD-1 x LAG-3 reprezentative, DART I și ale unui anticorp anti-PD-1 reprezentativ, PD-1 mAb A au fost examinate la maimuța cynomolguss. Pe scurt, două maimuțe cynomolguss (un mascul și o femelă) au fost perfuzate cu o singură doză de DART I (5 mg/kg) sau PD-1 mAb A (10 mg/kg) și concentrația serică de molecule a fost monitorizată în timp utilizând un test ELISA sandwich. Pe scurt, plăcile de testare maxisorb cu 96 de godeuri au fost acoperite cu PD-1 uman solubil (shPD-1), blocate cu albumină din ser bovin, spălate și incubate cu standarde de calibrare, standarde de control de calitate și mostre de ser diluate. Cantitatea de DART I și PD-1 mAb A capturată a fost evaluată prin adăugarea secvențială de biotină secundară Fc IgG anti-umană de capră și streptavidină-peroxidază din hrean (SA-HRP). Activitatea HRP a fost detectată utilizând substrat TMB. Toate mostrele au fost analizate cu un cititor de microplacă (SpectraMax M2e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) și semnalele OD produse prin calibrare standard au fost utilizate în modelul logistic cu patru parametri utilizând software-ul SoftMax Pro (Versiunea 5.4, Molecular Devices). Concentrațiile de PD-1 mAb A, sau DART I au fost determinate din interpolarea datelor de semnal OD ale mostrelor cu ecuația care descrie curba standard. Limita inferioară de cuantificare (LLOQ) pentru acest test a fost estimată la 9,775 ng/mL.

**Figura 22** prezintă concentrația serică în timp, liniile reprezintă media ambelor maimuțe mascul (simbolurile umplute) și femelă (simbolurile neumplute) perfuzate cu DART I (linie solidă, triunghiuri) sau PD-1 mAb A (linie întreruptă, cercuri). Aceste date demonstrează că farmacocineticele unei molecule bispecifice PD-1 x LAG-3 sunt comparabile cu cele ale unui anticorp anti-PD-1 la maimuța cynomolgus.

### Exemplul 10

## Studiu toxicologic al anticorpilor PD-1 și moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3

50 Profilul de siguranță al unui anticorp anti-PD-1 reprezentativ, hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P), și al unei molecule bispecifice PD-1 x LAG-3 reprezentative, DART I, a fost evaluat într-un studiu de dozare non-GLP (Good Laboratory Practice) la maimuța cynomolguss.

In acest studiu, s-au evaluat toxicitatea potențială și toxicocineticele anticorpului anti-PD-1 (hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)), când se administrează prin multiple perfuzii intravenoase. În plus, au fost de asemenea evaluate toxicitatea potențială și farmacocineticele moleculei DART PD-1 x LAG-3 DART (DART I), când se administrează printr-o singură perfuzie intravenoasă. Proiectarea studiului este prezentată în **Tabelul 20**.

### Tabelul 20

| Nr. grup | Material de test | Nivel<br>dozare<br>(mg/kg) | de | Zile<br>dozare | de | Volum doză | Doză<br>(mg/mL) | Nr. animale |        |
|----------|------------------|----------------------------|----|----------------|----|------------|-----------------|-------------|--------|
|          |                  |                            |    |                |    |            |                 | Masculi     | Femele |

**Tabelul 20**

| Nr. grup | Material de test           | Nivel de dozare (mg/kg) | Zile de dozare | Volum doză | Doză (mg/mL) | Nr. animale    |                |
|----------|----------------------------|-------------------------|----------------|------------|--------------|----------------|----------------|
|          |                            |                         |                |            |              | Masculi        | Femele         |
| 1        | Control                    | 0                       | 1, 8, 15       | 5          | 0            | 1 <sup>a</sup> | 1 <sup>a</sup> |
| 2A       | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) | 1                       | 1, 8, 15       | 5          | 0,2          | 1 <sup>a</sup> | 1 <sup>a</sup> |
| 2B       | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) | 1                       | 1, 8, 15       | 5          | 0,2          | 1 <sup>b</sup> | 1 <sup>b</sup> |
| 3A       | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) | 100                     | 1, 8, 15       | 5          | 20           | 1 <sup>a</sup> | 1 <sup>a</sup> |
| 3B       | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) | 100                     | 1, 8, 15       | 5          | 20           | 1 <sup>b</sup> | 1 <sup>b</sup> |
| 4        | DART I                     | 5                       | 1              | 5          | 1            | 1 <sup>c</sup> | 1 <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> Grupurile 1, 2A, și 3A au fost dozate începând cu ziua 1 și necropsate la 72 ore după ultima lor doză (a treia) în ziua 18.

<sup>b</sup> Grupurile 2B și 3B au fost dozate începând cu ziua 1 și necropsate la 7 zile după ultima lor doză (a treia) în ziua 22.

<sup>c</sup> Grupul 4 a fost dozat începând cu ziua 1 și după 28 zile după administrarea dozei unice (în ziua 29); animalele au fost întoarse apoi în colonie.

S-au evaluat următorii parametri și obiective finale în acest studiu: semnele clinice, greutatea corporale, consumul de alimente, temperatura corpului, parametrii de patologie clinică (hematologie, coagulare, și chimie clinică), bioanaliza și parametrii toxicocinetici, analiza anticorpului anti-medicament, citometria de flux, citokinele, constatări de necropsie brute, greutatea organelor, și examinări histopatologice.

Toate animalele au supraviețuit până când a fost programată eutanasierea în ziua 18 sau 22 sau eliberarea din studiu în ziua 29. Pentru hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) nu au fost modificări asociate cu articolul de test în semnele clinice, consumul de alimente, greutatea corporale, temperatura corpului, hematologie, coagulare, sau parametri de chimie clinică, sau constatări de necropsie brute. În zilele 18 și 22, creșterea greutății splinei și un infiltrat limfohistiocitic dependent de doză, ușor până la moderat, al pulpei roșii, au fost evidente la animalele care au primit hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) la 1 sau 100 mg/kg. În comparație cu limfocitele înconjurătoare, celulele limfohistiocitice au avut o citoplasmă palidă și nuclee neregulate. Figurile mitotice rare au fost evidente. Infiltratul a fost corelat microscopic pentru greutatea crescută a splinei.

Profilurile de concentrație serică în timp pentru animalele cărora le-a fost dat hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) prezintă profilul așteptat pentru un anticorp din aceste specii, cu câteva excepții. Pantele curbilor după a treia doză au scăzut mai abrupt decât după prima doză pentru două animale din grupul de dozare cu 1 mg/kg și două animale din grupul de dozare cu 100 mg/kg, ceea ce indică posibila apariție de anticorpi anti-medicament (ADA) în ciclurile mai târzii. Analiza a arătat că 2/4 animale au dezvoltat ADA în grupul cu 1 mg/kg și 1/4 animale au dezvoltat ADA în grupul cu 100 mg/kg.

În concluzie, administrarea de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) prin perfuzie intravenoasă o dată săptămânal timp de 3 săptămâni (zilele 1, 8, și 15) a fost bine tolerată de maimuța cynomolgus la niveluri de 1 și 100 mg/kg. Un infiltrat limfohistiocitic ușor până la moderat, dependent de doză, al pulpei roșii splinei a fost prezent la 1 și 100 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P).

Pentru DART I, nu a fost nici o modificare asociată cu articolul de test în semnele clinice, consumul de alimente, greutatea corporale, temperatura corpului, hematologie, sau parametri de coagulare. Modificările asociate cu DART I în parametrii de chimie clinică au inclus creșteri neadverse, tranzitorii în aminotransferaza aspartată (AST) și dehidrogenaza lactată (LDH) în ziua 2. Modificarea AST medie a fost 3,2x animale de control tratate cu vehicul și 7,8x niveluri de prestudiu, cu niveluri peste intervalul 2 al referinței de control. Modificarea LDH medie a fost 2,5x animale de control tratate cu vehicul și 6,9x niveluri de prestudiu. Ambii parametri s-au întors aproape de nivelurile liniei de bază în ziua 8. În concluzie, administrarea singură de DART-I prin perfuzie intravenoasă a fost bine tolerată de maimuța cynomolgus la un nivel de 5 mg/kg.

### Exemplul 11

**Studiu PK de doză unică cu anticorpi anti-PD-1**

A fost efectuat un studiu PK cu doză unică cu obiective finale toxicologice selectate pe maimuța cynomolguss. În acest studiu, hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a fost comparat cu doi alți anti-PD1 IgG4 (P), κ mAb-uri: PD-1 mAb A IgG4 (P) și PD-1 mAb B IgG4 (P). Fiecare anticorp a fost administrat la 10 mg/kg printr-o perfuzie intravenoasă de 1 oră la 2 maimuțe (1M, 1F) și animalele au fost monitorizate timp de 65 de zile.

Nu au fost semne clinice asociate cu articolul de test, modificări în greutatea corporală, consumul de alimente, citokine, sau imunofenotiparea asociate cu administrarea de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) sau PD-1 mAb A IgG4 (P). Datele au fost similare pentru PD-1 mAb B IgG4 (P) cu excepția faptului că, creșterile în IL-5 au fost observate după administrarea PD-1 mAb B IgG4 (P).

Legarea anticorpului **anti-PD-1** la PD-1 pe suprafața celulelor T a fost determinată prin citometrie de flux utilizând o metodă competițională în care intensitatea fluorescență medie (MFI) a legării hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) marcat fluorescent la celulele T în absența (control cu PBS) sau prezența competitorului în exces (hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) nemarcat) pe întreaga durată de timp a probelor de sânge colectate de la maimuța cynomolguss tratată cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG4 (P) sau PD-1 mAb B IgG4 (P). Așa cum se arată în **Figurile 23A-23C**, hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) și PD-1 mAb B IgG4 (P) au demonstrat legare prelungită la PD-1 pe suprafața celulelor T CD4+ și CD8+ (legarea PD-1 s-a menținut la  $\geq 80\%$  timp de 28 zile sau mai mult) (**Figurile 23A și 23C**, respectiv) în comparație cu PD-1 mAb A IgG4 (P) (legarea PD-1 s-a menținut la  $\geq 80\%$  timp de 21 zile sau mai puțin) (**Figura 23B**). Pentru fiecare din anticorpii anti-PD-1, datele de legare PD-1 celulă T s-au corelat cu concentrațiile lor în ser.

**Exemplul 12****Studii toxicologice de doză repetată**

Pentru a evalua siguranța, profilul toxicocinetic, și farmacodinamic al moleculelor terapeutice din prezenta divulgare, un exemplu de moleculă (hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)) a fost administrat la maimuța cynomolguss și a fost efectuat un studiu de dozare GLP (Good Laboratory Practice). În acest studiu, patru grupuri de animale (10 pe grup, 5 masculi, și 5 femele) au fost tratate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) sau un articol de control, o dată săptămânal prin perfuzie la 3 niveluri de dozare. Animalele au fost evaluate pentru orice toxicitate potențială pe durata unei perioade de dozare a medicamentului de 4 săptămâni urmată de monitorizarea pe durata unei perioade suplimentare fără medicament de 10 săptămâni. Proiectarea experimentală a acestui studiu este prezentată în **Tabelul 21**. Animalele au fost dozate o dată săptămânal printr-o perfuzie intravenoasă de o oră utilizând o pompă de perfuzie calibrată în zilele de studiu 1, 8, 15, și 22. Un mascul și o femelă din fiecare grup au fost sacrificați în ziua 25, animalele rămase au fost sacrificate în ziua 95 de studiu. Au fost evaluate efectele administrării de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) asupra subpopulațiilor de leucocite în circulație, incluzând ocuparea receptorilor PD-1 pe limfocitele T. În plus, au fost determinate profilurile anticorp anti-medicament (ADA).

**Tabelul 21**

| Nr. grup | Material de test <sup>a</sup> | Nivel dozare (mg/kg) | de Volum dozare (mL/kg) | Doză (mg/mL) | Nr. de animale <sup>b</sup> |   |                      |   |
|----------|-------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------|-----------------------------|---|----------------------|---|
|          |                               |                      |                         |              | Studiu principal            |   | Studiu de recuperare |   |
|          |                               |                      |                         |              | M                           | F | M                    | F |
| 1        | Control                       | 0                    | 5,88                    | 0            | 3                           | 3 | 2                    | 2 |
| 2        | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)    | 10                   | 5,88                    | 1,7          | 3                           | 3 | 2                    | 2 |
| 3        | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)    | 40                   | 5,88                    | 6,8          | 3                           | 3 | 2                    | 2 |
| 4        | hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)    | 150                  | 5,88                    | 25,5         | 3                           | 3 | 2                    | 2 |

<sup>a</sup> Controlul și hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) au fost administrate săptămânal prin perfuzie intravenoasă

<sup>b</sup> Șase maimuțe (3M/3F) pe grup au fost necropsate în ziua 25, în timp ce maimuțele din grup recuperate rămase (2M/2F) au fost necropsate în ziua 95

O dată săptămânal, perfuziile intravenoase (IV) de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) la 0, 10, 40, și 150 mg/kg la maimuțele cynomolguss au fost bine tolerate și toate animalele au supraviețuit până la programarea eutanasierii lor în zilele 25 sau 95. Nu au fost modificări asociate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în semnele clinice, consumul de alimente, greutatea corporale, examinările fizice, oftalmice, și

neurologice, electrocardiologie, temperaturile corporale, ratele respiratorii, presiune sanguină și ritmurile cardiace, coagulare, chimie clinică, și parametri de urinaliză, greutatea organelor, sau constatări de necropsie brute.

Modificările asociate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în parametri hematologici au inclus scăderea tranzitorie a titrurilor de limfocite. Titrurile de limfocite au scăzut moderat în comparație cu prestudiul (ziua 1 înainte de administrare) în ziua 2 (23 ore după perfuzie) la masculi și femele la  $\geq 10$  mg/kg, semnificativ statistic pentru masculi la 10 și 40 mg/kg și femele la 40 și 150 mg/kg în comparație cu controalele. Titrurile de limfocite au revenit aproape de nivelurile de prestudiu în ziua 8 înainte de administrare dar au fost ușor scăzute pentru unii indivizi masculi și femele la toate nivelurile de dozare (0,47x până la 0,68x prestudiu) în ziua 9 (23 ore după perfuzie). Titrurile de limfocite au crescut înainte de dozarea în zilele 15 și 22, dar au scăzut pentru unii indivizi masculi și femele (0,36x până la 0,54x prestudiu) în zilele 16 și 23 (23 ore după perfuzie).

O scădere tranzitorie, independentă de doză, a populațiilor de celule imune în circulație, incluzând leucocitele totale, celulele T, celulele B, și celulele NK, a fost observată la 23 de ore după terminarea perfuziei la animalele tratate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) comparativ cu grupul de control. Cea mai mare mărime a modificării a fost observată după administrarea primei doze în ziua 1; modificări de mărime mai mică au fost observate tranzitoriu după dozele ulterioare în zilele 8, 15, sau 22. Populațiile de celule imune au recuperat în general la sau aproape de valorile liniei de bază la 72 ore după EOI și prin faza de recuperare. Nu s-a observat nici o modificare la monocitele în circulație la animalele tratate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) comparativ cu grupul de control.

Legarea hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) maximă la celulele PD-1+/CD4+ și PD-1+/CD8+ a fost observată în timpul fazei de tratament cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a studiului la toate dozele testate (10, 40 sau 150 mg/kg). În recuperare, la animalele care nu au dezvoltat răspunsuri anticorp anti-medicament (ADA), concentrațiile de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în ser au rămas peste 29  $\mu\text{g/mL}$  și legarea hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) maximă la celulele T PD-1+/CD4+ și PD-1+/CD8+ a fost menținută pe întreaga durată a perioadei de 10 săptămâni de recuperare. La aceste animale, nu a existat nici o dovadă a modulării PD-1 asupra celulelor T. La animalele recuperate care au dezvoltat răspunsuri ADA, frecvența celulelor T PD-1+ legate MGD012 a scăzut la nivelurile liniei de bază. Scăderea de la legarea hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) maximă pe celulele PD-1+/CD4+ și PD-1+/CD8+ ale animalelor pozitive ADA a avut loc în general când concentrațiile evidente ale hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în ser au scăzut sub aproximativ 25  $\mu\text{g/mL}$ . Totuși, nu se știe dacă această relație evidentă de prag se aplică și animalelor negative ADA, deoarece prezența ADA la animalele pozitive ADA poate contribui la blocarea legării anticorpilor PD-1 la PD-1.

Au existat diferențe minime asociate cu sexul în răspunsurile farmacocinetice ale hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P), care au fost liniare de-a lungul intervalului de dozare evaluat (10 până la 150 mg/kg). Pentru hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) la 10, 40, și 150 mg/kg,  $C_{\text{max}}$  medie a sexurilor combinate a fost 240  $\mu\text{g/mL}$  (0,240 mg/mL), 1078  $\mu\text{g/mL}$  (1,08 mg/mL), și 3938  $\mu\text{g/mL}$  (3,94 mg/mL) și AUC a fost 47310 h $\cdot\mu\text{g/mL}$  (47,3 h $\cdot\text{mg/mL}$ ), 205723 h $\cdot\mu\text{g/mL}$  (206 h $\cdot\text{mg/mL}$ ), și 745681 h $\cdot\mu\text{g/mL}$  (746 h $\cdot\text{mg/mL}$ ), respectiv. Eliminarea medie prin analiza non-compartimentală (NCA) a primului ciclu al hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) înainte apariției ADA, a fost de 0,21 mL/h/kg, substanțial mai scăzută decât rata de filtrare glomerulară a maimuței cynomolgus, cum ar fi de așteptat pentru o proteină cu masă moleculară mare. Volumul de distribuție mediu al stării de echilibru prin NCA al primului ciclu al hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a fost de 68 mL/kg, de aproximativ 1,5 ori volumul de ser, dar mai puțin decât spațiul de apă extracelular. Acest lucru sugerează că hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) extravasează din compartimentul vascular în spațiul extracelular tisular, dar că nu tot spațiul extracelular a fost accesibil acestei molecule. Valoarea medie a timpului mediu de rezidență (MRT) prin NCA al primului ciclu al hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a fost de 335 ore sau de aproximativ 14 zile. Apariția ADA a scăzut concentrațiile de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în ciclurile 2 până la 4. Dovada unei concentrații scăzute de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în ser după doze repetate de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a fost observată la 7/10, 4/10, și 3/10 animale din grupurile de dozare cu 10, 40, și 150 mg/kg, respectiv. Prezența ADA împotriva hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a fost confirmată la 4, 2, și 1 din aceste animale din grupurile de dozare cu 10, 40, și 150 mg/kg, respectiv; toate animalele în care ADA nu a fost confirmată au fost în grupul de necropsie terminală în timpul căreia concentrațiile de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în ser au părut că interferează cu abilitatea de a detecta ADA. Corespunzător, în analiza TK ulterioară, când o concentrație minimă a fost mai scăzută decât concentrația minimă precedentă, datele de la acest moment mai departe au fost censurate. Din modelarea bi-compartimentală a datelor de-a lungul tuturor ciclurilor pentru cele 3 grupuri de dozare, excluzând punctele care au fost afectate de ADA, valorile medii pentru parametri TK primari pentru un model bi-compartimental au fost de 0,22 mL/h/kg pentru eliminare, de 38,5 mL/kg pentru volumul de distribuție inițial ( $V_i$ ), și de 33,8 mL/kg pentru  $V_z$ , care au dat un volum de distribuție mediu al stării de echilibru ( $V_{ss}$ ) de 72,3 mL/kg, și o MRT de 329 ore. Aceste valori au fost consistente cu parametri obținuți de la NCA a primei doze. În absența ADA, simulările au predictat că, cu dozarea

săptămânală, starea stabilă ar fi obținută la maimuța cynomolguss după a 5-a doză și indicele de acumulare ar fi de 2,4.

În ziua 25, infiltrațiile celulare mononucleare perivasculare multifocale minime asociate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) au fost prezente în dermele superficiale ale locurilor de injecție IV la masculi la  $\geq 40$  mg/kg și la femele la  $\geq 10$  mg/kg și au fost o reacție așteptată la injectarea repetată a unei proteine străine (anticorp monoclonal). În ziua 95, nu au existat modificări microscopice observate asociate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P), care să indice recuperarea modificărilor asociate cu articolul de test prezente în ziua 25.

În rezumat, rezultatele acestui studiu au indicat că administrarea de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) prin perfuzie intravenoasă o dată săptămânal (zilele 1, 8, 15, și 22) a fost bine tolerată clinic la maimuța cynomolguss la niveluri de 10, 40, sau 150 mg/kg. Efectele observate au fost limitate la scăderea tranzitorie a limfocitelor în circulație și modificări minimale ale locului de injecție asociate injectării unei proteine străine. Pe baza acestor rezultate, nivelul efectelor adverse neobservate (NOAEL) a fost considerat a fi de 150 mg/kg ( $C_{\max}$  medie a sexelor combinate de 3,94 mg/mL și AUC de 746 h•mg/mL).

## LISTĂ DE SECVENȚE

<110> MacroGenics, Inc.

<120> Molecule de legare PD-1 și metode de utilizare a acestora

<130> N412890EP-A

<150> US 62/198.867

<151> 30-07-2015

<150> US 62/239.559

<151> 09-10-2015

<150> US 62/255.140

<151> 13-11-2015

<150> US 62/322.974

<151> 15-04-2016

<160> 298

<170> Versiune patentln 3.5

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(217)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG uman

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 2

5 <211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

10 <222> (1)..(216)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG2 uman

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (216)..(216)

15 <223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln  
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro  
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 3

5 <211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

10 <222> (1)..(217)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG3 uman

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (217)..(217)

15 <223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 4

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(217)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG4 uman

10 <220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 4

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa  
210 215

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG uman avand substituțiile L234A/L235A

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 5

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 50 55 60  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 65 70 75 80  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 85 90 95  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 100 105 110  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 115 120 125  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 130 135 140  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 165 170 175  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 180 185 190  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 195 200 205  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
 210 215

- 5 <210> 6  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 10 <223> Domeniu CH2-CH3 IgG uman „care poartă nod“  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (217)..(217)  
 <223> Xaa este o lizină (K) sau este absent  
 15 <400> 6

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 7

5 <211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG uman „care poartă gaură“

10

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 7

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(107)

<223> Domeniu Kapa CL IgG uman

<400> 8

5

10

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 9

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(104)

<223> Domeniu Lambda CL IgG uman

<400> 9

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100

<210> 10

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(98)

<223> Domeniu CH1 IgG1 uman

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(12)

<223> Regiunea balama IgG2 umană

10 <400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(12)

<223> Regiunea balama IgG4 umană

20 <400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiunea balama IgG4 stabilizată

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

30 <210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

35 <223> Liant 1

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 15

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 5 <223> Liant 2 care conține cisteină  
 <400> 15  
 Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
 1 5  
 <210> 16  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniu de promovare al heterodimerului  
 <400> 16  
 Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 1 5  
 15 <210> 17  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 20 <220>  
 <223> Domeniu de promovare al heterodimerului  
 <400> 17  
 Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 1 5  
 <210> 18  
 25 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniu de promovare al heterodimerului  
 30 <400> 18  
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys  
 1 5  
 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 35 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniu de promovare al heterodimerului  
 <400> 19  
 Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5  
 40 <210> 20  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 45 <223> Domeniu de promovare al heterodimerului  
 <400> 20  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5  
 <210> 21  
 <211> 28  
 50 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniu de promovare al heterodimerului (E-spiralat)  
 <400> 21  
 Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 55 1 5 10 15

- Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
20 25
- <210> 22  
<211> 28  
<212> PRT  
5 <213> Secvență artificială  
<220>  
<223> Domeniu de promovare al heterodimerului „K-spiralat“  
<400> 22  
Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
1 5 10 15
- Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25
- 10 <210> 23  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială  
<220>  
15 <223> Domeniu de promocare al heterodimerului „E-spiralat“ care conține cisteină  
<400> 23  
Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
1 5 10 15
- Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
20 25
- <210> 24  
<211> 28  
20 <212> PRT  
<213> Secvență artificială  
<220>  
<223> Domeniu de promocare al heterodimerului „K-spiralat“ care conține cisteină  
<400> 24
- 25 Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
1 5 10 15
- Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25  
Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
1 5 10 15
- Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
20 25
- <210> 25  
<211> 46  
30 <212> PRT  
<213> Streptococcus dysgalactiae  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
<222> (1)..(46)  
35 <223> Domeniul 3 de legare a albuminei proteinei G a tulpinii de streptococ G148  
<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 26

<211> 46

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Variantă a domeniului de legare al albuminei deimunizate

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

10 <210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Variantă a domeniului de legare al albuminei deimunizate

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

<210> 28

<211> 46

20 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Variantă a domeniului de legare al albuminei deimunizate

<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu  
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro  
35 40 45

25 <210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Secvență artificială

30 <220>

<223> Liant 2 alternativ

<400> 29  
 Gly Gly Gly Ser  
 1  
 <210> 30  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Liant 2 alternativ  
 <400> 30  
 Ala Ser Thr Lys Gly  
 10 1 5  
 <210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 15 <220>  
 <223> Liant  
 <400> 31  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10  
 20 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 25 <223> Liant  
 <400> 32  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10 15  
 <210> 33  
 <211> 6  
 30 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Liant 2 alternativ  
 <400> 33  
 Leu Glu Pro Lys Ser Ser  
 35 1 5  
 <210> 34  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 40 <220>  
 <223> Liant 2 alternativ  
 <400> 34  
 Ala Pro Ser Ser Ser  
 1 5  
 <210> 35  
 45 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Liant  
 50 <400> 35  
 Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu  
 1 5  
 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 55 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Liant

<400> 36  
 Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 37  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Liant  
 <400> 37  
 Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 10 1 5 10 15  
 <210> 38  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(525)  
 <223> LAG-3 uman (secvență de semnalizare și proteină matură)  
 <220>  
 20 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(28)  
 <223> Secvență de semnalizare  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 25 <222> (29)..(525)  
 <223> Proteină matură  
 <400> 38  
 Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp  
 1 5 10 15  
  
 Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val  
 20 25 30  
  
 Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile  
 35 40 45  
  
 Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln  
 50 55 60

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

123

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Gln | Pro | Asp | Ser | Gly | Pro | Pro | Ala | Ala | Ala | Pro | Gly | His | Pro | Leu | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Ala | Pro | Gly | Pro | His | Pro | Ala | Ala | Pro | Ser | Ser | Trp | Gly | Pro | Arg | Pro | 85  | 90  | 95  |     |
| Arg | Arg | Tyr | Thr | Val | Leu | Ser | Val | Gly | Pro | Gly | Gly | Leu | Arg | Ser | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Arg | Leu | Pro | Leu | Gln | Pro | Arg | Val | Gln | Leu | Asp | Glu | Arg | Gly | Arg | Gln | 115 | 120 | 125 |     |
| Arg | Gly | Asp | Phe | Ser | Leu | Trp | Leu | Arg | Pro | Ala | Arg | Arg | Ala | Asp | Ala | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Glu | Tyr | Arg | Ala | Ala | Val | His | Leu | Arg | Asp | Arg | Ala | Leu | Ser | Cys | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Arg | Leu | Arg | Leu | Arg | Leu | Gly | Gln | Ala | Ser | Met | Thr | Ala | Ser | Pro | Pro | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Ser | Leu | Arg | Ala | Ser | Asp | Trp | Val | Ile | Leu | Asn | Cys | Ser | Phe | Ser | 180 | 185 | 190 |     |
| Arg | Pro | Asp | Arg | Pro | Ala | Ser | Val | His | Trp | Phe | Arg | Asn | Arg | Gly | Gln | 195 | 200 | 205 |     |
| Gly | Arg | Val | Pro | Val | Arg | Glu | Ser | Pro | His | His | His | Leu | Ala | Glu | Ser | 210 | 215 | 220 |     |
| Phe | Leu | Phe | Leu | Pro | Gln | Val | Ser | Pro | Met | Asp | Ser | Gly | Pro | Trp | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Cys | Ile | Leu | Thr | Tyr | Arg | Asp | Gly | Phe | Asn | Val | Ser | Ile | Met | Tyr | Asn | 245 | 250 | 255 |     |
| Leu | Thr | Val | Leu | Gly | Leu | Glu | Pro | Pro | Thr | Pro | Leu | Thr | Val | Tyr | Ala | 260 | 265 | 270 |     |
| Gly | Ala | Gly | Ser | Arg | Val | Gly | Leu | Pro | Cys | Arg | Leu | Pro | Ala | Gly | Val | 275 | 280 | 285 |     |
| Gly | Thr | Arg | Ser | Phe | Leu | Thr | Ala | Lys | Trp | Thr | Pro | Pro | Gly | Gly | Gly | 290 | 295 | 300 |     |
| Pro | Asp | Leu | Leu | Val | Thr | Gly | Asp | Asn | Gly | Asp | Phe | Thr | Leu | Arg | Leu | 305 | 310 | 315 | 320 |

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

124

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His  
325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr  
340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu  
355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser  
370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala  
385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln  
405 410 415

Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser  
420 425 430

Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly  
435 440 445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu  
450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro  
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln  
485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro  
500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu  
515 520 525

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(120)

<223> Domeniul variabil al lanțului greu al LAG-3 mAb A

10 <400> 39

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul variabil al lanțului ușor al LAG-3 mAb A

10 <400> 40

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 Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 41

15 <211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(107)

&lt;223&gt; Domeniul variabil al lanțului greu al LAG-3 mAb 1

&lt;400&gt; 41

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Arg | Asn | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Val | Leu | Lys | Trp | Met |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gly | Arg | Phe | Ala | Phe | Ser | Leu | Gly | Thr | Ser | Ala | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Ile | Asn | Ile | Leu | Lys | Asn | Glu | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Glu | Ser | Leu | Tyr | Asp | Tyr | Tyr | Ser | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |

5 &lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(6)

&lt;223&gt; CDRH1 a LAG-3 mAb 1

&lt;400&gt; 42

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Asn | Tyr | Gly | Met | Asn |
| 1   |     |     |     | 5   |     |

15 &lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(17)

&lt;223&gt; CDRH2 a LAG-3 mAb 1

&lt;400&gt; 43

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

25 &lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(11)

&lt;223&gt; CDRH3 a LAG-3 mAb 1

&lt;400&gt; 44

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 45  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(112)  
 <223> Domeniul VL al LAG-3 mAb 1  
 10 <400> 45  
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15  
  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95  
  
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 46  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRL1 a LAG-3 mAb 1  
 20 <400> 46  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 of LAG-3 mAb 1  
 30 <400> 47  
 Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser  
 1 5  
 <210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a LAG-3 mAb 1  
 <400> 48  
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 49  
 5 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniul VH al hLAG-3 mAb 1 VH1  
 10 <400> 49  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
  
 Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 50  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 15 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniul VH al hLAG-3 mAb 1 VH2  
 <400> 50

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al hLAG-3 mAb 1 VL1

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

10

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hLAG-3 mAb 1 VL2

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hLAG-3 mAb 1 VL3

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

10

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1 a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn  
1 5 10 15

10 <210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(118)

<223> Domeniul VH al LAG-3 mAb 6

<400> 56

Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a LAG-3 mAb 6

10 <400> 57

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a LAG-3 mAb 6

20 <400> 58

Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(9)

<223> CDRH3 a LAG-3 mAb 6

30 <400> 59

Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 60

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 5 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(107)  
 <223> Domeniul VL al LAG-3 mAb 6  
 <400> 60  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 10 <210> 61  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 15 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(11)  
 <223> CDRL1 a LAG-3 mAb 6  
 <400> 61  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala  
 1 5 10  
 20 <210> 62  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 25 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 a LAG-3 mAb 6  
 <400> 62  
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
 1 5  
 30 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 35 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL3 a LAG-3 mAb 6  
 <400> 63

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 64  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(113)  
 <223> Domeniul variabil al lanțului greu al PD-1 mAb A  
 10 <400> 64  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser  
 20 25 30  
  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
  
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110  
  
 Ser  
 <210> 65  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(107)  
 <223> Domeniul variabil al lanțului ușor al PD-1 mAb A  
 20 <400> 65

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> 66

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(120)

<223> Domeniul variabil al lanțului greu al PD-1 mAb B

10 <400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 67

15 <211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(111)

<223> Domeniul variabil al lanțului ușor al PD-1 mAb B

<400> 67

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

5 <210> 68

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(288)

<223> Polipeptida PD-1 umană (secvență NCI NP 005009.2)

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

15 <222> (1)..(20)

<223> Secvență semnal PD-1 uman

<400> 68

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln  
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp  
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp  
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val  
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala  
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg  
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg  
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu  
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val  
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro  
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly  
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys  
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro  
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly  
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro  
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly  
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg  
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu  
275 280 285

<210> 69

<211> 121

<212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 5 <222> (1)..(121)  
 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 1  
 <400> 69  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Arg Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Asn Asp  
 20 25 30  
  
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45  
  
 Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
  
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
  
 10 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 70  
 <211> 373  
 <212> ADN  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(373)  
 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 1  
 <400> 70  
 cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc 60  
 tctgtccctc acctgcactg tcactggcct ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg 120  
 gatccgacag tttccaggaa acaaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag 180  
 cactagctac aaccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa 240  
 ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc 300  
 aagagattac ggtagtggct acccctatac ttgggactac tggggtcaag gtacctcagt 360  
 20 caccgtctcc tcc 373  
 <210> 71  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 25 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(6)  
 <400> 71

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn  
 1 5  
 <210> 72  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRH2 a PD-1 mAb 1  
 10 <400> 72  
 His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 73  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(12)  
 <223> CDRH3 a PD-1 mAb 1  
 20 <400> 73  
 Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 74  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(106)  
 <223> Domeniul VL al PD-1 mAb 1  
 30 <400> 74  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val  
 20 25 30  
  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Gln Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
  
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr  
 85 90 95  
  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 75  
 <211> 318  
 <212> ADN  
 35 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(318)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 1  
 <400> 75  
 caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga 120  
 tcctccccc aacctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtggt agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg 300  
 accaagctgg aaataaaa 318  
 <210> 76  
 5 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 10 <222> (1)..(10)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 1  
 <400> 76  
 Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr  
 1 5 10  
 <210> 77  
 15 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 20 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 1  
 <400> 77  
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5  
 <210> 78  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 30 <222> (1)..(9)  
 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 1  
 <400> 78  
 Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 79  
 35 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 1 VH1  
 40 <400> 79

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

141

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Asn Asp  
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val  
65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 80

<211> 363

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 1 VH1

<400> 80

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctgggtgaagc catcccagac actgagcctg 60

acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag 120

cctcccggta aagggtgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat 180

aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt 240

ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat 300

ggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc 360

tcc 363

10 <210> 81

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 1 VL1

<400> 81

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gln Pro Leu Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 82

<211> 318

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 1 VL1

<400> 82

gaaatcggtc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct ccccgaggaga aaagggtcacc 60

attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccgtt 120

caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctgggtat cccagctcgt 180

ttttccggta gcgggtcogg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa 240

gacgccgccca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc 300

accaaagtcg aaataaag 318

10 <210> 83

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(116)

<223> Domeniul VH al PD-1 mAb 2

<400> 83

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ser Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 84

<211> 348

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(348)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 2

10 <400> 84

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat atcagtagtg gcagtatgag catttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaataa ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 2

20 <400> 85

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a PD-1 mAb 2

<400> 86

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 87

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

10 <222> (1)..(7)

<223> CDRH3 a PD-1 mAb 2

<400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 88

15 <211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

20 <222> (1)..(112)

<223> Domeniul VL al PD-1 mAb 2

<400> 88

Asp Val Val Met Ser Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Phe Phe Cys Ser Gln Thr  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 89

25 <211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

30 <222> (1)..(336)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 2

<400> 89

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg gaaacaccta tttacattgg 120  
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180  
 tctgggggtcc ccgacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg 300  
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336  
 <210> 90  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 2  
 10 <400> 90  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15  
 <210> 91  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 2  
 20 <400> 91  
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 <210> 92  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 2  
 30 <400> 92  
 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 93  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 35 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 2 VH1  
 <400> 93

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ser Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 94

<211> 348

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 2 VH1

<400> 94

gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg 60

tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttgga tgcattgggt gcgccaggct 120

cccggaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat 180

10 gccgacacag tgaaaggcag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac 240

ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttcctgtct 300

gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc 348

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 2 VL1

<400> 95

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

147

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr  
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 96

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 2 VL1

<400> 96

gacgttggtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctggggcca gccagccagt 60

atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg 120

tacctgcaaa aaccagggca gagccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt 180

tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc 240

tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc 300

tggacttttg gccaaaggtag taagctggaa atcaag 336

10 <210> 97

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(125)

<223> Domeniul VH al PD-1 mAb 3

<400> 97

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

148

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe  
85 90 95

Thr Arg Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; caracteristică\_div.

&lt;222&gt; (1)..(375)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 3

10 &lt;400&gt; 98

caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag 300

attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

&lt;210&gt; 99

15 &lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

20 &lt;222&gt; (1)..(5)

&lt;223&gt; CDRH1 a PD-1 mAb 3

&lt;400&gt; 99

Asp Tyr Val Met His

1 5

&lt;210&gt; 100

25 &lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

<220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(17)  
 <223> CDRH2 a PD-1 mAb 3  
 5 <400> 100  
 Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 <210> 101  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 10 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRH3 a PD-1 mAb 3  
 15 <400> 101  
 Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10 15  
 <210> 102  
 <211> 112  
 20 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(112)  
 25 <223> Domeniul VL al PD-1 mAb 3  
 <400> 102  
 Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser  
 20 25 30  
  
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
  
 Ser His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 103  
 <211> 336  
 30 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(336)  
 35 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 3  
 <400> 103

```

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtcg gaacattgta catagtaatg gagacaccta ttggaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatcttccg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa      336
<210> 104
5 <211> 16
  <212> PRT
  <213> Mus musculus
  <220>
  <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
10 <222> (1)..(16)
  <223> CDRL1 a PD-1 mAb 3
  <400> 104
  Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
  1          5          10          15
  <210> 105
15 <211> 7
  <212> PRT
  <213> Mus musculus
  <220>
  <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
20 <222> (1)..(7)
  <223> CDRL2 a PD-1 mAb 3
  <400> 105
  Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
  1          5
  <210> 106
25 <211> 9
  <212> PRT
  <213> Mus musculus
  <220>
  <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
30 <222> (1)..(9)
  <223> CDRL3 a PD-1 mAb 3
  <400> 106
  Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr
  1          5
  <210> 107
35 <211> 116
  <212> PRT
  <213> Mus musculus
  <220>
  <221> CARACTERISTICĂ_DIV.
40 <222> (1)..(116)
  <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 4
  <400> 107

```

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ser Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 108

<211> 348

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(348)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 4

10 <400> 108

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaataa ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 109

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

20 <223> CDRH1 a PD-1 mAb 4

<400> 109

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 110

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(17)

&lt;223&gt; CDRH2 a PD-1 mAb 4

&lt;400&gt; 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Ser | Ser | Gly | Ser | Met | Ser | Ile | Ser | Tyr | Ala | Asp | Thr | Val | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

5 &lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(7)

&lt;223&gt; CDRH3 a PD-1 mAb 4

&lt;400&gt; 111

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Thr | Asp | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

15 &lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(112)

&lt;223&gt; Domeniul VL al PD-1 mAb 4

&lt;400&gt; 112

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Val | Met | Ser | Gln | Thr | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Ser | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Gln | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | His | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Gly | Asn | Thr | Tyr | Phe | His | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Arg | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Gly | Val | Tyr | Phe | Cys | Ser | Gln | Thr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | His | Val | Pro | Trp | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

25 &lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 336

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; caracteristică\_div.

&lt;222&gt; (1)..(336)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb

&lt;400&gt; 113

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcctgca gatctagtca gaggcttggt cacagtactg gaaacaccta ttccattgg 120  
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180  
 tctgggggtcc ccgacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg 300  
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336  
 <210> 114  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 4  
 10 <400> 114  
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His  
 1 5 10 15  
 <210> 115  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 4  
 20 <400> 115  
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 <210> 116  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 4  
 30 <400> 116  
 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 117  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 35 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(119)  
 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 5  
 40 <400> 117  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ile Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 118

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(357)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 5

10 <400> 118

cagggtccaac tgcagcagcc tgggggttgaa ctgggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac 300

tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 5

20 <400> 119

Ala Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a PD-1 mAb 5

30 <400> 120

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15

**Asp**

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(10)

&lt;223&gt; CDRH3 a PD-1 mAb 5

10 &lt;400&gt; 121

Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 122

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

15 &lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1) .. (111)

&lt;223&gt; Domeniul VL al PD-1 mAb 5

20 &lt;400&gt; 122

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His  
65 70 75 80Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

&lt;210&gt; 123

25 &lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; caracteristică\_div.

30 &lt;222&gt; (1)..(333)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 5

&lt;400&gt; 123

gacattgtgc tgaccaaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg totgggacag atttcagcct caacatccat 240  
 cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300  
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333  
 <210> 124  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(15)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 5  
 10 <400> 124  
 Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 125  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 20 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 5  
 <400> 125  
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
 1 5  
 <210> 126  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)  
 30 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 5  
 <400> 126  
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 127  
 <211> 118  
 35 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(118)  
 40 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 6  
 <400> 127

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Asn Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr  
115

- 5 <210> 128  
<211> 333  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
<220>  
10 <221> caracteristică\_div.  
<222> (1)..(333)  
<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 6  
<400> 128  
gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga acgtgccact 60  
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120  
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccgcgggatct 180  
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240  
tctctgggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300  
acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333  
15 <210> 129  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<220>  
20 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
<222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 a PD-1 mAb 6  
<400> 129  
Ser Tyr Gly Met Ser  
1 5  
25 <210> 130  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(17)

&lt;223&gt; CDRH2 a PD-1 mAb 6

&lt;400&gt; 130

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ile | Ser | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Thr | Tyr | Tyr | Pro | Asp | Ser | Val | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

5 &lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(9)

&lt;223&gt; CDRH3 a PD-1 mAb 6

&lt;400&gt; 131

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Lys | Ala | Thr | Thr | Trp | Phe | Ala | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

15 &lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1) .. (111)

&lt;223&gt; Domeniul VL al PD-1 mAb 6

&lt;400&gt; 132

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Arg | Ala | Thr | Ile | Ser | Cys | Arg | Ala | Ser | Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ile | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Pro | Ala | Ser | Asn | Gln | Gly | Ser | Gly | Val | Pro | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Ser | Leu | Asn | Ile | His |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Met | Glu | Glu | Asp | Asp | Ala | Ala | Met | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Ser | Lys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Pro | Trp | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; ADN

30 &lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; caracteristică\_div.

&lt;222&gt; (1)..(333)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 6

35 &lt;400&gt; 133

```

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc      60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc      120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc      180
ggggtccttg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat      240
cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg      300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa                                    333
<210> 134
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(15)
<223> CDRL1 a PD-1 mAb 6
10 <400> 134
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
1          5          10          15
<210> 135
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 a PD-1 mAb 6
20 <400> 135
Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1          5
<210> 136
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 a PD-1 mAb 6
30 <400> 136
Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1          5
<210> 137
<211> 119
<212> PRT
35 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(119)
<223> Domeniul VH al PD-1 mAb 7
40 <400> 137

```

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

160

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ile Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 138

<211> 357

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(357)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 7

<400> 138

gagggtccaac tgcagcagcc tgggggctgaa ctgggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

gatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggaggcac 300

tacgggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc 357

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 7

<400> 139

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a PD-1 mAb 7

&lt;400&gt; 140

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ile | His | Pro | Ser | Asp | Ser | Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Gln | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Asp

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 10

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(10)

10 &lt;223&gt; CDRH3 a PD-1 mAb 7

&lt;400&gt; 141

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | Pro | Phe | Ala | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

&lt;210&gt; 142

&lt;211&gt; 111

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1) .. (111)

20 &lt;223&gt; Domeniul VL al PD-1 mAb 7

&lt;400&gt; 142

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Arg | Ala | Thr | Ile | Ser | Cys | Arg | Ala | Asn | Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Met | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Leu | Leu | Ile | His | Ala | Ala | Ser | Asn | Gln | Gly | Ser | Gly | Val | Pro | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Phe | Gly | Thr | Asp | Phe | Ser | Leu | Asn | Ile | His |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Met | Glu | Glu | Asp | Asp | Ala | Ala | Met | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Ser | Lys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |

25 &lt;210&gt; 143

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; caracteristică\_div.

&lt;222&gt; (1)..(333)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 7

&lt;400&gt; 143

gacattgtgc tgaccaaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60  
 atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120  
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180  
 ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg ttggggacag acttcagcct caacatccat 240  
 cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300  
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333  
 <210> 144  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(15)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 7  
 10 <400> 144  
 Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 145  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 7  
 20 <400> 145  
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser  
 1 5  
 <210> 146  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 7  
 30 <400> 146  
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr  
 1 5  
 <210> 147  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 35 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 7 VH1  
 <400> 147

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

163

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 148

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 148

caagttcaat tgggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tggttaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg gattgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240

atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

10 <210> 149

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 149

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

164

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ala  
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 150

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 150

caagttcaat tgggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgtaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg ggctgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac 240

atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

10 <210> 151

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 151

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

165

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 Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 152

<211> 333

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 152

gaaatcgtag tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccagggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

10 <210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 153

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 154

<211> 333

5 <212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 154

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccagggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

10 acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 155

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15 <220>

<223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 155

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 156

<211> 333

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 156

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga acgtgccact 60

10 ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg ctcattccag ccgcctctaa ccgggatct 180

ggggcgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 157

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1 a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL2 și hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 157

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn  
1 5 10 15

20 <210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

25 <223> CDRL2 a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 158

Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser  
1 5

<210> 159

<211> 113

30 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(113)  
 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 8  
 5 <400> 159  
 Glu Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Glu Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110  
 Ser  
 10 <210> 160  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 15 <222> (1)..(339)  
 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 8  
 <400> 160  
 gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
 tcctgtaagg cttctggata cagttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac 120  
 catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatggtga cactcactac 180  
 aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240  
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt 300  
 gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcc 339  
 20 <210> 161  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 25 <222> (1)..(5)  
 <223> CDRH1 a PD-1 mAb 8  
 <400> 161  
 Asp Tyr Tyr Met Asn  
 1 5  
 30 <210> 162  
 <211> 17  
 <212> PRT

<213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(17)  
 5 <223> CDRH2 a PD-1 mAb 8  
 <400> 162  
 Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 <210> 163  
 <211> 4  
 10 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(4)  
 15 <223> CDRH3 a PD-1 mAb 8  
 <400> 163  
 Asp Phe Asp Tyr  
 1  
 <210> 164  
 <211> 112  
 20 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(112)  
 25 <223> Domeniul VL al PD-1 mAb 8  
 <400> 164  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Gly Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser  
 20 25 30  
  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
  
 Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 30 <210> 165  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 35 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(336)  
 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 8

<400> 165  
 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60  
 atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg 120  
 ttctctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300  
 ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336  
 <210> 166  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 10 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 8  
 <400> 166  
 Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15  
 <210> 167  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 20 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 8  
 <400> 167  
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 <210> 168  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)  
 30 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 8  
 <400> 168  
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr  
 1 5  
 <210> 169  
 <211> 119  
 35 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(119)  
 40 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 9  
 <400> 169

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

171

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

- 5 <210> 170  
<211> 357  
<212> ADN  
<213> Mus musculus  
<220>  
<221> caracteristică\_div.
- 10 <222> (1)..(357)  
<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 9  
<400> 170  
gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tcgccagact 120  
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgttg gtggtggtaa cacctactat 180  
tcagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tocagagaca atgccaagaa caccctgtac 240  
ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggatgggt 300  
ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357
- 15 <210> 171  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.
- 20 <222> (1)..(5)  
<223> CDRH1 a PD-1 mAb 9  
<400> 171  
Ser Tyr Leu Val Ser  
1 5  
<210> 172
- 25 <211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.
- 30 <222> (1)..(17)  
<223> CDRH2 a PD-1 mAb 9

&lt;400&gt; 172

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

&lt;210&gt; 173

&lt;211&gt; 10

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(10)

10 &lt;223&gt; CDRH3 a PD-1 mAb 9

&lt;400&gt; 173

Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 174

&lt;211&gt; 107

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(107)

20 &lt;223&gt; Domeniul VL al PD-1 mAb 9

&lt;400&gt; 174

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Ile Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Thr  
 100 105

25 &lt;210&gt; 175

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; caracteristică\_div.

&lt;222&gt; (1)..(321)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 9

&lt;400&gt; 175

|    |                                                                    |     |
|----|--------------------------------------------------------------------|-----|
|    | gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc  | 60  |
|    | atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agttatttag catggtatca gcagaaacag | 120 |
|    | gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca  | 180 |
|    | aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct  | 240 |
|    | gaagattttg ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcgggtgga | 300 |
|    | ggcaccagac tggaaatcac a                                            | 321 |
|    | <210> 176                                                          |     |
|    | <211> 11                                                           |     |
|    | <212> PRT                                                          |     |
| 5  | <213> Mus musculus                                                 |     |
|    | <220>                                                              |     |
|    | <221> CARACTERISTICĂ_DIV.                                          |     |
|    | <222> (1)..(11)                                                    |     |
|    | <223> CDRL1 a PD-1 mAb 9                                           |     |
| 10 | <400> 176                                                          |     |
|    | Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala                        |     |
|    | 1 5 10                                                             |     |
|    | <210> 177                                                          |     |
|    | <211> 7                                                            |     |
|    | <212> PRT                                                          |     |
| 15 | <213> Mus musculus                                                 |     |
|    | <220>                                                              |     |
|    | <221> CARACTERISTICĂ_DIV.                                          |     |
|    | <222> (1)..(7)                                                     |     |
|    | <223> CDRL2 a PD-1 mAb 9                                           |     |
| 20 | <400> 177                                                          |     |
|    | Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala                                        |     |
|    | 1 5                                                                |     |
|    | <210> 178                                                          |     |
|    | <211> 9                                                            |     |
|    | <212> PRT                                                          |     |
| 25 | <213> Mus musculus                                                 |     |
|    | <220>                                                              |     |
|    | <221> CARACTERISTICĂ_DIV.                                          |     |
|    | <222> (1)..(9)                                                     |     |
|    | <223> CDRL3 a PD-1 mAb 9                                           |     |
| 30 | <400> 178                                                          |     |
|    | Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr                                |     |
|    | 1 5                                                                |     |
|    | <210> 179                                                          |     |
|    | <211> 119                                                          |     |
|    | <212> PRT                                                          |     |
| 35 | <213> Secvență artificială                                         |     |
|    | <220>                                                              |     |
|    | <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 9 VH1                               |     |
|    | <400> 179                                                          |     |

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

174

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 180

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VH1

<400> 180

gaggtgcagc tgggtggaaag tggggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttggaaatg ggtggccact atctccggtg gagtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaaggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240

ctccagatga actccctgcg cgcggaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300

tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

10 <210> 181

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 181

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Thr  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Ala Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 182

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 182

gaggtgcagc tgggtggaaag tggggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttggaaatg gacggccact atctccggtg gagtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240

ctccagatga actccgcacg cgcggaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300

tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc 357

10 <210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> CDRH1 a domeniului VH al hPD-1 mAb 9 VH2 avand o substituție aminoacidă de serină cu glicină

<400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly

1 5

<210> 184

20 <211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 9 VL1

25 <400> 184

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 185

<211> 321

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VL1

10 <400> 185  
gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60  
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct 120  
ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaaagccc tcgcagctgg cgtgccaaagt 180  
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc 240  
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttggaac cttcggacaa 300  
ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 186

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 186

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 Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 187

<211> 321

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VL2

10 <400> 187

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60

atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctgggtatca acagaaacct 120

ggtaaagccc caaaattgct catctacgac gccaaagccc tcgcagctgg cgtgccaaagt 180

aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcacctca ccatatctc actgcagccc 240

gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttgac ctccggacaa 300

ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1 a domeniului VL al hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 188

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

20 <210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

25 <223> CDRL2 a domeniului VL al hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 189

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala  
1 5

<210> 190

<211> 116

30 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(116)  
 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 10  
 5 <400> 190  
 Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 191  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 10 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(348)  
 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 10  
 15 <400> 191  
 gaagtgatac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact 120  
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtgggt gtggtagtaa tatctactat 180  
 ccagacagtg tgaagggtcg attcaccata tocagggaca atgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcaaatac acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa 300  
 ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348  
 <210> 192  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 20 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(5)  
 <223> CDRH1 a PD-1 mAb 10  
 25 <400> 192  
 Asn Tyr Leu Met Ser  
 1 5  
 <210> 193  
 <211> 17

<212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 5 <222> (1)..(17)  
 <223> CDRH2 a PD-1 mAb 10  
 <400> 193  
 Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 10 <210> 194  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 15 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRH3 a PD-1 mAb 10  
 <400> 194  
 Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr  
 1 5  
 20 <210> 195  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 25 <222> (1)..(107)  
 <223> Domeniul VL al PD-1 mAb 10  
 <400> 195  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe  
 20 25 30  
  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile  
 100 105  
 30 <210> 196  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 35 <222> (1)..(321)  
 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 10

<400> 196  
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60  
 atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aattttttta actggtatca gcagaaacca 120  
 gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggggc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240  
 gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcgggtgga 300  
 ggcaccaagc tggaaatcat a 321  
 <210> 197  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(11)  
 10 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 10  
 <400> 197  
 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn  
 1 5 10  
 <210> 198  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 20 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 10  
 <400> 198  
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
 1 5  
 <210> 199  
 <211> 9  
 25 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (19) .. (19)  
 30 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 10  
 <400> 199  
 Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 200  
 <211> 117  
 35 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(117)  
 40 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 11  
 <400> 200  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Thr Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 201

<211> 351

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(351)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 11

10 <400> 201

gagggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctgggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120

cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttatcctg gaaatagtga tactcactac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240

atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc 300

tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc a 351

<210> 202

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 11

20 <400> 202

Gly Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 203

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a PD-1 mAb 11

30 <400> 203

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 204

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(8)

<223> CDRH3 a PD-1 mAb 11

10 <400> 204

Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 205

<211> 106

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(106)

<223> Domeniul VL al PD-1 mAb 11

20 <400> 205

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser  
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln His Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 206

25 <211> 318

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

30 <222> (1)..(318)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 11

<400> 206

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60  
 ttctcctgca gggccagtc gagcattggc acaagcatc actggtatca gcacagaaca 120  
 aatgggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180  
 aggttttagtg gcagtggatc agggactgat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240  
 gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cggtgctggg 300  
 accaagctgg agctgaaa 318  
 <210> 207  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(11)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 11  
 10 <400> 207  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His  
 1 5 10  
 <210> 208  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 20 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 11  
 <400> 208  
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5  
 <210> 209  
 <211> 8  
 25 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(8)  
 30 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 11  
 <400> 209  
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr  
 1 5  
 <210> 210  
 <211> 125  
 35 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(125)  
 40 <223> Domeniul VH al PD-1 mAb 12  
 <400> 210

Gln Gly His Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Thr Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys  
85 90 95

Ser Arg Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 211

<211> 375

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(375)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 12

<400> 211

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcactgggt gaaacagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttcac tacaacctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300

attactacgg ttgttgaggg gccatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 212

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 12

<400> 212

Asp Tyr Glu Met His  
1 5

<210> 213

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(17)  
 <223> CDRH2 a PD-1 mAb 12  
 5 <400> 213  
 Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 <210> 214  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 10 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(16)  
 <223> CDRH3 a PD-1 mAb 12  
 15 <400> 214  
 Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10 15  
 <210> 215  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 20 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(112)  
 <223> Domeniul VL al PD-1 mAb 4  
 25 <400> 215  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser  
 20 25 30  
  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Cys Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95  
  
 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 216  
 <211> 336  
 30 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(336)  
 35 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 12  
 <400> 216

```

gatgttttga tgaccacagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct gcaaagtttc cacccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaagggtc acatgttccg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa      336
<210> 217
<211> 16
<212> PRT
5 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 a PD-1 mAb 12
10 <400> 217
  Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
   1             5             10             15
<210> 218
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 a PD-1 mAb 12
20 <400> 218
  Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser
   1             5
<210> 219
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 a PD-1 mAb 12
30 <400> 219
  Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
   1             5
<210> 220
<211> 121
<212> PRT
35 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(121)
<223> Domeniul VH al PD-1 mAb 13
40 <400> 220

```

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

187

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His  
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 221

<211> 363

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.<222> (1)..(363)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 13

<400> 221

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggttctaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tocagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct 300

tactacggta attactggta ctctgatgtc tggggcacag ggaccacggc caccgtctcc 360

tcc 363

<210> 222

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 13

<400> 222

Ser His Thr Met Ser

1 5

<210> 223

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(17)  
 <223> CDRH2 a PD-1 mAb 13  
 5 <400> 223  
 Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 <210> 224  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(12)  
 <223> CDRH3 a PD-1 mAb 13  
 15 <400> 224  
 Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10  
 <210> 225  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 20 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(107)  
 <223> Domeniul VL al PD-1 mAb 13  
 25 <400> 225  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
 20 25 30  
  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
 35 40 45  
  
 Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp  
 85 90 95  
  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 226  
 <211> 321  
 30 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> caracteristică\_div.  
 <222> (1)..(321)  
 35 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 13  
 <400> 226

```

gacattcaga tgaccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc      60
atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggg acatggttag catggtatca gcagaaacca      120
gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca      180
aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct      240
gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga      300
ggcaccaagc tggaaatcaa a                                              321
<210> 227
<211> 11
<212> PRT
5 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 a PD-1 mAb 13
10 <400> 227
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1          5          10
<210> 228
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 a PD-1 mAb 13
20 <400> 228
Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1          5
<210> 229
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 a PD-1 mAb 13
30 <400> 229
Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1          5
<210> 230
<211> 117
<212> PRT
35 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(117)
<223> Domeniul VH al PD-1 mAb 14
40 <400> 230

```

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

190

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Ser Tyr  
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile  
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met His Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Thr Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 231

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

<222> (1)..(351)

10 <223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 14

<400> 231

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caacttcac agctactgga taacctgggt gaaacagagg 120

cctggacaag gccttcagt gattggaaat atttatcctg gtactgatgg tactacctac 180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta 300

cactggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc c 351

<210> 232

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

20 <223> CDRH1 a PD-1 mAb 14

<400> 232

Ser Tyr Trp Ile Thr  
1 5

<210> 233

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(17)

&lt;223&gt; CDRH2 a PD-1 mAb 14

&lt;400&gt; 233

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ile | Tyr | Pro | Gly | Thr | Asp | Gly | Thr | Thr | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

**Ser**

5 &lt;210&gt; 234

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

10 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(8)

&lt;223&gt; CDRH3 a PD-1 mAb 14

&lt;400&gt; 234

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Leu | His | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |

15 &lt;210&gt; 235

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(107)

&lt;223&gt; Domeniul VL al PD-1 mAb 14

&lt;400&gt; 235

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Gln | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Val | Ser | Val | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Ser | Val | Gly | Thr | Asn |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Ala | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ser | Ala | Ser | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Asn | Val | Gln | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asp | Leu | Ala | Glu | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Tyr | Asn | Ser | Tyr | Pro | Tyr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |

25 &lt;210&gt; 236

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

30 &lt;221&gt; caracteristică\_div.

&lt;222&gt; (1)..(321)

&lt;223&gt; Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 14

&lt;400&gt; 236

```

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt      60
gtcacctgca aggccagtc gagtgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaagccc      120
ggccaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctccc gattcagtgg cgtccctgat      180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct      240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa a                                              321
<210> 237
<211> 11
<212> PRT
5 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 a PD-1 mAb 14
10 <400> 237
Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn Val Ala
1          5          10
<210> 238
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 a PD-1 mAb 14
20 <400> 238
Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser
1          5
<210> 239
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 a PD-1 mAb 14
30 <400> 239
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1          5
<210> 240
<211> 117
<212> PRT
35 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERISTICĂ_DIV.
<222> (1)..(117)
<223> Domeniul VH al PD-1 mAb 15
40 <400> 240

```

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 241

<211> 351

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc-caracteristică

<222> (1)..(351)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 15

10 <400> 241

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc attagtgggtg gtggtgctga cacctactat 180

gccgacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240

ctgcaaata gacgtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg 300

acctatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtc cctctctctc c 351

<210> 242

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a PD-1 mAb 15

20 <400> 242

Ser Tyr Leu Ile Ser  
1 5

<210> 243

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a PD-1 mAb 15

<400> 243

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 244

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

10 <222> (1)..(8)

<223> CDRH3 a PD-1 mAb 15

<400> 244

Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 245

15 <211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

20 <222> (1)..(107)

<223> Domeniul VL al PD-1 mAb 15

<400> 245

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 246

25 <211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> caracteristică\_div.

30 <222> (1)..(321)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 15

<400> 246

gacattcaga tgacccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60  
 atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240  
 gaagattttg taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcgggtgga 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321  
 <210> 247  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(11)  
 <223> CDRL1 a PD-1 mAb 15  
 10 <400> 247  
 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 <210> 248  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDRL2 a PD-1 mAb 15  
 20 <400> 248  
 Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp  
 1 5  
 <210> 249  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDRL3 a PD-1 mAb 15  
 30 <400> 249  
 Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr  
 1 5  
 <210> 250  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 35 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 15 VH1  
 <400> 250

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

196

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 251

<211> 351

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 15 VH1

<400> 251

gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtgggtc actcagactg 60

tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttattctta tctcttgggt gcgccaagcc 120

ccaggttaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat 180

gccgacagcg tcaagggacg tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac 240

ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg 300

acttacgcta tggactattg gggccagggc accttgggtca ctgtctcatc c 351

10 <210> 252

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <223> Domeniul VH al hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 252

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 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 253

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 253

gatatccaga tgacccagtc tcccagctct ctcaagtcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc 60

atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg cctggatatca gcagaaacct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tcgcagatgg agtgcctccc 180

cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag 300

ggtactaaac tggagatcaa a 321

10 <210> 254

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (1)..(98)

<223> Domeniu CH1 IgG4 uman

<400> 254

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val

<210> 255

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț greu al anticorpului umanizat IgG1

<400> 255

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

199

|                                                                 |  |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|--|-----|--|-----|
| 50                                                              |  | 55  |  | 60  |
| Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr |  |     |  |     |
| 65                                                              |  | 70  |  | 75  |
|                                                                 |  |     |  | 80  |
| Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 85  |  | 90  |
|                                                                 |  |     |  | 95  |
| Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 100 |  | 105 |
|                                                                 |  |     |  | 110 |
| Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 115 |  | 120 |
|                                                                 |  |     |  | 125 |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 130 |  | 135 |
|                                                                 |  |     |  | 140 |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 145 |  | 150 |
|                                                                 |  |     |  | 155 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 165 |  | 170 |
|                                                                 |  |     |  | 175 |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 180 |  | 185 |
|                                                                 |  |     |  | 190 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 195 |  | 200 |
|                                                                 |  |     |  | 205 |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 210 |  | 215 |
|                                                                 |  |     |  | 220 |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 225 |  | 230 |
|                                                                 |  |     |  | 235 |
| Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 245 |  | 250 |
|                                                                 |  |     |  | 255 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 260 |  | 265 |
|                                                                 |  |     |  | 270 |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 275 |  | 280 |
|                                                                 |  |     |  | 285 |
| Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 290 |  | 295 |
|                                                                 |  |     |  | 300 |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 305 |  | 310 |
|                                                                 |  |     |  | 315 |
|                                                                 |  |     |  | 320 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly                             |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 325 |  |     |

<210> 256

<211> 326

<212> PRT

<213> Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Lanț greu al anticorpului umanizat IgG4 cu regiune balama stabilizată

&lt;400&gt; 256

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

201

180

185

190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
325

&lt;210&gt; 257

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (1)..(98)

&lt;223&gt; Domeniul CH1 IgG2 uman

10 &lt;400&gt; 257

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val  
<210> 258

<211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 5 <223> Secvență IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
 <222> (217)..(217)  
 <223> Xaa este o lizină (K) sau este absent  
 10 <400> 258  
 Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 50 55 60  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 65 70 75 80  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 85 90 95  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 100 105 110  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 115 120 125  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 130 135 140  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 165 170 175  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 180 185 190  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 195 200 205  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
 210 215  
 <210> 259  
 15 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Secvență IgG4 pentru domeniile CH2 și CH3

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (217)..(217)

&lt;223&gt; Xaa este o lizină (K) sau este absent

5

&lt;400&gt; 259

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Tyr | Ile | Thr | Arg | Glu | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ser | Arg | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Leu | Gly | Xaa |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |

&lt;210&gt; 260

10

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Domeniile CH2 și CH3 IgG umane de tip sălbatic și variantă

15

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CARACTERISTICĂ\_DIV.

&lt;222&gt; (4)..(5)

&lt;223&gt; Xaa4 și Xaa5 sunt ambele L (de tip sălbatic), sau sunt ambele A (legare scăzută FcγgammaR)

- <220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
<222> (22)..(26)  
<223> Xaa22, Xaa24 și respectiv Xaa26 sunt M, S și T (de tip sălbatic), sau sunt Y, T și E (perioadă de  
5 înjumătățire extinsă)  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
<222> (136)..(177)  
<223> Xaa136, Xaa138, și respectiv Xaa177 sunt: T, L și Y (de tip sălbatic), sau sunt W, L și Y (nod),  
10 sau S, A și V (gaură)  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
<222> (204)..(205)  
<223> Xaa204 și respectiv Xaa205 sunt N și H (de tip sălbatic), sau sunt N și R (nici o legare a proteinei  
15 A), sau A și K (nici o legare a proteinei A)  
<220>  
<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.  
<222> (217)..(217)  
<223> Xaa217 este K sau este absent  
20 <400> 260

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

205

Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Xaa Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Xaa Xaa Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa  
210 215

<210> 261

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 2 alternativ

10 <400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 262

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 3

<400> 262

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10  
 <210> 263  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 5 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Liant 3  
 <400> 263  
 Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10  
 10 <210> 264  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 15 <223> Lanț ușor al unui anticorp PD-1 umanizat (hPD-1 mAb 7(1,2))  
 <400> 264  
 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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 265

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț greu al unui anticorp umanizat ((hPD-1 mAb 7(1,2))

<400> 265

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

**MD/EP 3456346 T2 2021.11.30**

208

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Ser | Tyr |
| 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
| 35  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Val | Ile | His | Pro | Ser | Asp | Ser | Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Gln | Lys | Phe |
| 50  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| 85  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | Pro | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
| 100 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
| 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu |
| 130 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |
| 145 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |
| 165 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |
| 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys |
| 210 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser |
| 245 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp |
| 260 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 265 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 270 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

<210> 266

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț greu al unui anticorp umanizat ((hPD-1 mAb 7(1,2))

<400> 266

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

210

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |  |  |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |
| Gly | Val | Ile | His | Pro | Ser | Asp | Ser | Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Gln | Lys | Phe |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |
| Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |
| Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | Pro | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu |  |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |  |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |  |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |  |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |  |  |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |  |  |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

<210> 267

<211> 501

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul și al treilea lanț de polipeptide al DART A

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

10 <222> (34)..(34)

<223> Xaa34 este A sau G

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (307)..(307)

15 <223> Xaa307 este Y sau M

<220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (309)..(309)

<223> Xaa309 este T sau S

20 <220>

<221> CARACTERISTICĂ\_DIV.

<222> (311)..(311)

<223> Xaa311 este E sau T

<400> 267

## 212

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Thr | Pro | Leu | Ser | Leu | Ser | Val | Thr | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Gln | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | His | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Xaa | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn | Trp | Leu | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Glu | Arg | Leu | Ile | Tyr | Leu | Val | Ser | Glu | Leu | Asp | Ser | Gly | Val | Pro |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Trp | Gln | Gly |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | His | Phe | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Ser | Tyr | Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Val | Ile | His | Pro | Ser | Asp | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Gln | Lys | Phe | Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Val |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |
| Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser |

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

213

| 210                                                                                | 215 | 220 |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly<br>225 230 235 240 |     |     |
| Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala<br>245 250 255     |     |     |
| Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu<br>260 265 270     |     |     |
| Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu<br>275 280 285     |     |     |
| Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp<br>290 295 300     |     |     |
| Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp<br>305 310 315 320 |     |     |
| Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly<br>325 330 335     |     |     |
| Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn<br>340 345 350     |     |     |
| Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp<br>355 360 365     |     |     |
| Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro<br>370 375 380     |     |     |
| Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu<br>385 390 395 400 |     |     |
| Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn<br>405 410 415     |     |     |
| Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile<br>420 425 430     |     |     |
| Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr<br>435 440 445     |     |     |
| Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg<br>450 455 460     |     |     |
| Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys<br>465 470 475 480 |     |     |
| Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu<br>485 490 495     |     |     |
| Ser Leu Ser Leu Gly<br>500                                                         |     |     |

&lt;210&gt; 268

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide al DART A

5 &lt;400&gt; 268

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu

215

165

170

175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala  
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
260 265 270

Glu

&lt;210&gt; 269

&lt;211&gt; 571

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primul și al treilea lanț de polipeptide al DART D

&lt;400&gt; 269

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

10

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

216

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr | Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | 165 | 170 | 175 |     |
| Ser | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe | Glu | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Met | Asp | 180 | 185 | 190 |     |
| Thr | Ser | Ala | Ser | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | 195 | 200 | 205 |     |
| Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | Ser | Leu | Tyr | Asp | Tyr | Tyr | 210 | 215 | 220 |     |
| Ser | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Leu | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | 245 | 250 | 255 |     |
| Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | 260 | 265 | 270 |     |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | 275 | 280 | 285 |     |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | 290 | 295 | 300 |     |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | 325 | 330 | 335 |     |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro |     |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 |
| Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 |
| Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 |
| Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala |     |     |
|                                                                 | 450 | 455 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln |     |     |
|                                                                 | 465 | 470 |
| Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 |
| Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 |
| Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 |
| Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu |     |     |
|                                                                 | 530 | 535 |
| Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His |     |     |
|                                                                 | 545 | 550 |
| Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly                     |     |     |
|                                                                 | 565 | 570 |

&lt;210&gt; 270

&lt;211&gt; 352

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide al DART D

&lt;400&gt; 270

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

218

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Thr | Pro | Leu | Ser | Leu | Ser | Val | Thr | Pro | Gly | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Gln | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | His | Ser | 20  | 25  | 30  |     |
| Asp | Ala | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn | Trp | Leu | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | 35  | 40  | 45  |     |
| Pro | Glu | Arg | Leu | Ile | Tyr | Leu | Val | Ser | Glu | Leu | Asp | Ser | Gly | Val | Pro | 50  | 55  | 60  |     |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Trp | Gln | Gly | 85  | 90  | 95  |     |
| Thr | His | Phe | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | 115 | 120 | 125 |     |
| Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | 130 | 135 | 140 |     |
| Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Ser | Tyr | Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Val | Ile | His | Pro | Ser | Asp | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Gln | Lys | Phe | Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Val | 180 | 185 | 190 |     |
| Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | 195 | 200 | 205 |     |
| Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | 210 | 215 | 220 |     |
| Pro | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Leu |     |     |     |     |

219

|                 |                 |                 |                 |     |  |     |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|--|-----|
| 225             |                 | 230             |                 | 235 |  | 240 |
| Gly Gly Gly Ser | Gly Arg Thr Val | Ala Ala Pro Ser | Val Phe Ile Phe |     |  |     |
|                 | 245             | 250             | 255             |     |  |     |
| Pro Pro Ser Asp | Glu Gln Leu Lys | Ser Gly Thr Ala | Ser Val Val Cys |     |  |     |
|                 | 260             | 265             | 270             |     |  |     |
| Leu Leu Asn Asn | Phe Tyr Pro Arg | Glu Ala Lys Val | Gln Trp Lys Val |     |  |     |
|                 | 275             | 280             | 285             |     |  |     |
| Asp Asn Ala Leu | Gln Ser Gly Asn | Ser Gln Glu Ser | Val Thr Glu Gln |     |  |     |
|                 | 290             | 295             | 300             |     |  |     |
| Asp Ser Lys Asp | Ser Thr Tyr Ser | Leu Ser Ser Thr | Leu Thr Leu Ser |     |  |     |
|                 | 305             | 310             | 315             |     |  | 320 |
| Lys Ala Asp Tyr | Glu Lys His Lys | Val Tyr Ala Cys | Glu Val Thr His |     |  |     |
|                 | 325             | 330             | 335             |     |  |     |
| Gln Gly Leu Ser | Ser Pro Val Thr | Lys Ser Phe Asn | Arg Gly Glu Cys |     |  |     |
|                 | 340             | 345             | 350             |     |  |     |

<210> 271  
 <211> 571  
 <212> PRT  
 5 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> Primul și al treilea lanț de polipeptide al DART E  
 <400> 271

|                 |                 |                 |                 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Asp Ile Val Met | Thr Gln Thr Pro | Leu Ser Leu Ser | Val Thr Pro Gly |
| 1               | 5               | 10              | 15              |
| Gln Pro Ala Ser | Ile Ser Cys Lys | Ser Ser Gln Ser | Leu Leu His Ser |
|                 | 20              | 25              | 30              |
| Asp Ala Lys Thr | Tyr Leu Asn Trp | Leu Leu Gln Lys | Pro Gly Gln Pro |
|                 | 35              | 40              | 45              |
| Pro Glu Arg Leu | Ile Tyr Leu Val | Ser Glu Leu Asp | Ser Gly Val Pro |
|                 | 50              | 55              | 60              |
| Asp Arg Phe Ser | Gly Ser Gly Ser | Gly Thr Asp Phe | Thr Leu Lys Ile |
|                 | 65              | 70              | 75              |
| Ser Arg Val Glu | Ala Glu Asp Val | Gly Val Tyr Tyr | Cys Trp Gln Gly |
|                 | 85              | 90              | 95              |

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

220

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | His | Phe | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | 115 | 120 | 125 |     |
| Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | 130 | 135 | 140 |     |
| Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | Thr | Ser | Tyr | Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Val | Ile | His | Pro | Ser | Asp | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Glu | Thr | Trp | Leu | Asp | Gln | Lys | Phe | Lys | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Val | 180 | 185 | 190 |     |
| Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | 195 | 200 | 205 |     |
| Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | 210 | 215 | 220 |     |
| Pro | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Leu | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | 245 | 250 | 255 |     |
| Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | 260 | 265 | 270 |     |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | 275 | 280 | 285 |     |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | 290 | 295 | 300 |     |
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | 325 | 330 | 335 |     |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro |     |     |     |     |

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

221

340

345

350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val  
370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
405 410 415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
420 425 430

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
435 440 445

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
450 455 460

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
465 470 475 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
485 490 495

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
565 570

<210> 272

<211> 352

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide al DART E

<400> 272

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

222

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Tyr | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Met | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | 35  | 40  | 45  |     |
| Lys | Leu | Leu | Ile | His | Ala | Ala | Ser | Asn | Gln | Gly | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | 50  | 55  | 60  |     |
| Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Ser | Leu | Glu | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Ser | Lys | 85  | 90  | 95  |     |
| Glu | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr | Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | 165 | 170 | 175 |     |
| Ser | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe | Glu | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Met | Asp | 180 | 185 | 190 |     |
| Thr | Ser | Ala | Ser | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | 195 | 200 | 205 |     |
| Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Glu | Ser | Leu | Tyr | Asp | Tyr | Tyr | 210 | 215 | 220 |     |
| Ser | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Leu |     |     |     |     |

223

|                                            |                 |                 |                 |     |  |     |
|--------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----|--|-----|
| 225                                        |                 | 230             |                 | 235 |  | 240 |
| Gly Gly Gly Ser                            | Gly Arg Thr Val | Ala Ala Pro Ser | Val Phe Ile Phe |     |  |     |
|                                            | 245             | 250             | 255             |     |  |     |
| Pro Pro Ser Asp                            | Glu Gln Leu Lys | Ser Gly Thr Ala | Ser Val Val Cys |     |  |     |
|                                            | 260             | 265             | 270             |     |  |     |
| Leu Leu Asn Asn                            | Phe Tyr Pro Arg | Glu Ala Lys Val | Gln Trp Lys Val |     |  |     |
|                                            | 275             | 280             | 285             |     |  |     |
| Asp Asn Ala Leu                            | Gln Ser Gly Asn | Ser Gln Glu Ser | Val Thr Glu Gln |     |  |     |
|                                            | 290             | 295             | 300             |     |  |     |
| Asp Ser Lys Asp                            | Ser Thr Tyr Ser | Leu Ser Ser Thr | Leu Thr Leu Ser |     |  |     |
|                                            | 305             | 310             | 315             |     |  | 320 |
| Lys Ala Asp Tyr                            | Glu Lys His Lys | Val Tyr Ala Cys | Glu Val Thr His |     |  |     |
|                                            | 325             | 330             | 335             |     |  |     |
| Gln Gly Leu Ser                            | Ser Pro Val Thr | Lys Ser Phe Asn | Arg Gly Glu Cys |     |  |     |
|                                            | 340             | 345             | 350             |     |  |     |
| <210> 273                                  |                 |                 |                 |     |  |     |
| <211> 448                                  |                 |                 |                 |     |  |     |
| <212> PRT                                  |                 |                 |                 |     |  |     |
| 5 <213> Secvență artificială               |                 |                 |                 |     |  |     |
| <220>                                      |                 |                 |                 |     |  |     |
| <223> Primul lanț de polipeptide al DART F |                 |                 |                 |     |  |     |
| <400> 273                                  |                 |                 |                 |     |  |     |
| Gln Val Gln Leu                            | Val Gln Ser Gly | Ala Glu Val Lys | Lys Pro Gly Ala |     |  |     |
| 1                                          | 5               | 10              | 15              |     |  |     |
| Ser Val Lys Val                            | Ser Cys Lys Ala | Ser Gly Tyr Ser | Phe Thr Ser Tyr |     |  |     |
|                                            | 20              | 25              | 30              |     |  |     |
| Trp Met Asn Trp                            | Val Arg Gln Ala | Pro Gly Gln Gly | Leu Glu Trp Ile |     |  |     |
|                                            | 35              | 40              | 45              |     |  |     |
| Gly Val Ile His                            | Pro Ser Asp Ser | Glu Thr Trp Leu | Asp Gln Lys Phe |     |  |     |
|                                            | 50              | 55              | 60              |     |  |     |
| Lys Asp Arg Val                            | Thr Ile Thr Val | Asp Lys Ser Thr | Ser Thr Ala Tyr |     |  |     |
|                                            | 65              | 70              | 75              |     |  | 80  |
| Met Glu Leu Ser                            | Ser Leu Arg Ser | Glu Asp Thr Ala | Val Tyr Tyr Cys |     |  |     |
|                                            | 85              | 90              | 95              |     |  |     |

## 224

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | Pro | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     | 125 |     |     |     |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu |
|     |     |     | 130 |     |     | 135 |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |
|     |     |     | 145 |     |     | 150 |     |     | 155 |     |     | 160 |     |     |     |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     | 175 |     |     |     |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     | 190 |     |     |     |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro |
|     |     |     | 195 |     |     | 200 |     |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys |
|     |     |     | 210 |     |     | 215 |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro |
|     |     |     | 225 |     |     | 230 |     |     | 235 |     |     | 240 |     |     |     |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Tyr | Ile | Thr |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     | 255 |     |     |     |
| Arg | Glu | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp |
|     |     |     | 260 |     |     | 265 |     |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn |
|     |     |     | 275 |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val |
|     |     |     | 290 |     |     | 295 |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu |
|     |     |     | 305 |     |     | 310 |     |     | 315 |     |     | 320 |     |     |     |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     | 335 |     |     |     |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr |

340

345

350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser  
 355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

&lt;210&gt; 274

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Al doilea și al cincelea lanț de polipeptide al DART F

&lt;400&gt; 274

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 275

<211> 732

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al treilea lanț de polipeptide al DART F

<400> 275

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

**MD/EP 3456346 T2 2021.11.30**

227

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Glu | His | Tyr | Gly | Thr | Ser | Pro | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu |
|     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp |
|     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro |
|     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys |
|     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro |
|     |     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Tyr | Ile | Thr |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |
| Arg | Glu | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn |
|     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val |
|     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu |
|     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

228

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp  
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Val Met Thr  
 450 455 460

Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile  
 465 470 475 480

Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr  
 485 490 495

Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Glu Arg Leu Ile  
 500 505 510

Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 515 520 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 530 535 540

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr  
 545 550 555 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 565 570 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 580 585 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

595

600

605

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
610 615 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
625 630 635 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
645 650 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
690 695 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
725 730

&lt;210&gt; 276

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Al patrulea lanț de polipeptide al DART F

&lt;400&gt; 276

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

230

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala  
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
260 265 270

Glu

<210> 277

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul lanț de polipeptide al DART G

<400> 277

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile  
 245 250 255

Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 278

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea și al cincelea lanț de polipeptide al DART G

<400> 278

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

233

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 279

<211> 732

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al treilea lanț de polipeptide al DART G

<400> 279

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

234

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe | 50  | 55  | 60  |     |
| Glu | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Met | Asp | Thr | Ser | Ala | Ser | Thr | Ala | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Arg | Glu | Ser | Leu | Tyr | Asp | Tyr | Tyr | Ser | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | 115 | 120 | 125 |     |
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | 130 | 135 | 140 |     |
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | 165 | 170 | 175 |     |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | 180 | 185 | 190 |     |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | 195 | 200 | 205 |     |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | 210 | 215 | 220 |     |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

235

```

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
      245                      250                255

Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      260                      265                270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      275                      280                285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
      290                      295                300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
      305                      310                315                320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      325                      330                335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      340                      345                350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
      355                      360                365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
      370                      375                380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
      385                      390                395                400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
      405                      410                415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
      420                      425                430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      435                      440                445

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu
      450                      455                460

Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
      465                      470                475                480

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe
      485                      490                495

```

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
500 505 510

His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
515 520 525

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
530 535 540

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr  
545 550 555 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
565 570 575

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
580 585 590

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe  
595 600 605

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
610 615 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
625 630 635 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
645 650 655

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
690 695 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
725 730

<210> 280

<211> 272

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al patrulea lanț de polipeptide al DART G

<400> 280

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

237

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu  
165 170 175

Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp  
180 185 190

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro  
210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu  
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265 270

<210> 281

<211> 503

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul lanț de polipeptide al DART H

<400> 281

5

10

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

238

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Glu | Ser | Val | Asp | Asn | Tyr | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Met | Ser | Phe | Met | Asn | Trp | Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Pro | Pro | 35  | 40  | 45  |     |
| Lys | Leu | Leu | Ile | His | Ala | Ala | Ser | Asn | Gln | Gly | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | 50  | 55  | 60  |     |
| Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Ser | Leu | Glu | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Ser | Lys | 85  | 90  | 95  |     |
| Glu | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr | Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp  
 180 185 190  
 Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu  
 195 200 205  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu  
 260 265 270  
 Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 275 280 285  
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 290 295 300  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 305 310 315 320  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 325 330 335  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 340 345 350  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 355 360 365  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 370 375 380  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 385 390 395 400  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 405 410 415

240

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
500

<210> 282

<211> 273

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea lanț de polipeptide al DART H

<400> 282

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

241

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly  
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala  
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala  
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser  
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser  
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala  
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
260 265 270

Glu

<210> 283

<211> 227

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al treilea lanț de polipeptide al DART H

<400> 283

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
20 25 30

10

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val  
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
210 215 220

Pro Gly Lys  
225

<210> 284

<211> 563

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul și al treilea lanț de polipeptide al DART 1

<400> 284

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

243

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile 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  |
| Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu | 85  | 90  | 95  |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly | 100 | 105 | 110 |
| Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln | 115 | 120 | 125 |
| Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe | 130 | 135 | 140 |
| Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu | 145 | 150 | 155 |
| Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala | 165 | 170 | 175 |
| Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn | 180 | 185 | 190 |
| Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val | 195 | 200 | 205 |
| Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val | 210 | 215 | 220 |
| Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro | 225 | 230 | 235 |
| Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr | 245 | 250 | 255 |

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 260 265 270

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 275 280 285

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 290 295 300

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 305 310 315 320

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
 325 330 335

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
 340 345 350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 355 360 365

Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 370 375 380

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 385 390 395 400

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 405 410 415

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 420 425 430

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 435 440 445

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 450 455 460

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 465 470 475 480

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 485 490 495

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 500 505 510

245

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
515 520 525

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
530 535 540

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
545 550 555 560

Ser Pro Gly

<210> 285

<211> 348

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide al DART 1

<400> 285

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 Gly Gly Gly Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys  
115 120 125

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe  
130 135 140

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

246

Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro  
165 170 175

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
180 185 190

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
195 200 205

Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro  
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser  
225 230 235 240

Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
245 250 255

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
260 265 270

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
275 280 285

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
290 295 300

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
305 310 315 320

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
325 330 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
340 345

<210> 286

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul lanț de polipeptide al BSAB A

<400> 286

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

10

## MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

247

|                                                                 |                 |                         |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|---------|
| 1                                                               | 5               | 10                      | 15      |
| Ser Val Lys Val                                                 | Ser Cys Lys Ala | Ser Gly Tyr Ser Phe Thr | Ser Tyr |
| 20                                                              | 25              | 30                      |         |
| Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile |                 |                         |         |
| 35                                                              | 40              | 45                      |         |
| Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe |                 |                         |         |
| 50                                                              | 55              | 60                      |         |
| Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr |                 |                         |         |
| 65                                                              | 70              | 75                      | 80      |
| Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |                 |                         |         |
|                                                                 | 85              | 90                      | 95      |
| Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly |                 |                         |         |
|                                                                 | 100             | 105                     | 110     |
| Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe |                 |                         |         |
|                                                                 | 115             | 120                     | 125     |
| Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu |                 |                         |         |
|                                                                 | 130             | 135                     | 140     |
| Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp |                 |                         |         |
| 145                                                             | 150             | 155                     | 160     |
| Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu |                 |                         |         |
|                                                                 | 165             | 170                     | 175     |
| Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser |                 |                         |         |
|                                                                 | 180             | 185                     | 190     |
| Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro |                 |                         |         |
|                                                                 | 195             | 200                     | 205     |
| Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Lys |                 |                         |         |
|                                                                 | 210             | 215                     | 220     |
| Thr His Thr Cys Pro Glu Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro |                 |                         |         |
| 225                                                             | 230             | 235                     | 240     |
| Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser |                 |                         |         |
|                                                                 | 245             | 250                     | 255     |

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

<210> 287

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea lanț de polipeptide al BSAB A

<400> 287

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

249

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 288

<211> 449

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Al treilea lanț de polipeptide al BSAB A

<400> 288

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

250

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Met | Asp | Thr | Ser | Ala | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Arg | Glu | Ser | Leu | Tyr | Asp | Tyr | Tyr | Ser | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val |
|     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Arg |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Arg | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu |

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

251

260

265

270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly

<210> 289

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al patrulea lanț de polipeptide al BSAB A

<400> 289

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

10

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

252

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 290

<211> 496

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul și al treilea lanț de polipeptide al DART I

<400> 290

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 115 120 125  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe  
 130 135 140  
 Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
 165 170 175  
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 180 185 190  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 195 200 205  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
 210 215 220  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 245 250 255

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

254

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ser Lys Tyr  
260 265 270

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro  
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr  
290 295 300

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
305 310 315 320

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
485 490 495

<210> 291

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide al DART I

<400> 291

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

255

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val  
165 170 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp  
180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp  
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe  
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys  
245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265 270

<210> 292

<211> 566

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Primul și al treilea lanț de polipeptide al DART J

<400> 292

# MD/EP 3456346 T2 2021.11.30

256

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Asp | Val | Ser | Ser | Val | 20  | 25  | 30  |     |
| Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | 35  | 40  | 45  |     |
| Tyr | Ser | Ala | Ser | Tyr | Arg | Tyr | Thr | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | His | Tyr | Ser | Thr | Pro | Trp | 85  | 90  | 95  |     |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | 115 | 120 | 125 |     |
| Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ser | Phe | 130 | 135 | 140 |     |
| Thr | Ser | Tyr | Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | 145 | 150 | 155 | 160 |

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp  
 165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp  
 210 215 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly  
 225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 245 250 255

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 260 265 270

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 275 280 285

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 290 295 300

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 305 310 315 320

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 325 330 335

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 340 345 350

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 355 360 365

Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 370 375 380

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 385 390 395 400

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 405 410 415

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
420 425 430

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
435 440 445

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
450 455 460

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
465 470 475 480

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
485 490 495

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
500 505 510

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
515 520 525

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
530 535 540

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
545 550 555 560

Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
565

<210> 293

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Al doilea și al patrulea lanț de polipeptide al DART J

<400> 293

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 Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys  
 85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly  
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala  
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val  
 165 170 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp  
 180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp  
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe  
 210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 245 250 255

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 260 265 270

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn  
 275 280 285

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
 290 295 300

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala  
 305 310 315 320

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly  
 325 330 335

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 340 345 350

<210> 294  
 <211> 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Domeniul VH al hLAG-3 mAb 6 VH1

5 &lt;400&gt; 294

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 295

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Secvență artificială

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Domeniul VH al hLAG-3 mAb 6 VH2

&lt;400&gt; 295

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 296

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hLAG-3 mAb 6 VL1

<400> 296

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

10

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 297

<211> 107

<212> PRT

15

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al hLAG-3 mAb 6 VL2

<400> 297

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 298

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<223> CDR1 a domeniului VL al hLAG-3 mAb 6 VL1 și VL2

<400> 298

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala  
1 5 10

10

#### (56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- J. MATSUZAKI ET AL: "Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 17, 27 April 2010 (2010-04-27), pages 7875-7880, XP055147797, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1003345107
- EP-A1- 2 839 842
- WEIQING JING ET AL: "Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 3, no. 1, 20 January 2015 (2015-01-20), page 2, XP021210655, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/S40425-014-0043-Z
- WO-A1-2010/080538
- WO-A1-2015/048312
- WO-A2-2014/179664
- WO-A2-2014/194302
- US-A1- 2014 093 511

**(57) Revendicări:**

1. O moleculă de legare la PD-1 anti-umană multispecifică care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu și un domeniu variabil al lanțului ușor, în care: respectivul domeniu variabil al lanțului greu cuprinde secvența de aminoacizi din **SEQ ID NO:147**, și respectivul domeniu variabil al lanțului ușor cuprinde secvența de aminoacizi din **SEQ ID NO:153**.

2. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 1, în care respectiva moleculă este o moleculă de legare bispecifică, capabilă să se lege simultan la PD-1 uman și la un al doilea epitop.

3. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 2, în care respectivul al doilea epitop este un epitop al unei molecule implicate în reglarea unui punct de control imun prezent pe suprafața unei celule imune, în care respectivul al doilea epitop este un epitop de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC de clasă I sau II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 sau VISTA.

4. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 3, în care respectivul al doilea epitop este un epitop de LAG-3.

5. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 4, în care respectivul situs de legare la epitopul LAG-3 cuprinde:

(A)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al LAG-3 mAb 1, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:42**, **SEQ ID NO:43**, și **SEQ ID NO:44**; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 1, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:46**, **SEQ ID NO:47**, și **SEQ ID NO:48**;

sau

(B)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al hLAG-3 mAb 1 VH1, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:42**, **SEQ ID NO:43**, și **SEQ ID NO:44**; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 1 VL4, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:55**, **SEQ ID NO:47**, și **SEQ ID NO:48**;

sau

(C)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al LAG-3 mAb 6, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:57**, **SEQ ID NO:58**, și **SEQ ID NO:59**; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 6, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:61**, **SEQ ID NO:62**, și **SEQ ID NO:63**;

sau

(D)

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> al lanțului greu variabil al hLAG-3 mAb 6 VH1, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:57**, **SEQ ID NO:58**, și **SEQ ID NO:59**; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al LAG-3 mAb 6 și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:298**, **SEQ ID NO:62**, și **SEQ ID NO:63**.

6. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 5, în care respectivul situs de legare al epitopului LAG-3 cuprinde:

(1) domeniul CDR<sub>H1</sub>, domeniul CDR<sub>H2</sub>, și domeniul CDR<sub>H3</sub> ale lanțului greu variabil al hLAG-3 mAb 6 VH1, și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:57**, **SEQ ID NO:58**, și **SEQ ID NO:59**; și

(2) domeniul CDR<sub>L1</sub>, domeniul CDR<sub>L2</sub>, și domeniul CDR<sub>L3</sub> ale lanțului ușor variabil al hLAG-3 mAb 6 VL1/VL2 și respectiv cuprinde secvențele de aminoacizi: **SEQ ID NO:298**, **SEQ ID NO:62**, și **SEQ ID NO:63**.

7. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 6, în care respectivul situs de legare la epitopul LAG-3 cuprinde:

(1) lanțul greu variabil al hLAG-3 mAb 6 VH1 (**SEQ ID NO:294**) și

(2) lanțul ușor variabil al hLAG-3 mAb 6 VL1 (**SEQ ID NO:296**).

8. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care respectiva moleculă este:

(A) un diacorp, respectivul diacorp fiind un complex de legare covalent care cuprinde două, trei, patru sau cinci lanțuri de polipeptide; sau

(B) o moleculă de legare trivalentă, respectiva moleculă de legare trivalentă fiind un complex de legare covalent care cuprinde trei, patru sau cinci lanțuri de polipeptide, sau

(C) un anticorp bispecific.

9. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 8, în care respectiva moleculă este un diacorp și cuprinde un domeniu de legare al albuminei (ABD).

10. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform oricăreia dintre revendicările 1-9, în care respectiva moleculă cuprinde o regiune Fc, și în care:

(a) respectiva regiune Fc este de izotip IgG1, IgG2, IgG3, sau IgG4;

(b) respectiva moleculă cuprinde suplimentar un domeniu balama;

(c) respectiva regiune Fc este un domeniu Fc IgG4 și respectivul anticorp cuprinde suplimentar un domeniu balama IgG4 care cuprinde o mutație de stabilizare; sau

(d) respectiva regiune Fc cuprinde una sau mai multe modificări de aminoacizi care reduc afinitatea unei variante a regiunii Fc pentru un FcγR; și/sau

(e) respectiva regiune Fc cuprinde una sau mai multe modificări de aminoacizi care sporesc perioada de înjumătățire în ser a variantei regiunii Fc.

11. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 10, în care:

(A) respectiva una sau mai multe modificări care reduc afinitatea unei variante a regiunii Fc pentru un FcγR, și respectivele modificări cuprind substituția de L234A; L235A; sau L234A și L235A, în care respectiva numărătoare este cea a indicelui EU ca în Kabat; și

(B) respectiva una sau mai multe modificări care sporesc perioada de înjumătățire în ser a variantei regiunii Fc, și respectivele modificări care sporesc perioada de înjumătățire în ser a variantei regiunii Fc cuprind substituția de M252Y; M252Y și S254T; M252Y și T256E; M252Y, S254T și T256E; sau K288D și H435K, în care respectiva numărătoare este cea a indicelui EU ca în Kabat.

12. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform oricăreia dintre revendicările 8, 10 sau 11, în care respectiva moleculă este un diacorp care cuprinde:

(a) **SEQ ID NO:267**, în care X<sub>1</sub> este Ala; X<sub>2</sub> este Tyr; X<sub>3</sub> este Thr; X<sub>4</sub> este Glu, și **SEQ ID NO:268**; sau

(b) **SEQ ID NO:267**, în care X<sub>1</sub> este Gly; X<sub>2</sub> este Tyr; X<sub>3</sub> este Thr; X<sub>4</sub> este Glu, și **SEQ ID NO:268**; sau

(c) **SEQ ID NO:267**, în care X<sub>1</sub> este Gly; X<sub>2</sub> este Met; X<sub>3</sub> este Ser; X<sub>4</sub> este Thr, și **SEQ ID NO:268**; sau

(d) **SEQ ID NO:269 și 270**; sau

(e) **SEQ ID NO:271 și 272**; sau

(f) **SEQ ID NO:273, 274, 275, și 276**; sau

(g) **SEQ ID NO:277, 278, 279, și 280**; sau

(h) **SEQ ID NO:281, 282, și 283**; sau

(i) **SEQ ID NO:290 și 291**; sau

(j) **SEQ ID NO:292 și 293**.

13. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform revendicării 12, în care respectiva moleculă este un diacorp cuprinzând **SEQ ID NOs:290 și 291**.

**14. O compoziție cuprinzând:**

- (A) Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform oricăreia dintre revendicările 1-13; și  
(B) un purtător acceptabil farmaceutic.

**15. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform oricăreia dintre revendicările 1-13, sau compoziția conform revendicării 14, pentru utilizare în:**

- (A) o metodă de stimulare a răspunsului imun mediat de celula T a unui subiect care are nevoie de aceasta; sau  
(B) tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu un sistem imunitar suprimat.

**16. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică sau compoziția conform revendicării 15, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 15, în care boala sau afecțiunea este cancerul sau o infecție, în care opțional respectivul cancer este selectat din grupul constând din:** o tumoră a glandei suprarenale, un cancer asociat cu SIDA, un sarcom parțial alveolar ușor, o tumoră astrocitică, cancer la vezică, cancer osos, un cancer la creier și măduva spinării, o tumoră cerebrală metastatică, un cancer la sân, o tumoră a corpului carotidic, un cancer de col uterin, un condrosarcom, un cordom, un carcinom cromofob cu celule renale, un carcinom cu celule clare, un cancer la colon, un cancer colorectal, un histocitom fibros benign cutanat, o tumoră desmoplazică cu celule mici rotunde, un ependimom, o tumoră Ewing, un condrosarcom mixoid extraskeletal, o fibrogenză imperfectă a osiului, o displazie fibroasă a osului, un cancer al vezicii biliare sau al canalului biliar, cancer gastric, o boală trofoblastică gestațională, o tumoră celulară germinală, un cancer la cap și gât, carcinom hepatocelular, o tumoră cu celule insulare, un sarcom Kaposi, un cancer la rinichi, o leucemie, o tumoră lipomatoasă lipomă/benignă, o tumoră lipomatoasă liposarcom/malignă, un cancer hepatic, un limfom, un cancer pulmonar, un meduloblastom, un melanom, un meningiom, o neoplazie endocrină multiplă, un mielom multiplu, un sindrom mielodisplazic, un neuroblastom, o tumoră neuroendocrină, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un carcinom tiroidian papilar, o tumoră paratiroidă, un cancer pediatric, o tumoră a tecii nervoase periferice, un feocromocitom, o tumoră pituitară, un cancer la prostată, un melanom uveal posterior, o tulburare hematologică rară, un cancer metastatic renal, o tumoră rabdoidă, un rabdomiosarcom, un sarcom, un cancer la piele, un sarcom ușor de țesut, un cancer de celule scuamoase, un cancer la stomac, un sarcom sinovial, un cancer testicular, un carcinom timic, un timom, un cancer metastatic tiroidian, și un cancer uterin, în care opțional respectivul cancer este cancer colorectal, carcinom hepatocelular, gliom, cancer la rinichi, cancer la sân, mielom multiplu, cancer la vezică, neuroblastom; sarcom, limfom non-Hodgkin, cancer pulmonar nonmicrocelular, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer rectal, leucemie mieloidă acută (AML), leucemie mielogenă cronică (CML), leucemie limfoblastică acută B (B-ALL), leucemie limfocitară cronică (CLL), leucemie cu celule păroase (HCL), neoplasm celular dendritic plasmacitoid blastic (BPDCN), limfoame non-Hodgkin (NHL), incluzând leucemia cu celule manta (MCL), și limfom limfocitic mic (SLL), limfom Hodgkin, mastocitoză sistemică, sau limfom Burkitt.

**17. Molecula de legare la PD-1 anti-umană multispecifică conform oricăreia dintre revendicările 1-13, în care respectiva moleculă este pentru utilizare într-o metodă *in vitro* de detectare a PD-1, și în care respectiva moleculă sau respectivul anticorp este marcat detectabil.**

**18. Utilizarea unor molecule de legare la PD-1 anti-umane multispecifice conform oricăreia dintre revendicările 1-13 în detecția *in vitro* a PD-1, în care respectiva moleculă sau respectivul anticorp sunt marcate detectabil.**

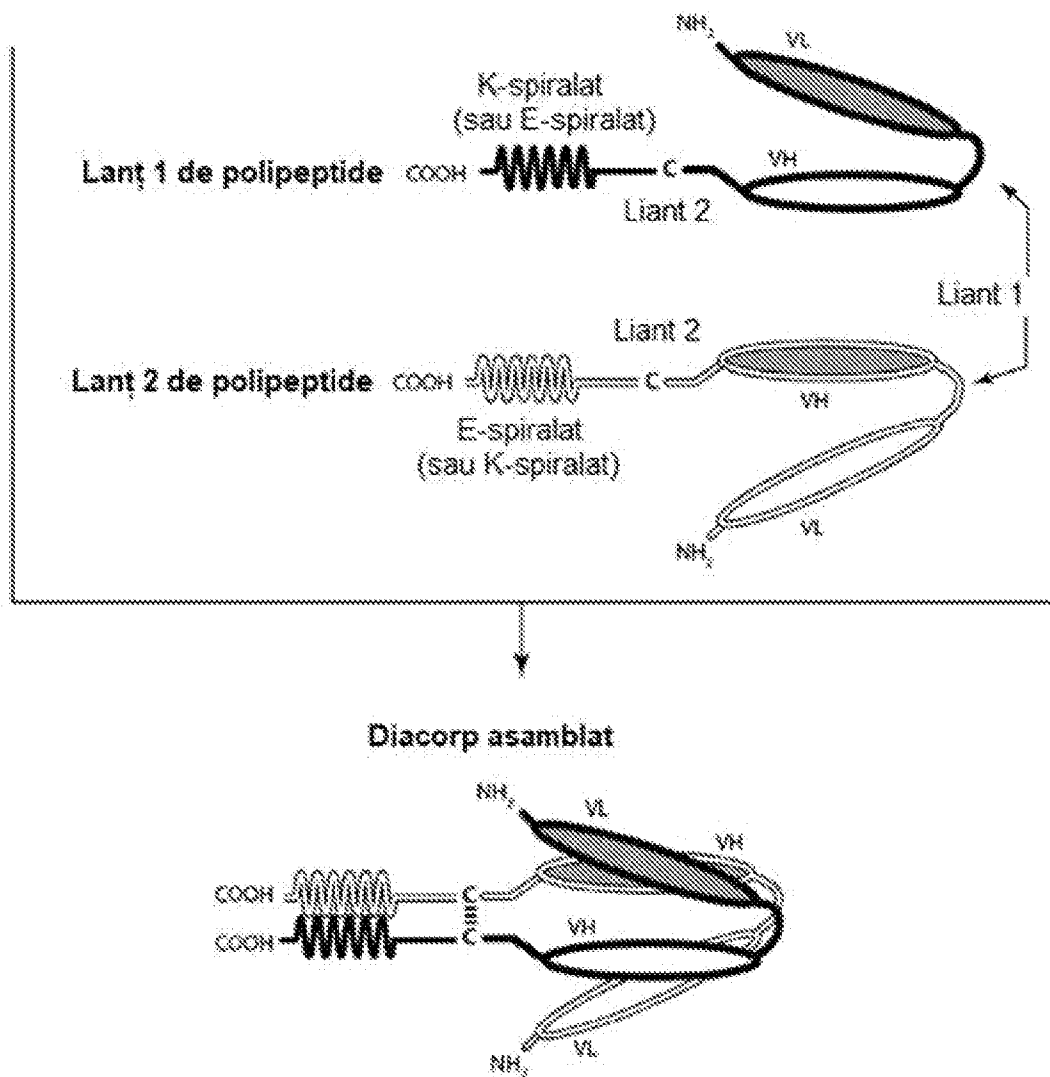


Figura 1

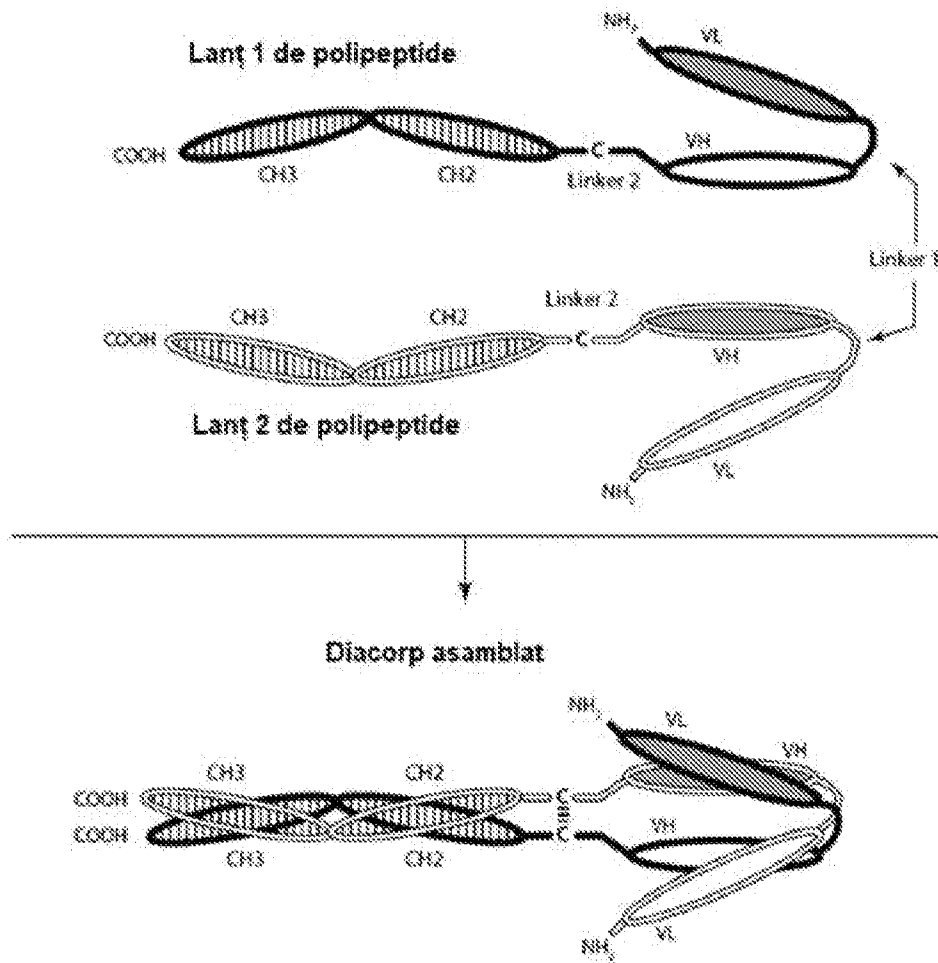


Figura 2

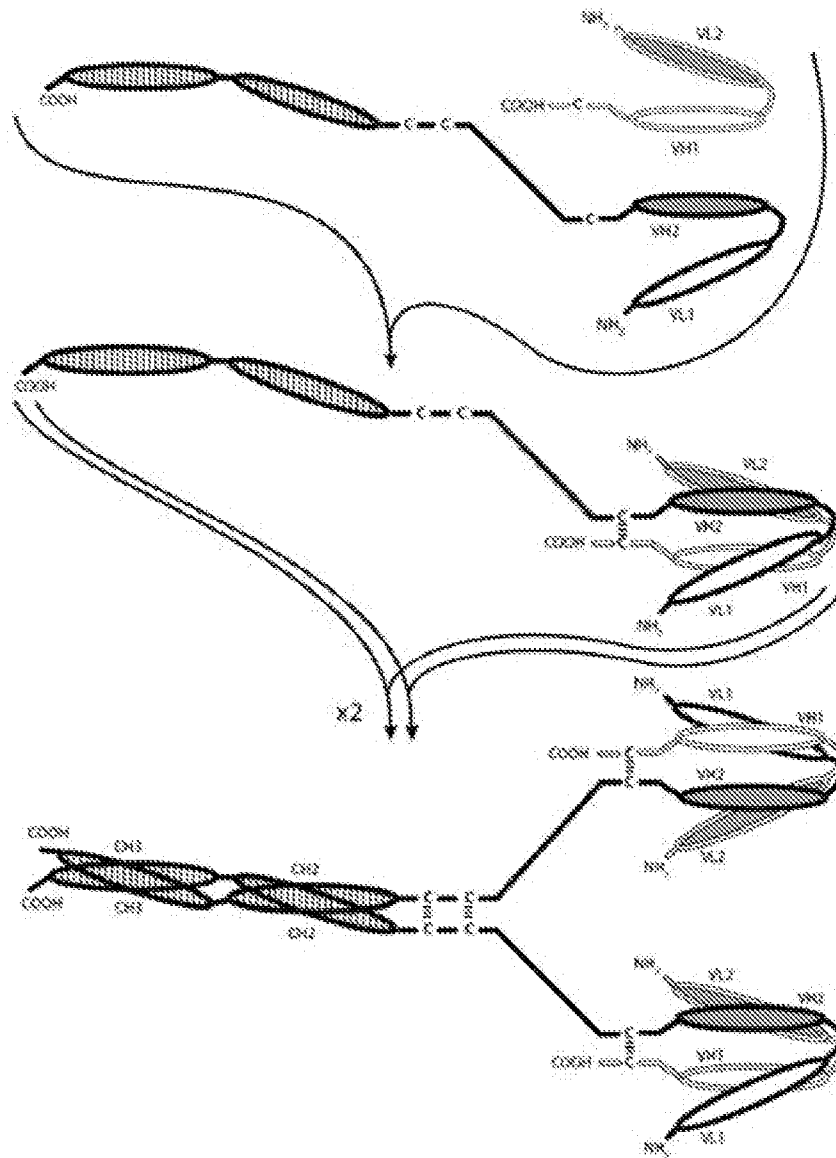


Figura 3A

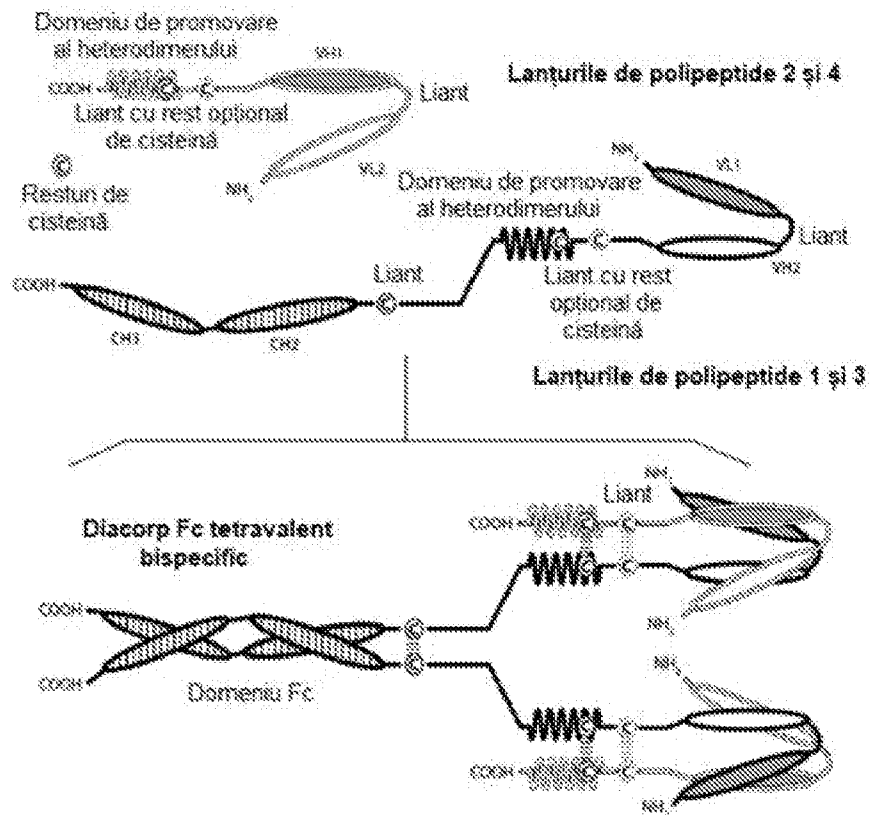
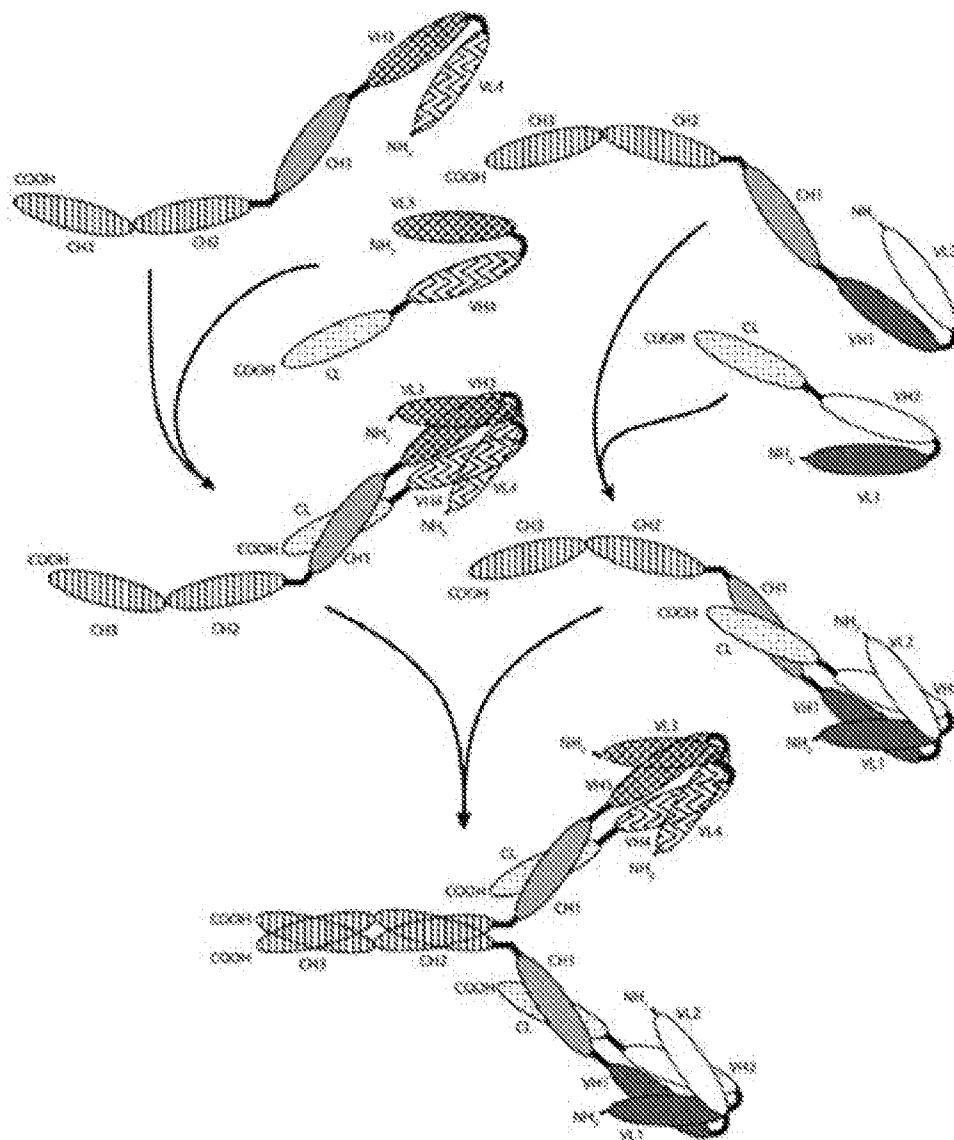


Figura 3B

**Figura 3C**

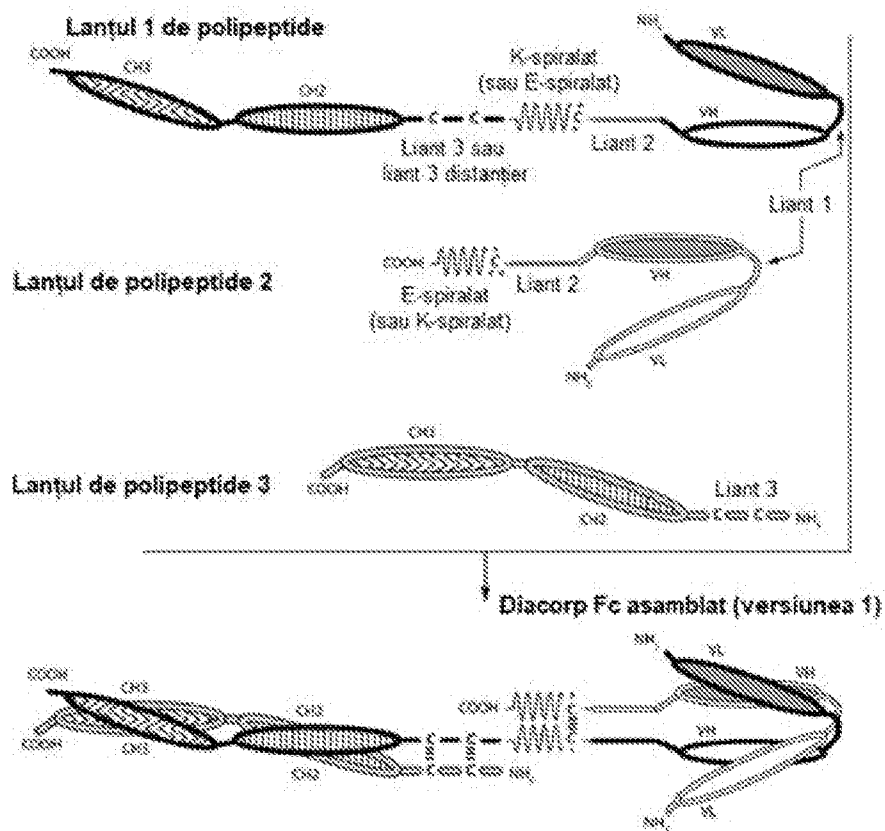


Figura 4A

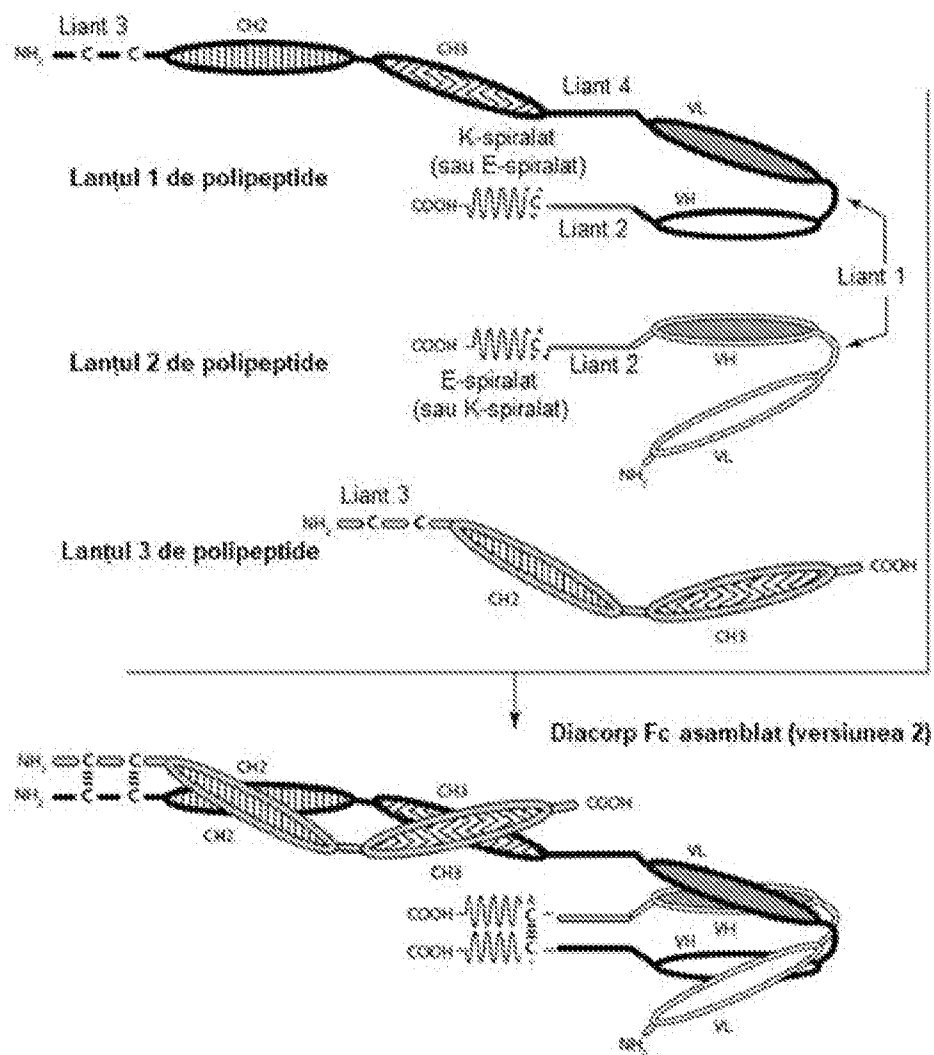


Figura 4B

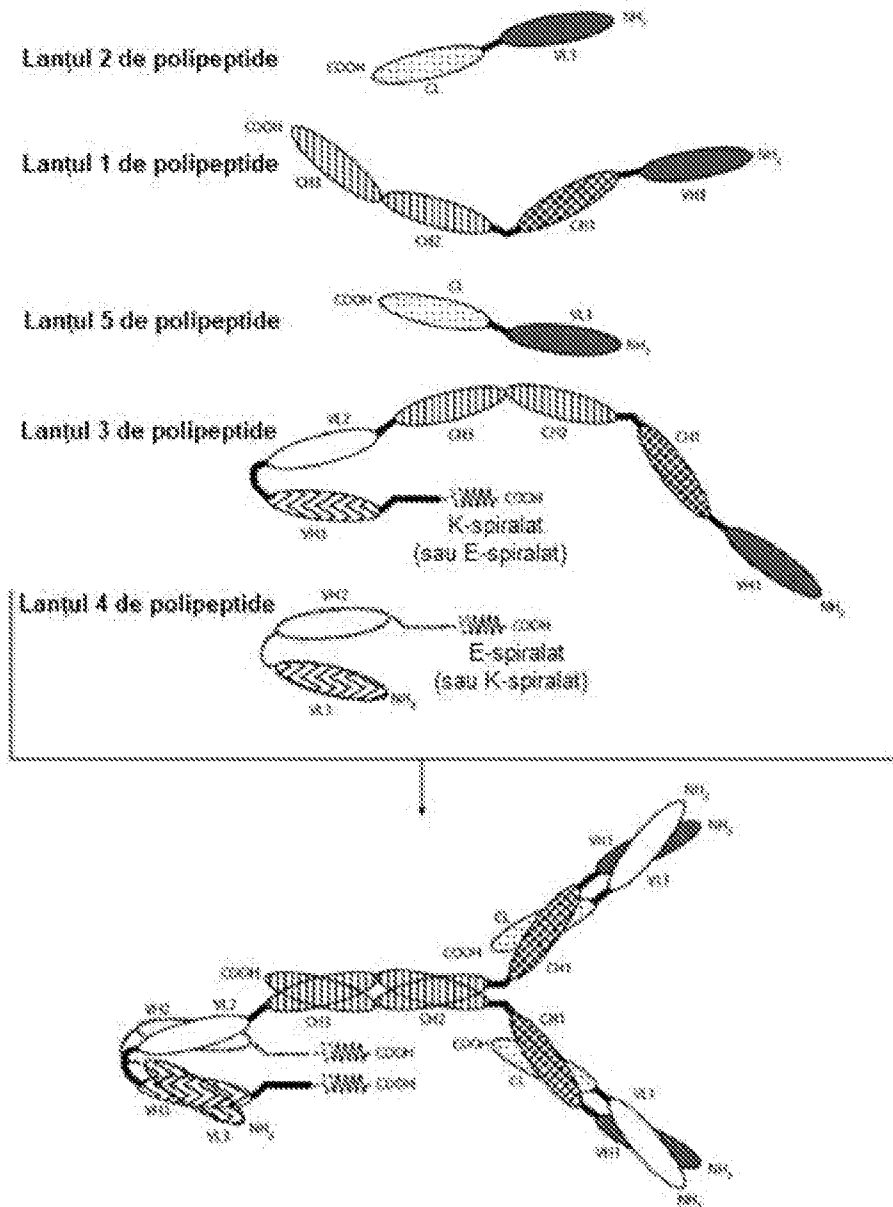


Figura 5

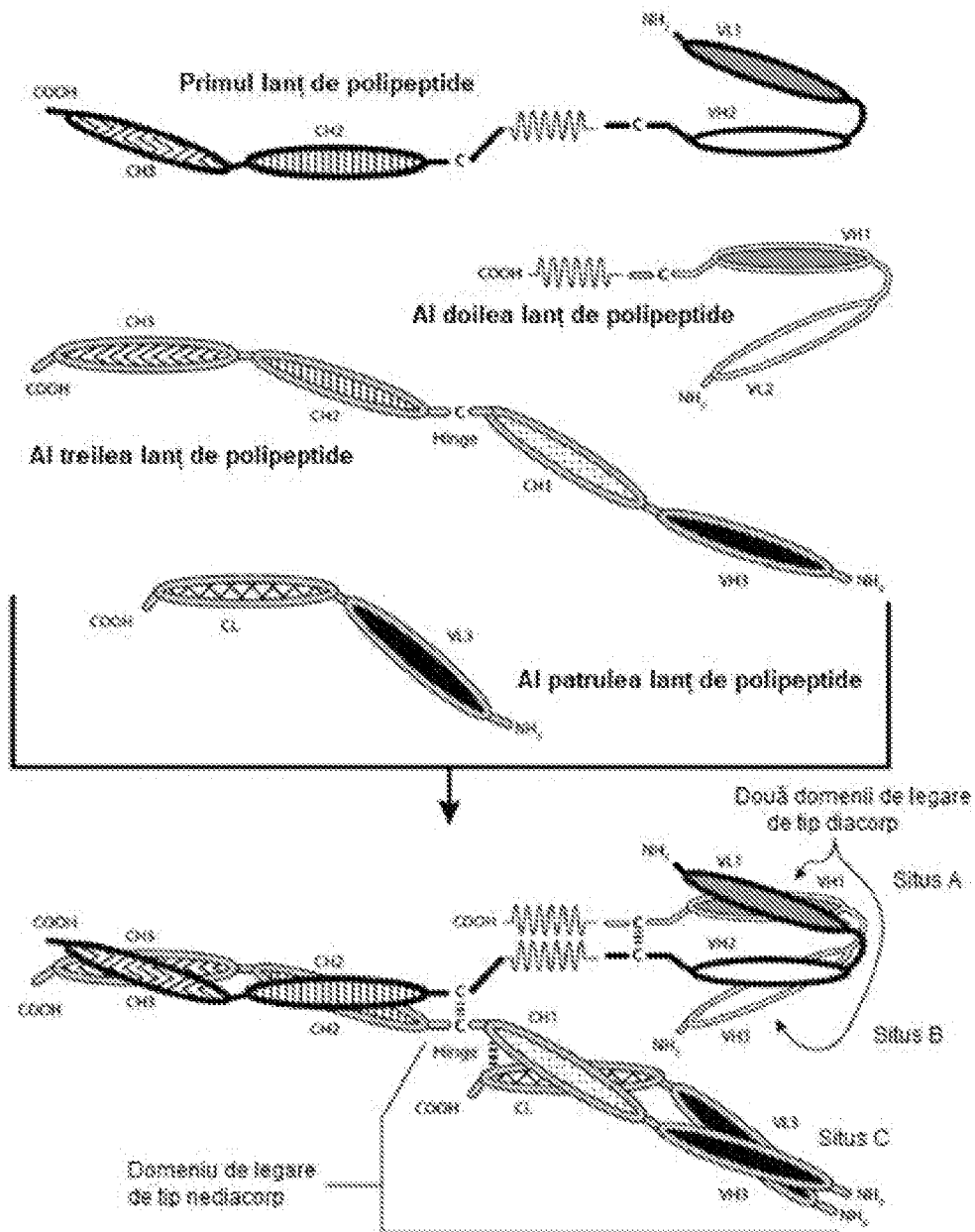


Figura 6A

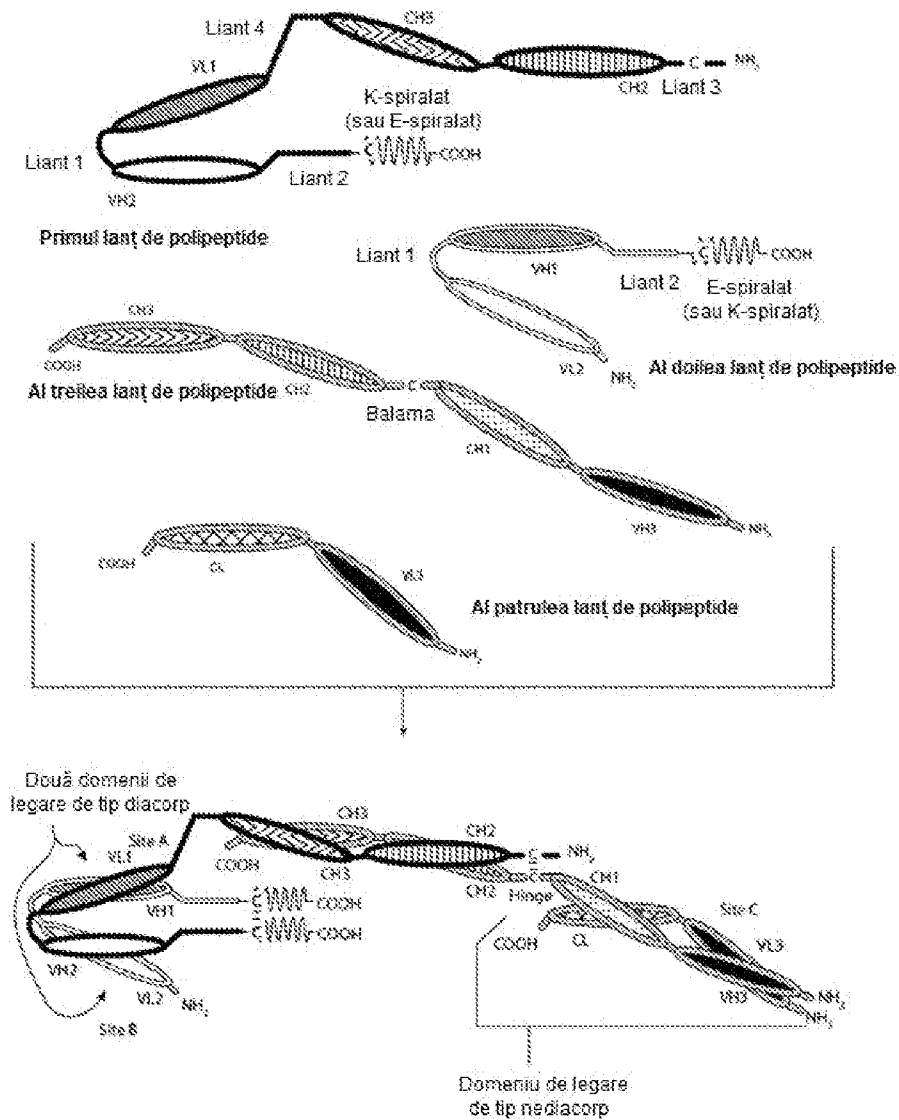


Figura 6B

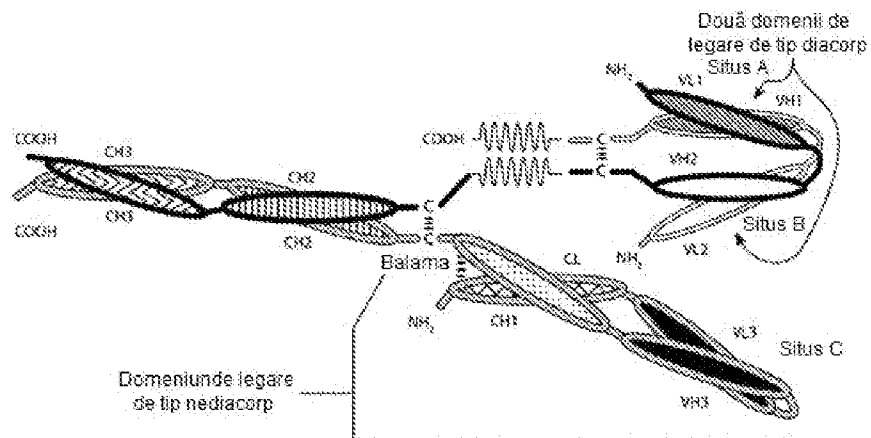


Figura 6C

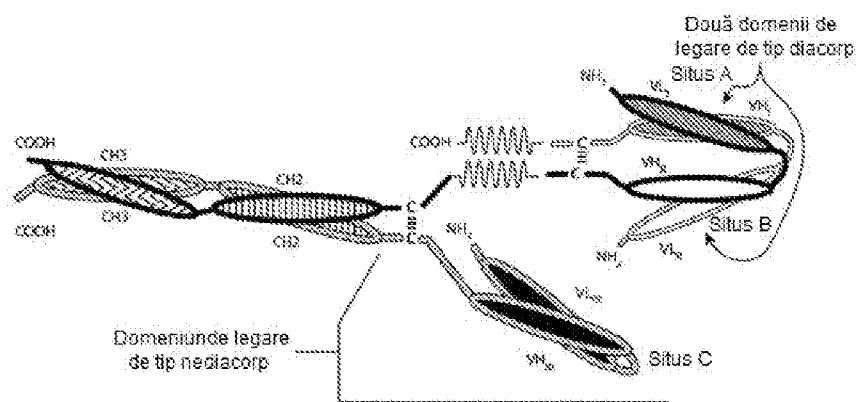


Figura 6D

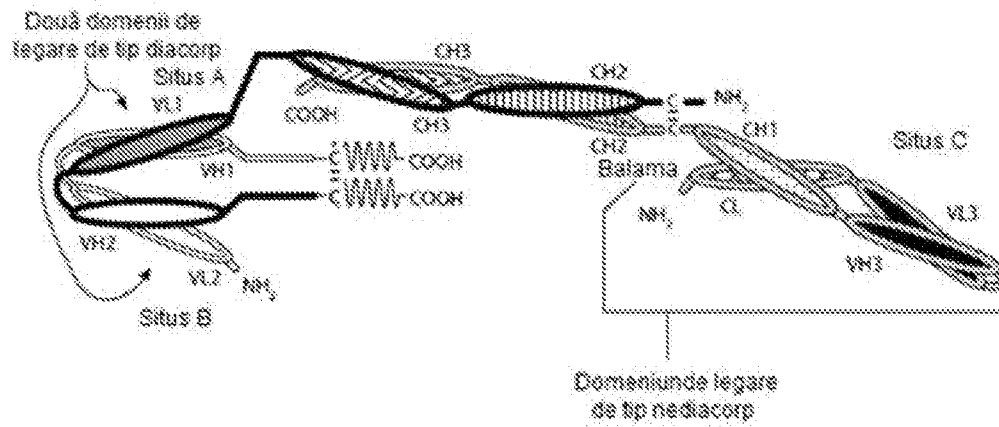


Figura 6E

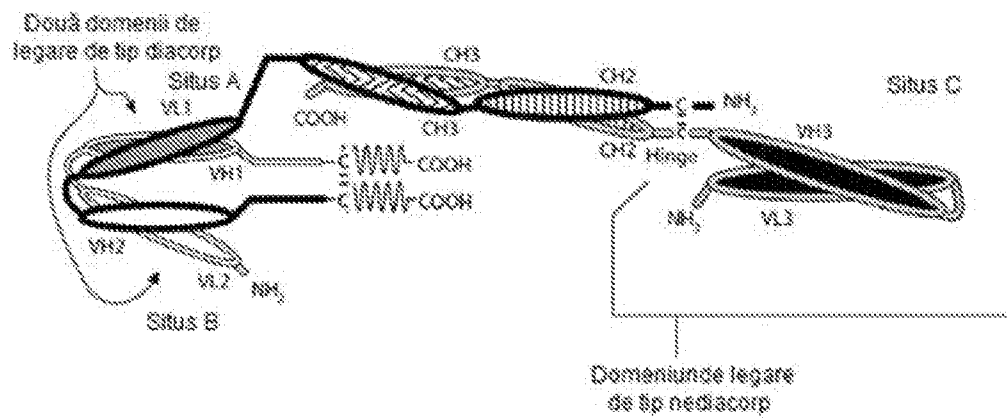


Figura 6F

Detectie de shPD-1 His (1µg/ml) acoperit și M H+L HRP anti G

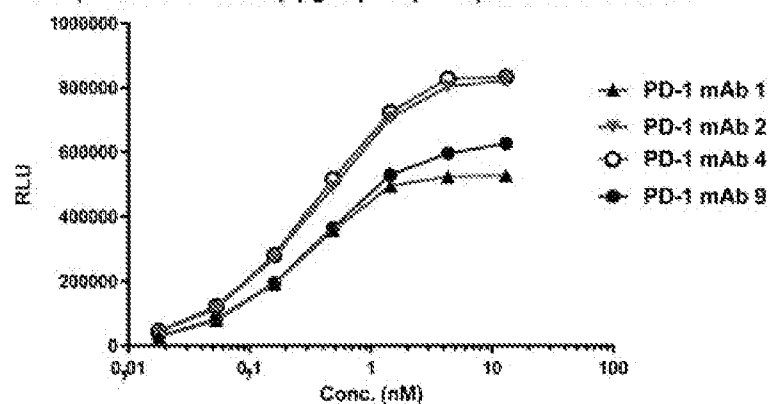


Figura 7A

Detectie de shPD-1 His (0,5µg/ml) acoperit și M H+L HRP anti G

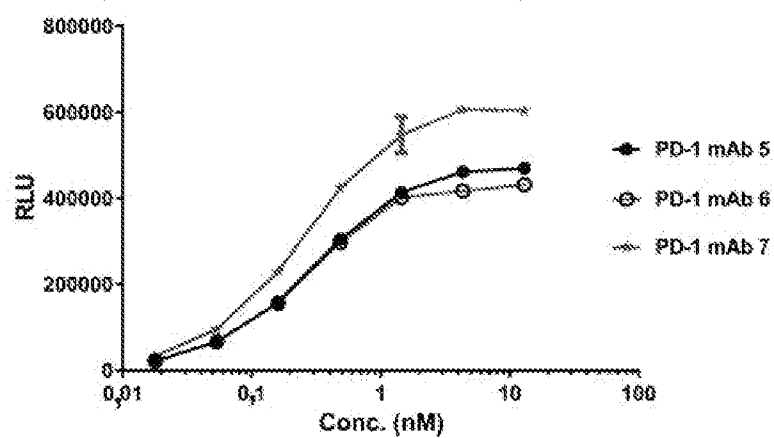


Figura 7B

Detectia shPD-1 His (0,5µg/ml) acoperit și mlgG (H+L) anti G

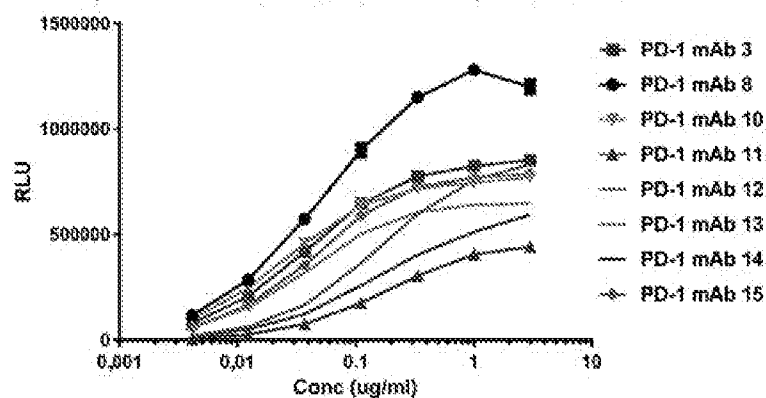


Figura 7C

Detectia shPD-1 hFc (0,5µg/ml) acoperit și mlgG (H+L) anti G

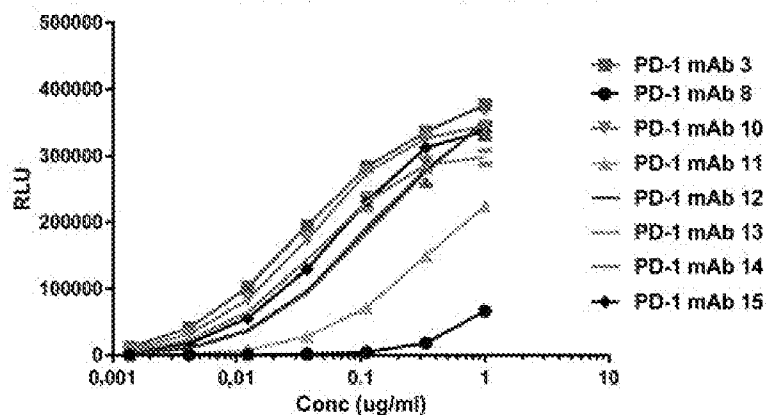


Figura 7D

Detecția de scyno-PD-1-TEV-Fc (0,5 $\mu$ g/ml) acoperit și G anti M H+L HRP

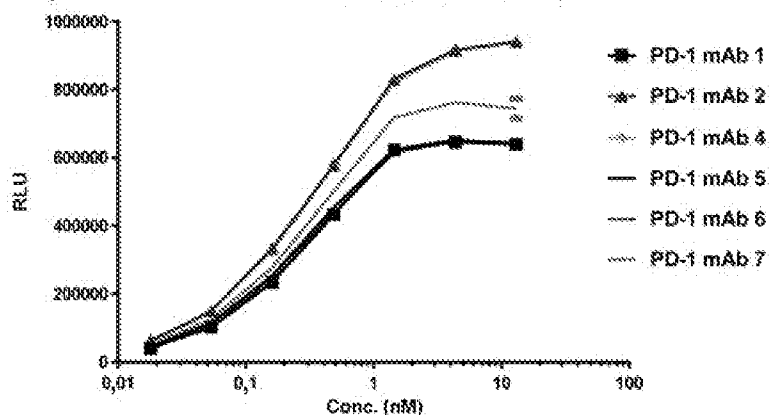


Figura 8A

Detecția de scyno-PD-1-TEV-hFc(1 $\mu$ g/ml) acoperit și G anti M (H+L)

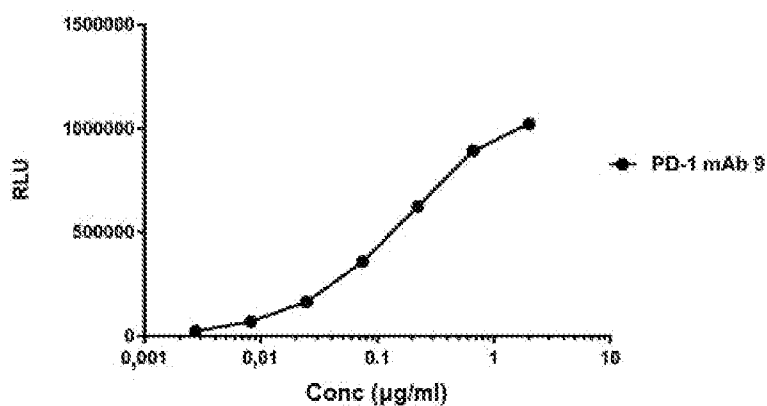


Figura 8B

Detecția de scyno-PD-1-TEV-Fc (1 $\mu$ g/ml) acoperit și G anti mlgG (H+L)

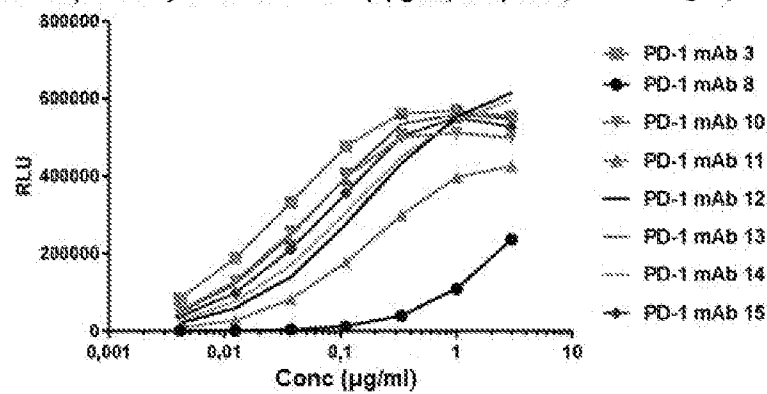


Figura 8C

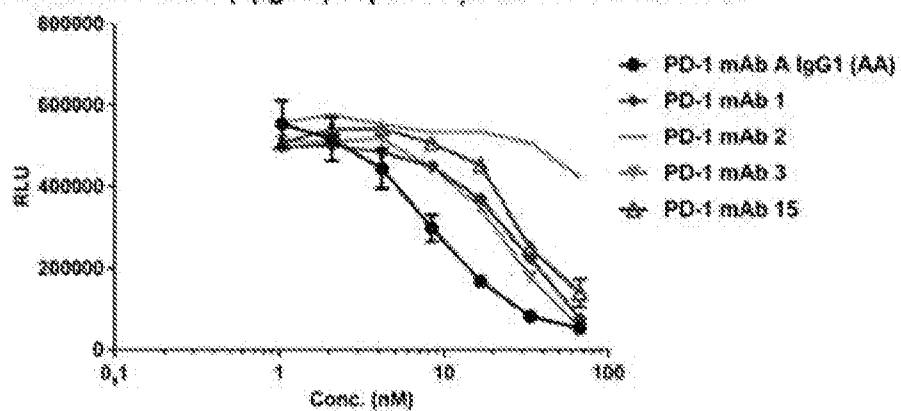
PD-L1 Fc-biotină (1 $\mu$ g/ml) capturat și shPD-1 His detectat

Figura 9A

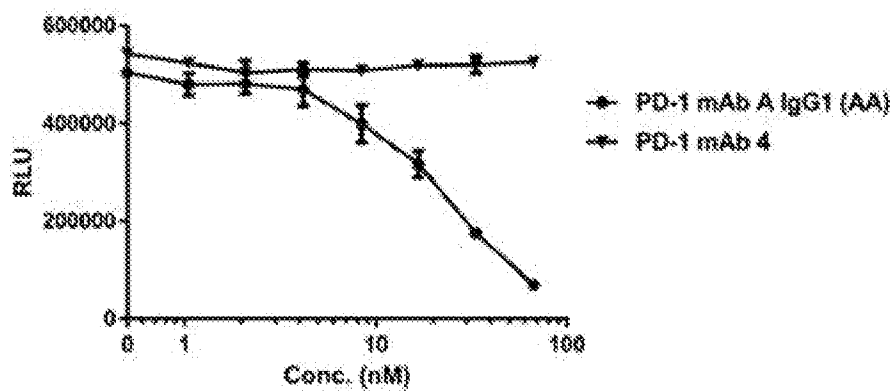
PD-L1 Fc-biotină (1 $\mu$ g/ml) capturat și shPD-1 His detectat

Figura 9B

PD-L1 Fc-biotină (1µg/ml) capturat și shPD-1 His detectat

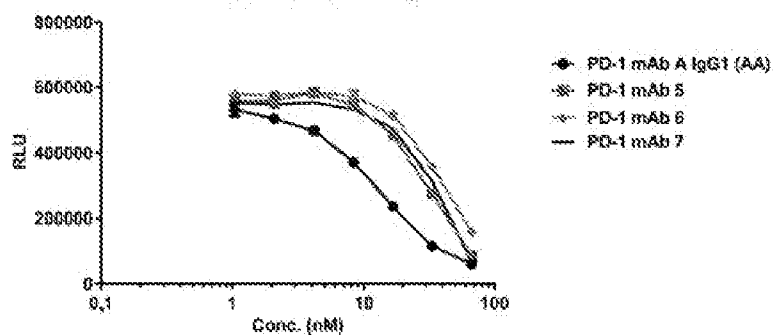


Figura 9C

PD-L1 Fc-biotină (1µg/ml) capturat și shPD-1 His detectat

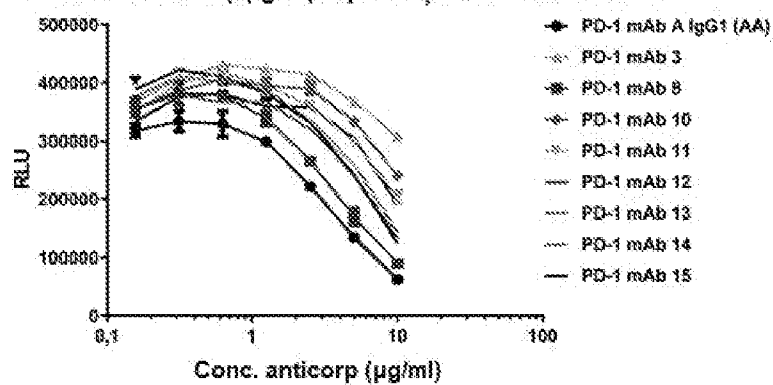


Figura 9D

## Țesuturi normale

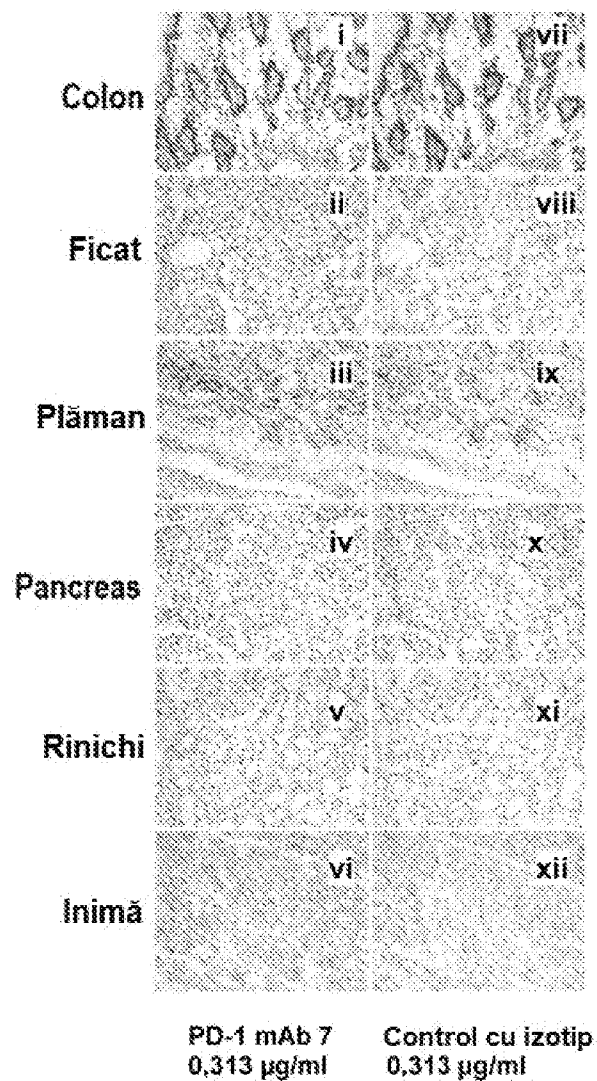
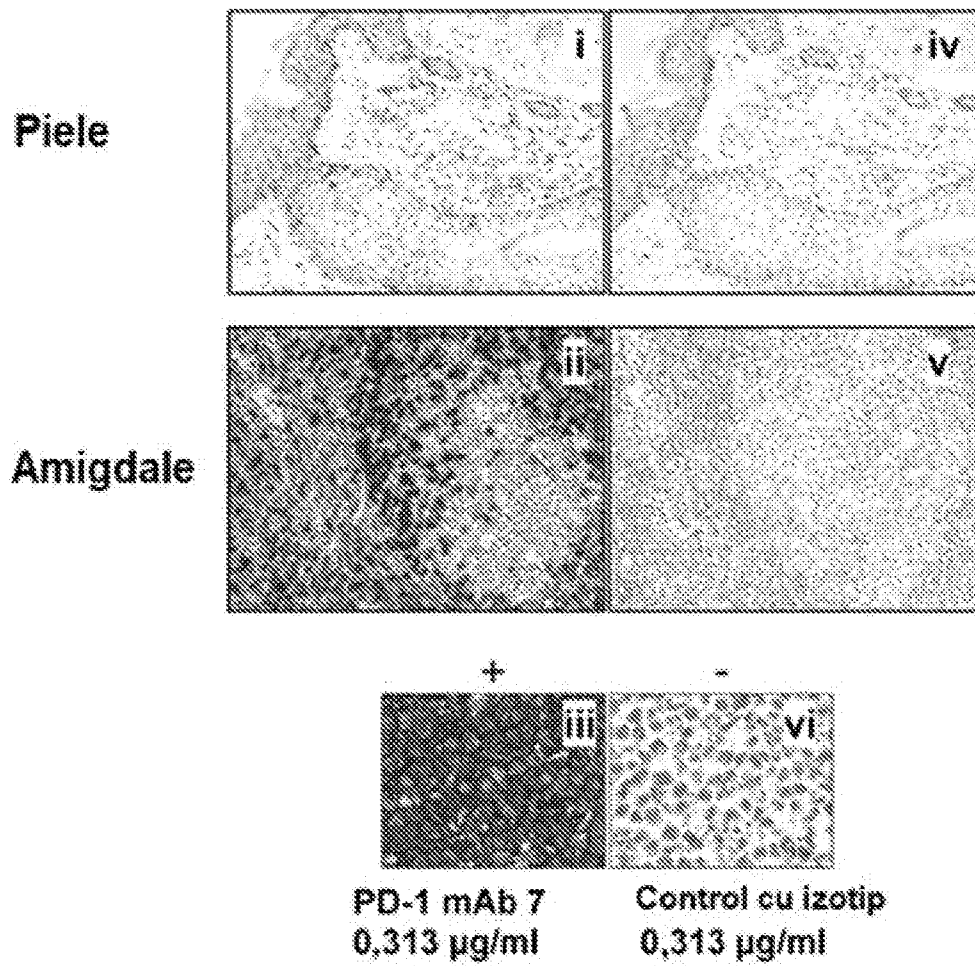
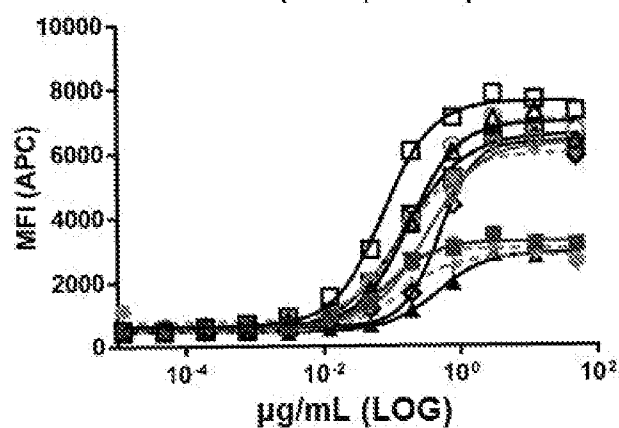


Figura 10A

**Figura 10B**

### Curbe de saturație (diluție 1:4)



- ◆ hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
- hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
- hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
- ◆ hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
- ▲ hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
- ★ hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
- ▽ hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
- PD-1 mAb A IgG1 (AA)
- ◆ PD-1 mAb A IgG4 (P)
- ◆ PD-1 mAb B IgG1 (AA)
- ◆ PD-1 mAb B IgG4 (P)

**Figura 11**

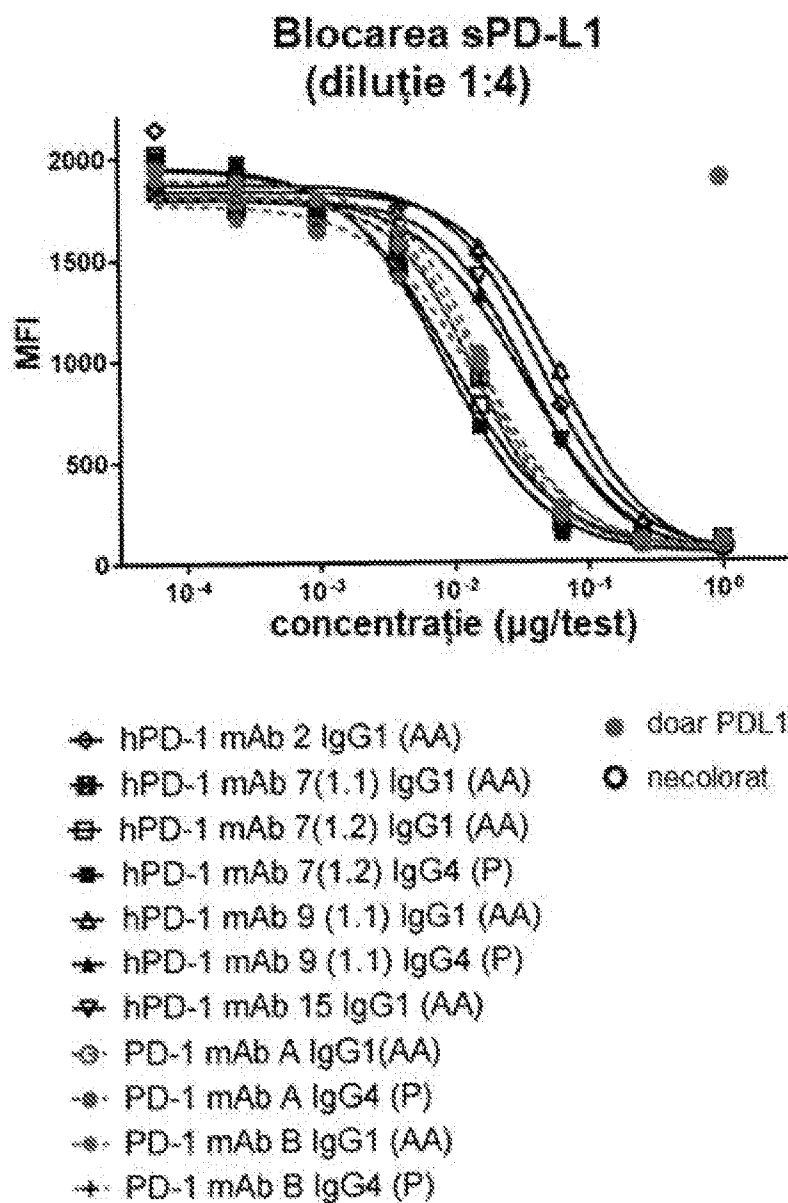
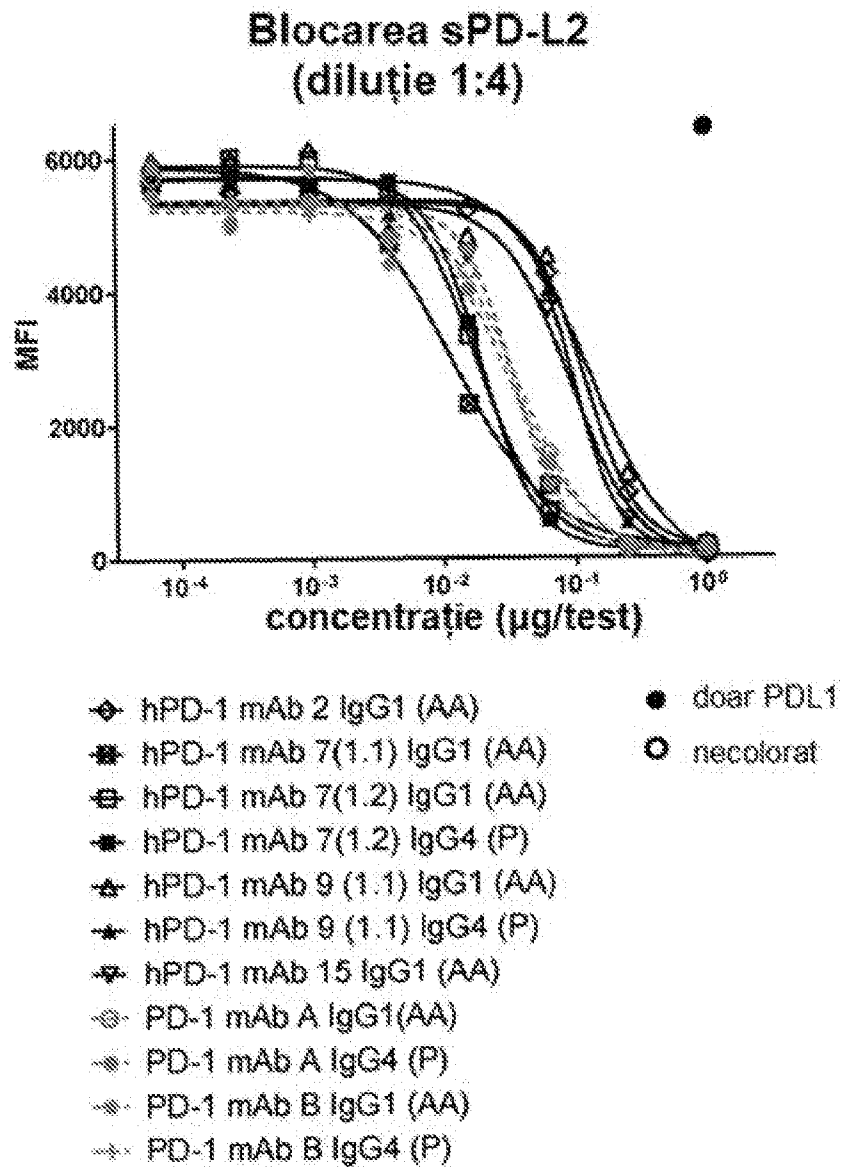
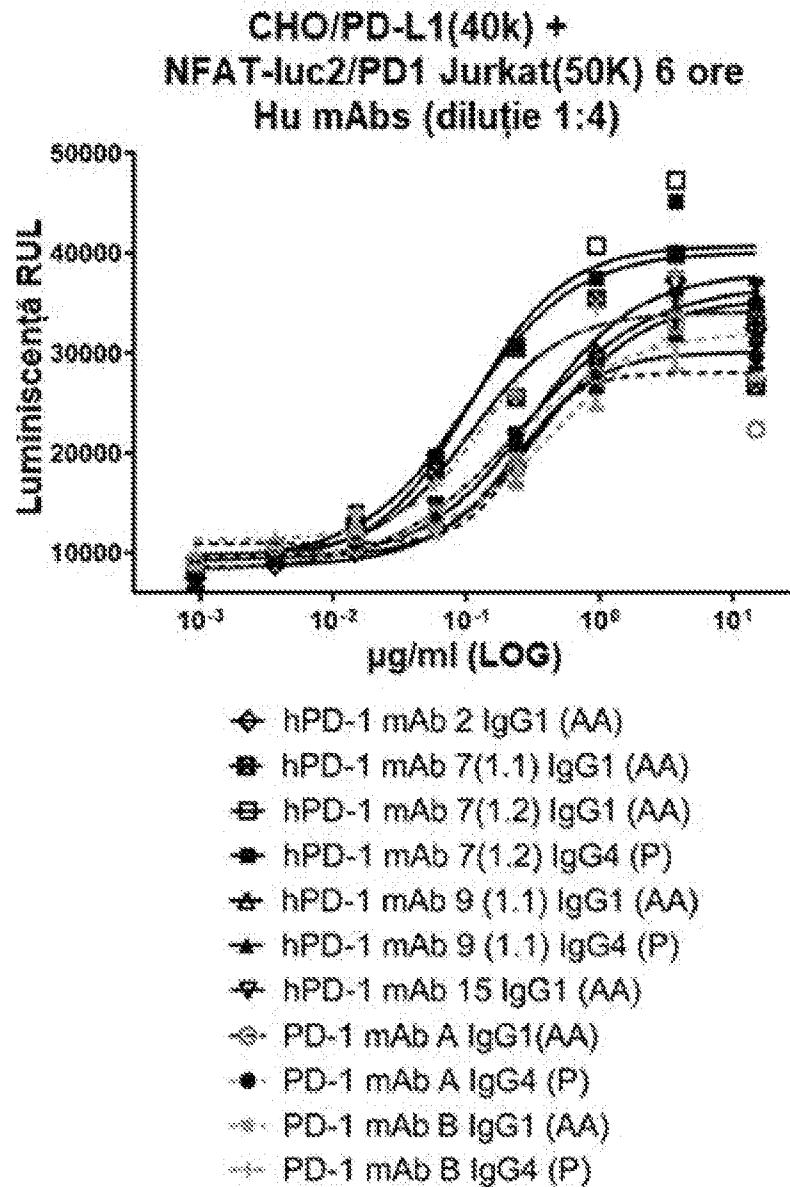


Figura 12A

**Figura 12B**

**Figura 13**

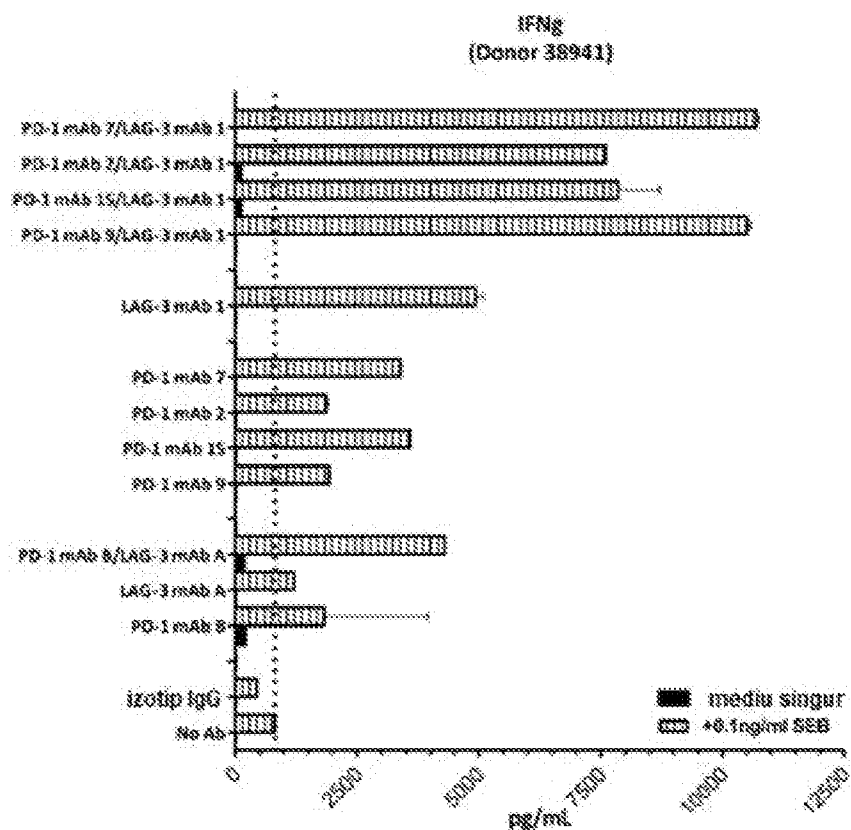


Figura 14

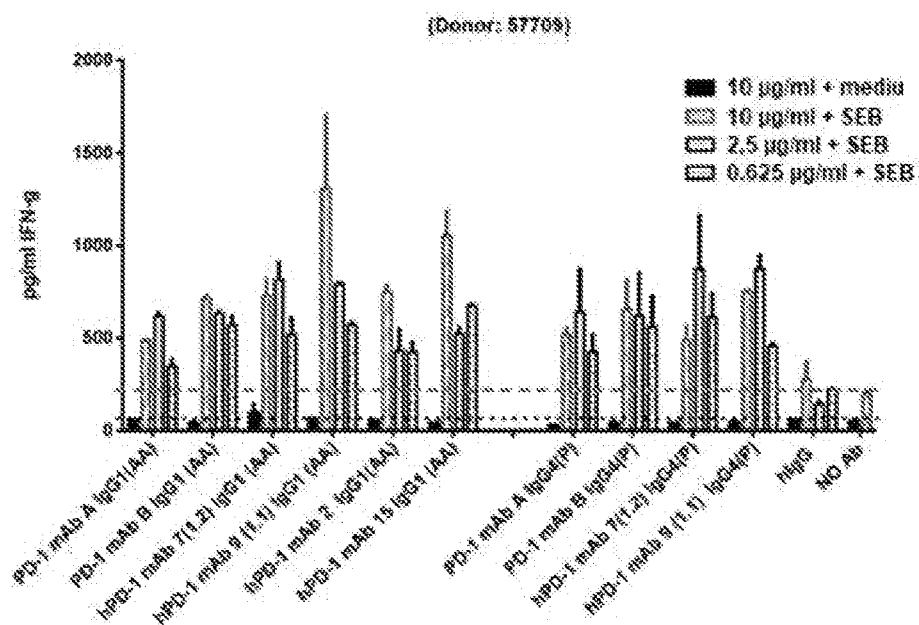


Figura 15A

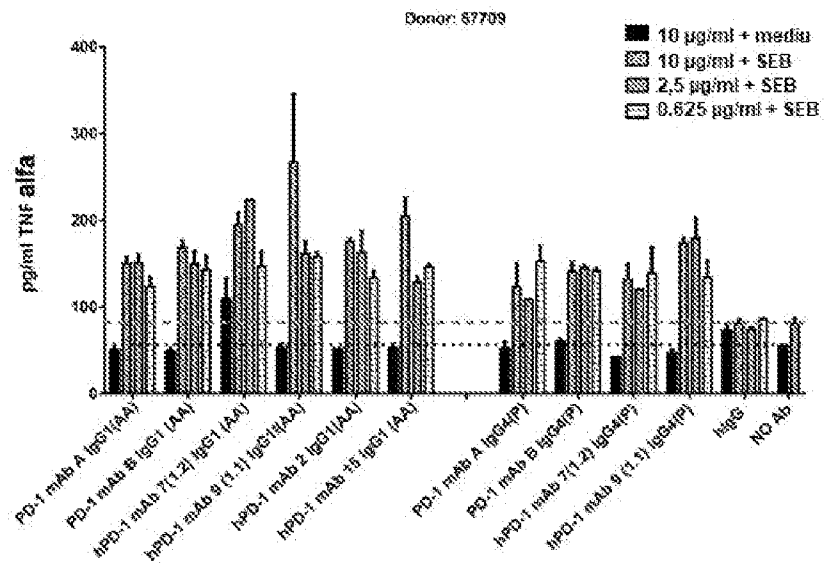


Figura 15B

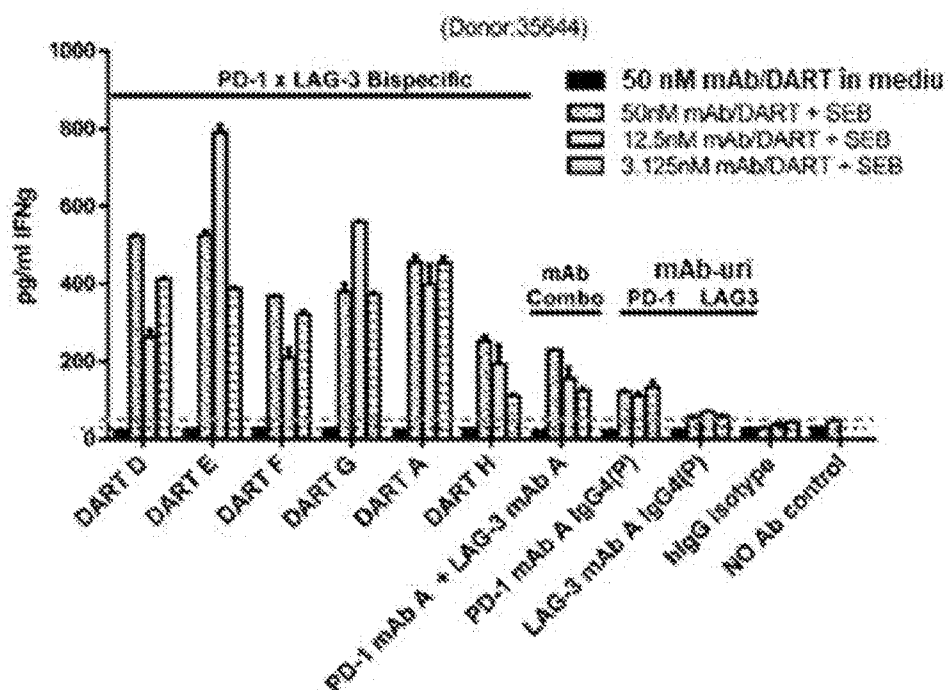


Figura 16A

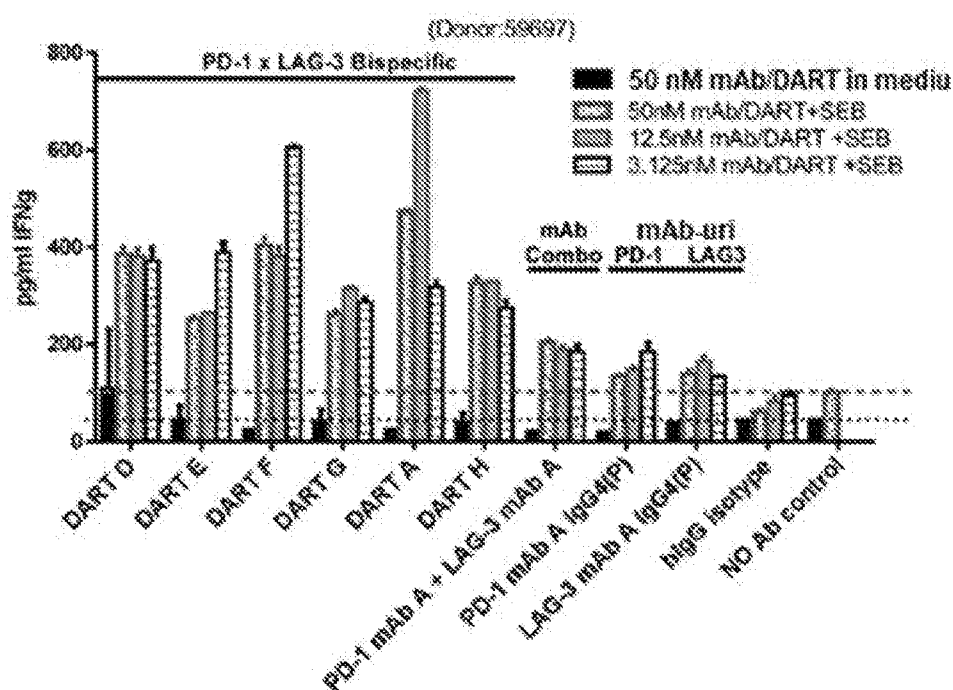


Figura 16B

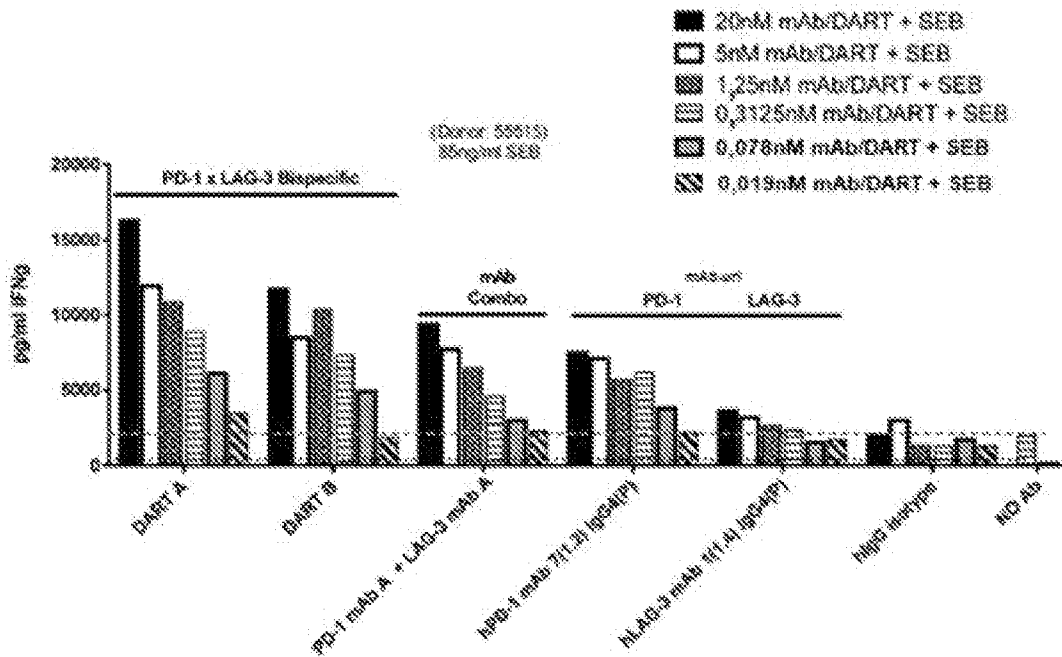


Figura 17A

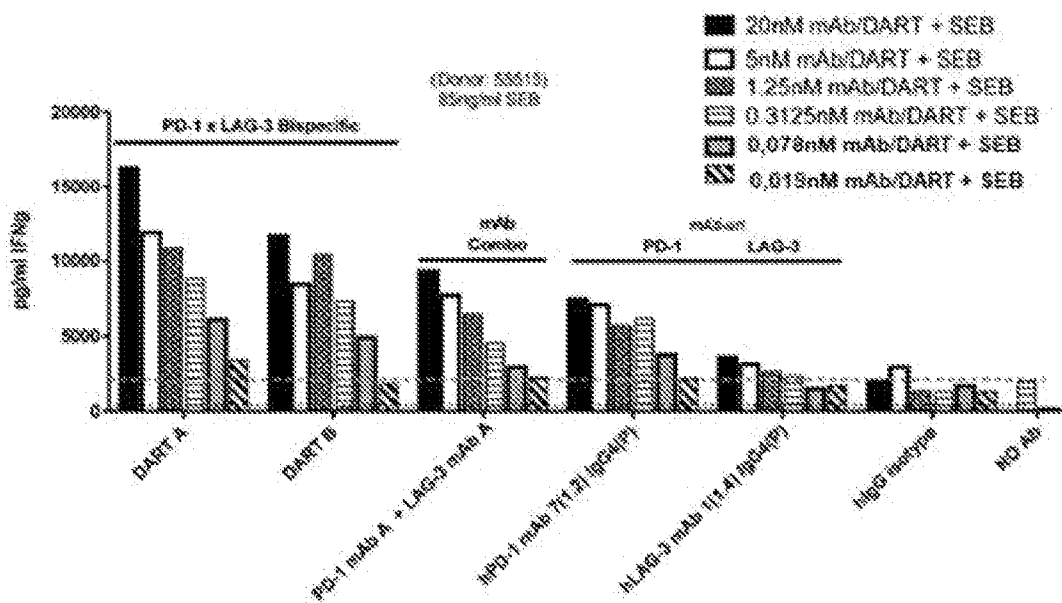


Figura 17B

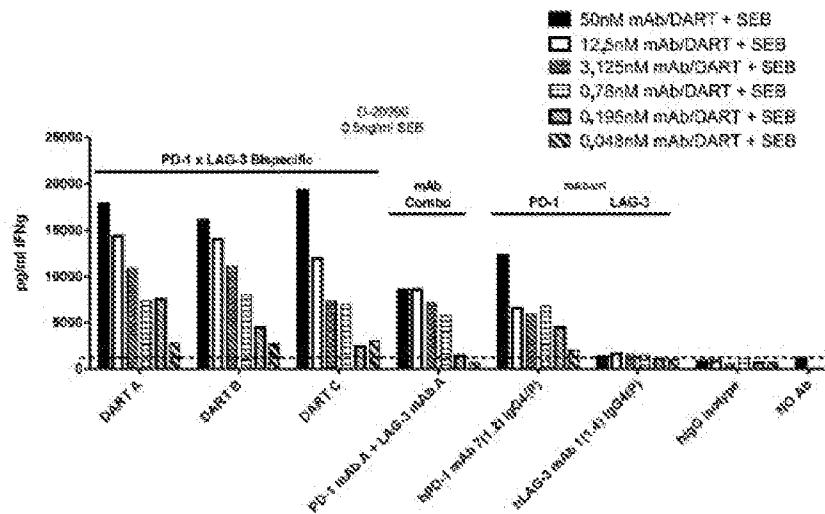


Figura 18 A

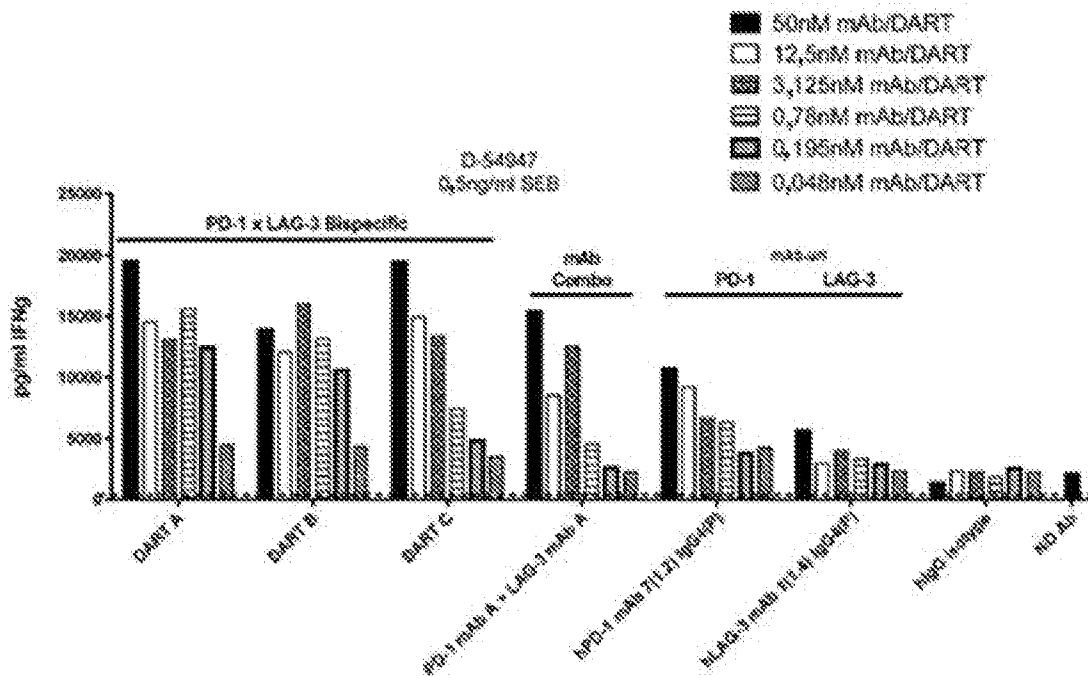


Figura 18 B

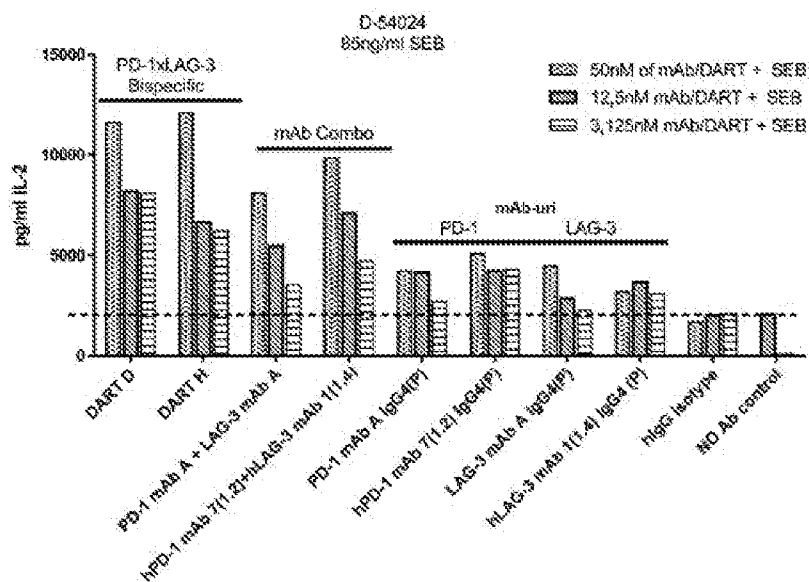


Figura 19

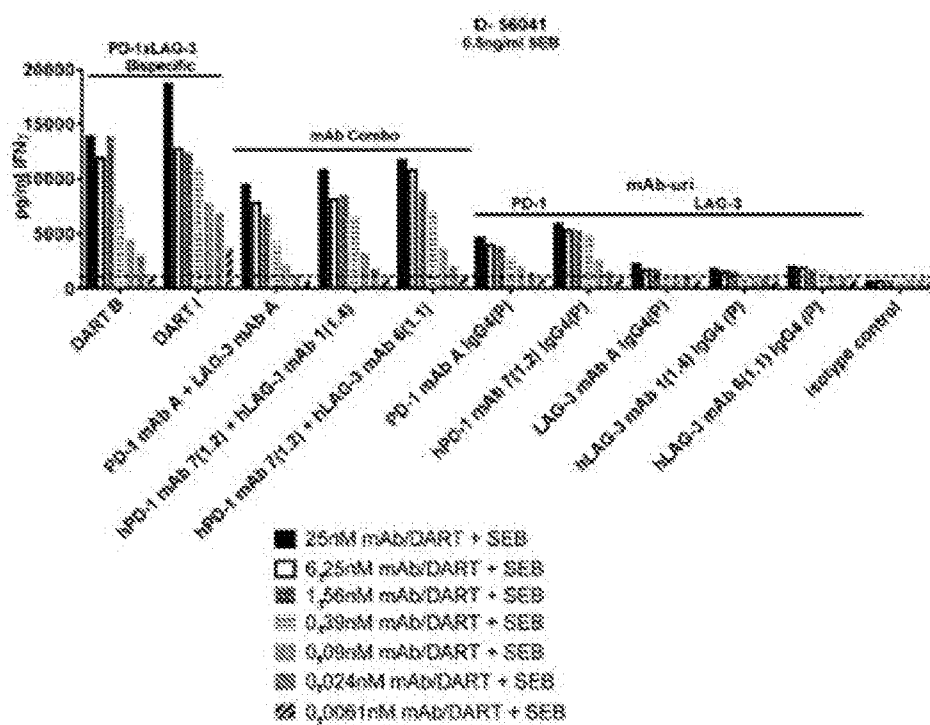


Figura 20

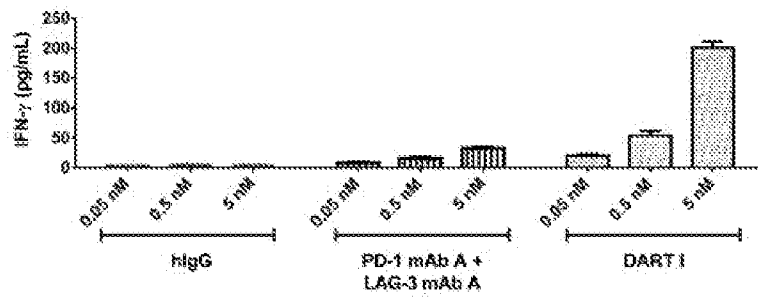


Figura 21A

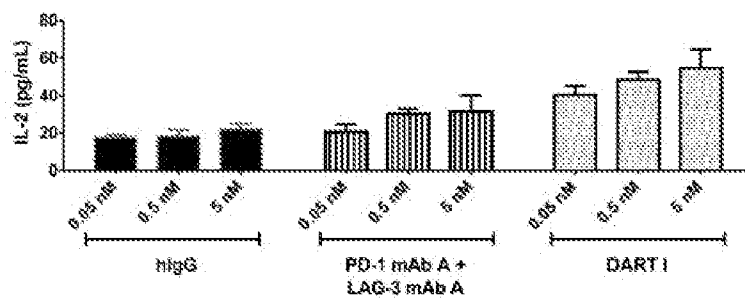


Figura 21B

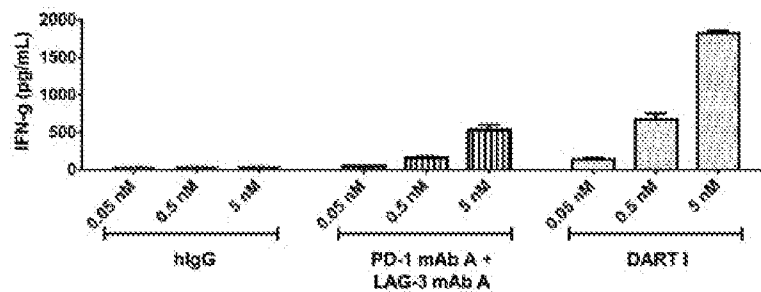


Figura 21C

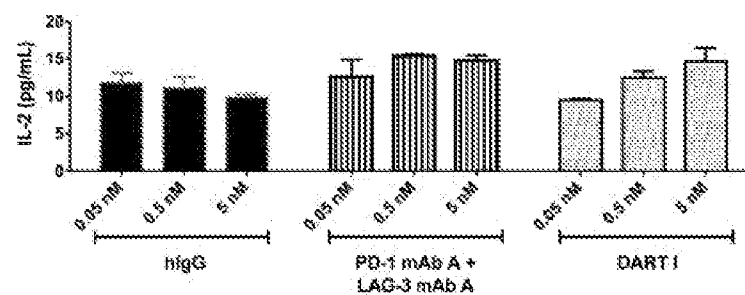


Figura 21D

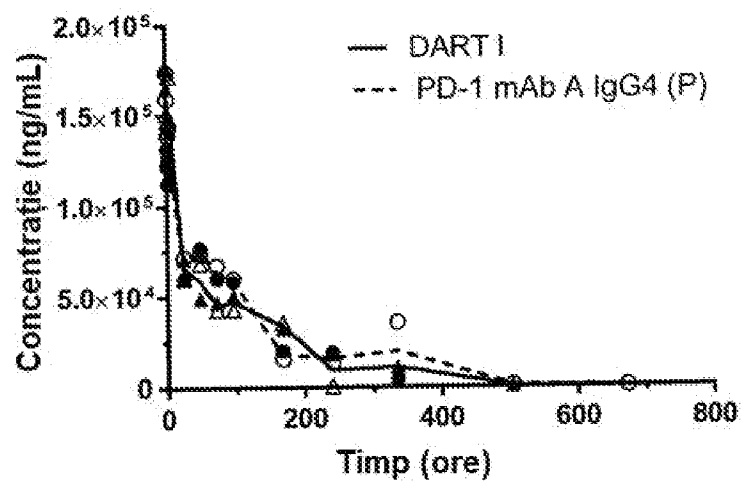


Figura 22

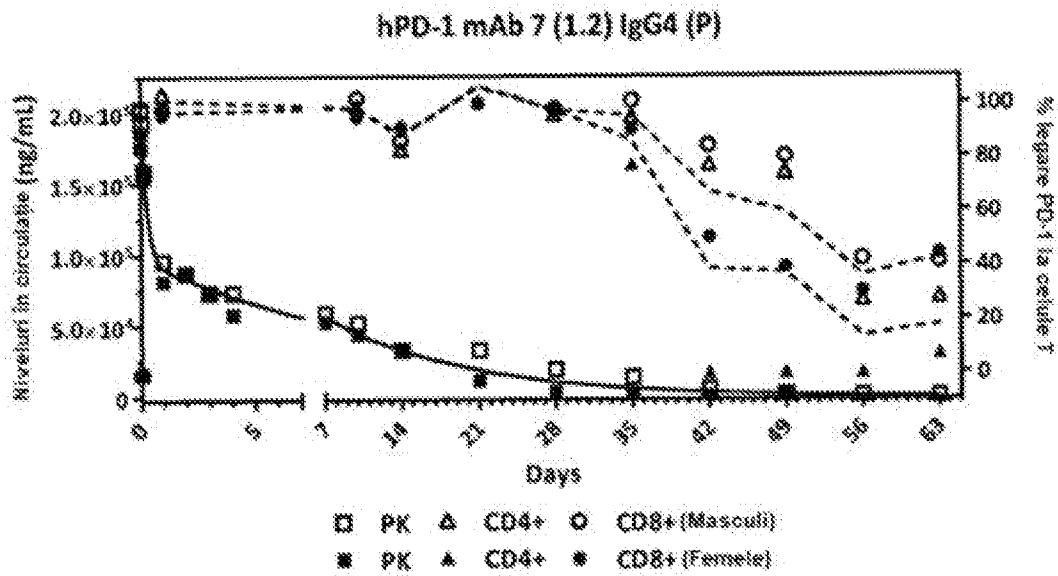


Figura 23A

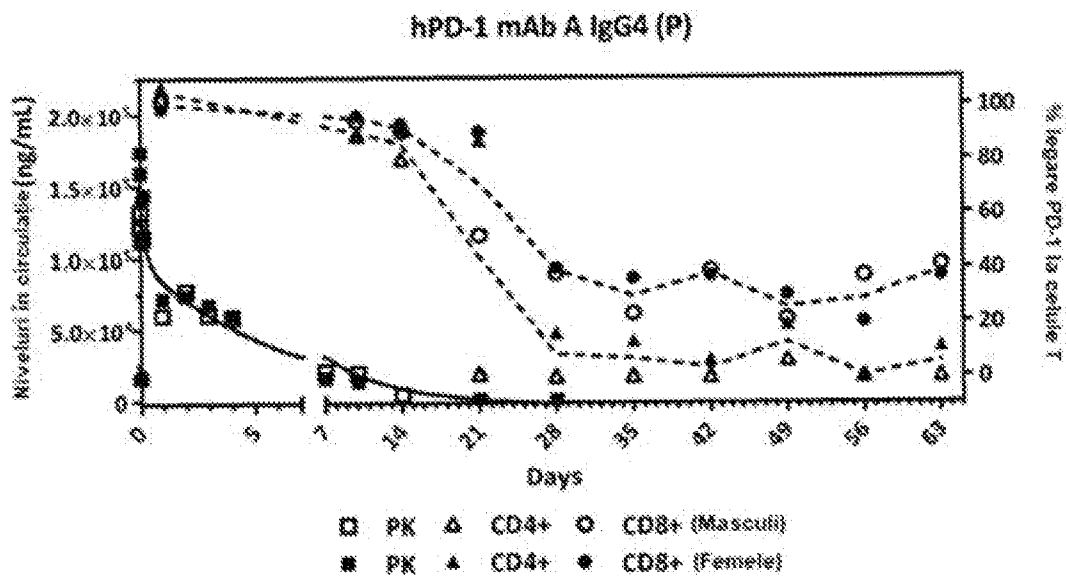


Figura 23B

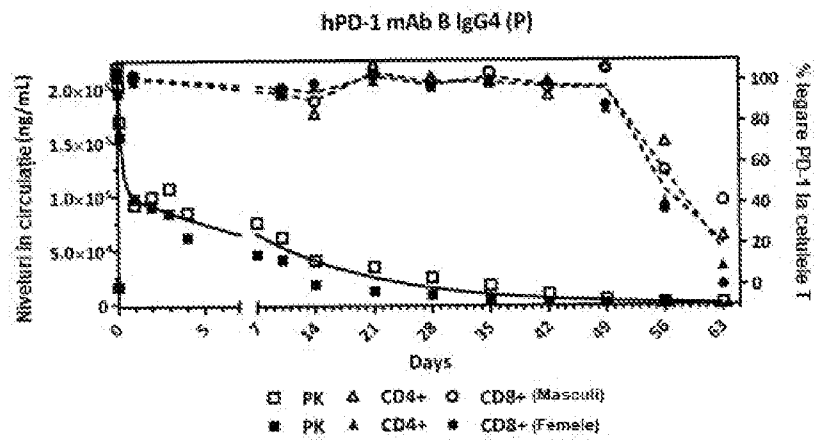


Figura 23C