

Referință încrucișată la aplicații înrudite

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

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

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 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 imunoconjugați, 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 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 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 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 ucigașe natural (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 Molecules”, *Immunolog. 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 celulelor care prezintă antigen (**APC**) trebuie să fie prezentat unei celule T CD4⁺ 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 pentru a determina natura, mărimea și durata răspunsului.

Sistemul imunitar este strâns 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 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+ (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“, *Immunol. 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“, *Immunol. 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 înrudite („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, plămânu, 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), sincyciotrophoblasts (Petroff, M.G. și colab. (2002) „B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface“, Placenta

23:S95-S101). Moleculile sunt de asemenea exprimate prin macrofagele rezidente dintr-unele țesuturi, de macrofagele care au fost activate cu interferon (IFN)- γ sau factor de necroză tumorală (TNF)- α (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 Verse 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⁺ 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 biomoleculi 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 coinhibitoare exprimate de celulele tumorale, celulele imune, și celulele stromale în mediul 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 un anticorp monoclonal monospecific anti-uman 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 anticorpus anti-uman de legare la PD-1 a invenției și un purtător acceptabil farmaceutic. Invenția este direcționată de asemenea spre anticorpus monoclonal monospecific anti-uman 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 cancer sau o infecție. Invenția este direcționată de asemenea către anticorpus monoclonal monospecific de legare la PD-1 anti-uman în tratamentul unei boli sau afecțiuni asociate cu un sistem imunitar suprimat, în care boala sau afecțiunea este cancerul sau o infecție. Invenția este direcționată de asemenea către anticorpus monoclonal monospecific de legare la PD-1 anti-uman sau compoziția invenției, pentru utilizare în tratamentul cancerului sau al unei infecții. Invenția este direcționată de asemenea către anticorpus monoclonal monospecific de legare la PD-1 anti-uman sau compoziția invenției, în detecția *in vitro* a PD-1, în care anticorpus este marcat 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_{H1}, CDR_{H2} și CDR_{H3} și cele trei domenii CDR ale lanțului ușor, CDR_{L1}, CDR_{L2}, și CDR_{L3}, în care:

(A)

(1) domeniul CDR_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și doemniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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

(K)

(1) domeniul CDR_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H35 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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_H1, domeniul CDR_H2, și domeniul CDR_H3 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_L1, domeniul CDR_L2, și domeniul CDR_L3 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 implicată 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_{H1}, domeniul CDR_{H2}, și domeniul CDR_{H3} 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_{L1}, domeniul CDR_{L2}, și domeniul CDR_{L3} 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_{H1}, domeniul CDR_{H2}, și domeniul CDR_{H3} 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_{L1}, domeniul CDR_{L2}, și domeniul CDR_{L3} 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_{H1}, domeniul CDR_{H2}, și domeniul CDR_{H3} 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_{L1}, domeniul CDR_{L2}, și domeniul CDR_{L3} 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_{H1}, domeniul CDR_{H2}, și domeniul CDR_{H3} 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_{L1}, domeniul CDR_{L2}, și domeniul CDR_{L3} 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 tumoare de glandă suprarenală, un cancer asociat cu SIDA, un sarcom alveolar parțial moale, o tumoare astrocitică, cancer la vezică, cancer osos, un cancer la creier și la măduva spinării, o tumoare cerebrală metastatică, un cancer la sân, o tumoare corporală carotidică, 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 cutanos, o tumoare desmoplazică cu celule mici rotunde, un endimom, o tumoare Ewing, un condrosarcom mixoid extraskeletal, 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 tumoare celulară germinală, un cancer la cap și gât, carcinom hepatocelular, o tumoare celulară insulară, un sarcom Kaposi, un cancer la rinichi, o leucemie, o tumoare lipomatoasă lipom/benignă, o tumoare 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 tumoare neuroendocrină, un cancer ovarian, un cancer pancreatic, un carcinom tiroidian papilar, o tumoare paratiroidă, un cancer pediatric, o tumoare a tecii nervului periferic, o feocromocitomă, o tumoare pituitară, un cancer la prostată, un melanom uveal posterior, o tulburare hematologică rară, un cancer metastatic renal, o tumoare 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 anticorpilor 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 anticorpilor 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 izotopului 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 referențiați (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 γ 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 γ (**Figura 15A**) și TNF α (**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 γ 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 γ 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 γ 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 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 γ ale PBMC de la un donator reprezentativ, stimulate cu o concentrație medie de SEB (0,5 ng/mL) tratate cu diacorpi bispecifici 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 γ (**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 μ 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 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 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 (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 bispecifici, 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 implicată 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

Anticorpul 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 multispecifici, 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 oricăror din cei de mai sus. În particular, anticorpul include molecule de imunoglobulină și fragmente active imunologic 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*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ și IgA₂) sau subclasă. În plus față de utilizările lor cunoscute în diagnostic, s-a dovedit că anticorpul sunt utili ca agenți terapeutici. Anticorpul sunt capabili de legare imunospecifică 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 anticorpul 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. Anticorpul 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')₂ 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, anticorpul monoclonali sunt dezvoltați la șoareci, șobolani sau iepuri. Anticorpul 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 imunospecifici 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 buclilor 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_{L1}**, **domeniul CDR_{L2}**, și **domeniul CDR_{L3}**. 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_{H1}**, **domeniul CDR_{H2}**, și **domeniul CDR_{H3}**. Astfel, termenii domeniul CDR_{L1}, domeniul CDR_{L2}, domeniul CDR_{L3}, domeniul CDR_{H1}, domeniul

CDR_{H2}, și domeniul CDR_{H3} 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')₂, *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 punte aproximativ 3,5 nm între terminalul carboxi al unui domeniu variabil și terminalul amino al celuilalt domeniu variabil. Au fost concepuți și utilizați și 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 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/tehnici 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 anticorpul 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 șoarece care conține toate cele șase regiuni CDR de la anticorpul de șoarece). 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 anticorpul 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 anticorpului 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 anticorpului anti-uman de rozător, care limitează durata și eficacitatea aplicațiilor terapeutice ale acelor radicali la destinarii umani. Alte metode de umanizarea anticorpilor 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 Fc γ (Fc γ R-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 (**Fc γ R-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 NVFSCSVMHE

      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 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 YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

 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 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 YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

 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 LPPSQEEMTK 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_{H1} 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-tranlațional. 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, FcγRIIA, 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 în aval (*de exemplu*, PI₃K). 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 inhibitoare de FcγR. Recent, a fost stabilită baza moleculară a acestei inhibării. 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⁺⁺ 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 bispecifici, diacorpi multispecifici 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 monospecifici), 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 multispecifici 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 domeniul 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“, 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; 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 punte aproximativ 3,5 nm între terminalul carboxi al unui domeniu variabil și terminalul amino al celuilalt 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-ligare 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 receptorii pe suprafața diferitelor celule sau pe o singură celulă. Co-ligare 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 natural (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-monospecifici necesită asamblarea cu succes a două sau mai multe polipeptide distincte și diferite (*adică*, o astfel de formare necesită ca diacorpii să fie formați prin heterodimerizarea diferitelor specii de catene polipeptidice). Acest fapt este în contrast cu diacorpii monospecifici, 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 diacorpii bispecifici 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-monospecifici 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 Fcγ3 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; 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). 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 cincelea 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 VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
ENGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPP RPAGQFQTLV VGVVGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS 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);
- (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.

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 TNF- α , IFN- γ). Abilitatea unei molecule de a stimula un răspuns specific la antigen al celulei T poate fi determinată, de exemplu, utilizând 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**“, „**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_H-urile domeniului VH și/sau 1, 2 sau toate 3 dintre CDR_L-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 bispecifici (sau multispecifici), anticorpi himerici sau umanizați, BiTe-uri, diacorpi, *etc.* și astfel de molecule de legare având variante de regiuni Fc.

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

(A)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 1;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 1;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 1 și cele trei CDR_L-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;
- (6) domeniile VH și VL ale hPD-1 mAb 1;

(B)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 2;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 2;
- (3) cele trei CDR_H-uriale domeniului VH al PD-1 mAb 2 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 2;
- (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)

(1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 3;

(2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 3;

(3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 3 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 3;

(D)

(1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 4;

(2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 4;

(3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 4 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 4;

(E)

(1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 5;

(2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 5;

(3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 5 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 5;

(F)

(1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 6;

(2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 6;

(3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 6 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 6;

(G)

(1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 7;

(2) cele trei CDR_L-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_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 7 și cele trei CDR_L-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;

(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_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 8;

(2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 8;

(3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 8 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 8;

(I)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VH2;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VL2;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 9, sau hPD-1 mAb 9 VH2 și cele trei CDR_L-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;
- (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_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 10;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 10;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 10 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 10;

(K)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 11;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 11;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 11 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 11;

(L)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 12;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 12;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 12 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 12;

(M)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 13;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 13;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 13 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 13;

(N)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 14;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 14;
- (3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 14 și cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 14;

(O)

- (1) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 15;
- (2) cele trei CDR_L-uri ale domeniului VL al PD-1 mAb 15;

(3) cele trei CDR_H-uri ale domeniului VH al PD-1 mAb 15 și cele trei CDR_L-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

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_H sunt prezentate subliniat).

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT NDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG
HITYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCARDY
GSGYPYTLDY WGQGTSVTVS S

CDR_{H1} of PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:71**): NDYAWN

CDR_{H2} of PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:72**): HITYSGSTSYNPSLKS

CDR_{H3} of PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:73**): DYSGYPYTLDY

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 1 este **SEQ ID NO:70** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

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

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:74**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

QIVLTQSPAL MSASPGKVT MTCSATSIVS YVYWYQQKPG SSPQPWIYLT
SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SDNPYTTFGGG
TKLEIK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:76):	SATSIVSYVY
CDR _{L2} a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:77):	LTSNLAS
CDR _{L3} a PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:78):	QQWSDNPYT

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 1 este **SEQ ID NO:75** (nucleotidele care codifică resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga
 gaaggtcacc atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact
 ggtaccagca gaagcctgga tctctcccc aacctggat ttatctcaca
tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg
 gacctcttac tctctcaca tccagcagcat ggaggctgaa gatgctgcca
 cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg
 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 împerecheate cu domeniul VH umanizat este cel la care se face referire ca „hPD-1 mAb 1“.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 1 VH1 (**SEQ ID NO:79**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

DVQLQESGPG LVKPSQTLISL TCTVSGFSIS NDYAWNWIRQ PPGKGLEWIG
HITYSGSTSY NPSLKSRLLTI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCARDY
GSGYPTLDY WGQGTTVTIS S

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 1 VH1 este **SEQ ID NO:80** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac
 actgagcctg acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg
cctggaattg gattagcag cctcccggta aagggtgga gtggatcggc
cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatcccagtc tgaagagccg
 tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt ctgaccatga
 ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tccaggattat
ggttctgggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt
 gaccgtgagc tcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 1 VL1 (**SEQ ID NO:81**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H 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_H sunt prezentate subliniat):

gaaatcgttc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga
 aaaggtcacc attacktgt ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact
 ggtatcagca gaagcccggc caggctccc agccattgat atatctgacc
agcaacctgg cttctggat cccagctcgt ttttccggta gcgggtccgg
 gactgatttc actttgacta tccagctctct ggaggcagaa gacgccgcca
 cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc
 accaaagctcg aaataaag

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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:85):	SFGMH
CDR _{H2} a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:86):	YISSGMSISYADTVKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:87):	LSDYFDY

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 2 este **SEQ ID NO:84** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc
 ccggaaactc tctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac
atcagtagtg gcagtatgag catttctat gcagacacag tgaagggccg
 attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga
 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 2 (**SEQ ID NO:88**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

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

CDR _{L1} a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:90):	RSSQSLVHSTGNTYLH
CDR _{L2} a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:91):	RVSNRFS
CDR _{L3} a PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO:92):	SQTHVPWT

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

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgectgtca gtcttggaga
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca ggccttgtt cacagtactg
gaaacaccta tttacattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacagggt
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtgg
 aggtgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg
tgagcttcg 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 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“. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând domeniile VL umanizate împerecheate 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_H sunt prezentate subliniat):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALYYCASLS
DYFDYWGQGT TTVVSS

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 2 VH1 este **SEQ ID NO:94** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag
tctgcggttg tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga
tgcaattgggt ggcaccaggct cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac
atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaaggcag
gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac ctgcaaatga
atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc tcccctgtct
gattacttcg actactggggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc

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

DVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
LLIYRVSNRF 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_H sunt prezentate subliniat):

gacgttgatga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca
gccagccagt atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag
gaaatacata tctccattgg tacctgcaaa aaccagggca gagccccag
ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt tctggcgtgc cagatcggtt
cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc tctaggggtgg
aggcagagga cgtagggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc
tggacttttg gccaaggtac 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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _H 1 a PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:99):	DYVMH
CDR _H 2 a PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:100):	TIDPETGGTAYNQKFKG
CDR _H 3 a PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:101):	EKITTIVEGTYWYFDV

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

caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc
 agtgacgctg tctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa
tgacttggtt gaagcagaca cctgtgcatg gcttggaaatg gattggaact
attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa
 ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagaggagaag
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac
 aggaccacg gtcaccgtct cctca

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

DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRRSSQNIV HSNGDTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHLP
YTFGGGTKLE IK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:104):	RSSQNIVHSNGDTYLE
CDR _{L2} a PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:105):	KVSNRFS
CDR _{L3} a PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO:106):	FQGSHPYT

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

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg
gagacaccta tttggaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct ataaagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacaggtt
 cagtggcagt gggtcagggga cagattttac actcaaaatc agcagagtgg
 aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc 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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:109):	SFGMH
CDR _{H2} a PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:110):	YISSGMSISYADTVKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:111):	LTDYFDY

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

gatgtgcagc tegtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc
 ccgaaactc tctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa
tgcactgggt tegttaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat
attagtagtg gcagtatgag tatttcctat gcagacacag tgaagggccg
 attcacgctc accagagaca atgccaagaa cacctgttc ctgcaaatga
 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca

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

DVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRRSSQSLV HSTGNTYFHW YLQKPGQSPK
 LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTHVP
WTFGGGTKLE IK

CDR _L 1 a PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:114):	RSSQSLVHSTGNTYFH
CDR _L 2 a PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:115):	RVSNRFS
CDR _L 3 a PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO:116):	SQTHVPWT

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 4 este **SEQ ID NO:113** (nucleotidele care codifică resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

gatgttgta tgtcccaaac tccactctcc ctgctgtca gtcttgagga
 tcaagcctcc atctctctgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg
gaaacaccta tttccattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacaggtt
 cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
 aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

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

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

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

CDR _H 1 a PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:119):	AYWMN
CDR _H 2 a PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:120):	VIHPDSETWLNQKFKD
CDR _H 3 a PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:121):	EHYGSSPFAY

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 5 este **SEQ ID NO:118** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

caggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc
 agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta ctcttcacc gcctactgga
tgaacttgat gaaacagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg
attcatcctt ccgatagtga aacttggta aatcagaagt tcaagggacaa
 ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactca
 tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggagcac
tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
 ctctgca

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

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

CDR _L 1 a PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:124):	RANESVDNYGMSFMN
CDR _L 2 a PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:125):	AASNQGS
CDR _L 3 a PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO:126):	QQSKEVPYT

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 5 este **SEQ ID NO:123** (nucleotidele care codifică resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gaggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca
tgagttttat gaacttggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg
 aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac
acgttcggag gggggaccaaa gctggaaata aaa

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_H sunt prezentate subliniat).

EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRLEWVAT
ISGGGSDTYYPDSVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSSLRSED TALYYCARQK
ATTWFAYWGQ GTLVTVST

CDR _H 1 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:129):	SYGMS
CDR _H 2 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:130):	TISGGGSDTYYPDSVKG
CDR _H 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_H sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccgggga
 acgtgccact ctcaactgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
tgtccttcat gaacttggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcatccag ccgcctctaa ccgcgatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 cagaggactt tgccgtctat ttctgcagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttggtg gcgggaccaaa ggttgagatc aaa

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO:132**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

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

CDR _L 1 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:134):	RASESVDNYGISFMN
CDR _L 2 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:135):	PASNQGS
CDR _L 3 a PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO:136):	QQSKEVPWT

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 6 este **SEQ ID NO:133** (nucleotidele care codifică resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctctctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca
ttagttttat gaacttggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag
 tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg
 aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg
acgttcggtg gaggcaccaaa gctggaaatc aaa

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

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_H sunt prezentate subliniat).

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGV
IHPDSETWL DQKFKDKATL TVDKSSTTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

CDR _H 1 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:139):	SYWMN
CDR _H 2 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:140):	VIHPDSETWLDQKFKD
CDR _H 3 a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:141):	EHYGTSPFAY

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 7 este **SEQ ID NO:138** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaggccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtgaggc ctggagcttc
 agtgaagctg tctgcaagg cttctggcta ctcttcacc agctactgga
tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg
attcatcctt ccgatagtga aacttggta gatcagaagt tcaaggacaa
 ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca
 tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggagcac
tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
 gtcttcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO:142**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

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

CDR _{L1} a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:144):	RANESVDNYGMSFMN
CDR _{L2} a PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO:145):	AASNQGS
CDR _{L3} 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_L sunt prezentate subliniat):

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gaggccacc atctctctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca
tgagttttat gaacttggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag
 tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg
 aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac
acgttcggag gggggaccaa 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 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 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 împerecheată cu fiecare din domeniile VH umanizate. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul dintre domeniile VL umanizate împerecheată 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 7 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_H sunt prezentate subliniat):

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

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VH1 este **SEQ ID NO:148** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag
 tgtaaggtg tcttgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga
tgaattgggt gcgtaagca ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg gaccagaaat ttaaagatcg
 tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
 ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagaggagcac
tacggcacat caccttttgc atactggggc caggaactc tcgtaaccgt
 atcctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 7 VH2 (**SEQ ID NO:149**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

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

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VH2 este **SEQ ID NO:150** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag
 tgtaaggtg tcttgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga
tgaattgggt gcgtaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg gaccagaaat ttaaagatcg
 tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
 ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagaggagcac
tacggcacat caccttttgc atactggggc caggaactc tcgtaaccgt
 atcctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hPD-1 mAb 7 VL1 (**SEQ ID NO:151**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

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

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL1 este **SEQ ID NO:152** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga
 acgtgccact ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca
tgtccttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcatccag ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttgggtg 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_H sunt prezentate subliniat):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
 LIHAASNOGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY
TFGGGTKVEI K

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 7 VL2 este **SEQ ID NO:154** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccgggtga
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
tgctcttcat gaactgggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcattccag ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttgggtg 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_H sunt prezentate subliniat):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
 LIHAASNRGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS 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_H sunt prezentate subliniat):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccgggtga
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
tgctcttcat gaactgggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcattccag ccgcctctaa ccgaggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

CDR_{L1} 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_{L1} ale PD-1 mAb 7 descrise mai sus.

În plus, CDR_{L2} 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_{L2} ale PD-1 mAb 7 descrise mai sus.

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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:161):	DYYMN
CDR _{H2} a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:162):	DINPKNGDTHYNQKFKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:163):	DFDY

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 8 este **SEQ ID NO:160** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggcttc
 agtgaagata tctgtgaagg cttctggata cacgttcact gactactaca
tgaacttgggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagtg gattggagat
attaatccta aaaatgggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggcga
 ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt
gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO:164**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DVVMTQTPLS LPVGLGDQAS ISCRRSSQTLV YSNGNTYLNW FLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
FTFGSGTKLE IK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:166):	RSSQTLVYSNGNTYLN
CDR _{L2} a PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO:167):	KVSNRFS
CDR _{L3} 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_L sunt prezentate subliniat):

gatgttgga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttgagaga
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg
gaaacaccta tttaaattgg ttctgcaga agccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct aaaagtttc caaccgattt tctggggctc cagacaggtt
 cagtggcagt ggatcagggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
 aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa

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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:171):	SYLVS
CDR _{H2} a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:172):	TISGGGGNTYYSDSVKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:173):	YGFDFGAWFAY

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

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
 cctgaaactc tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg
tgtcttgggt tccagagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc
attagtggtg gtggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggtcg
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacctgtac ctgcaaatca
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatggg
ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
 ctcttcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO:174**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITCRASENIY SYLAWYQQKQ EKSPQLLVYN
AKTLAAGVPS RFGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYCQH HYAVPWTFGG
 GTRLEIT

CDR _{L1} a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:176):	RASENIYSYLA
CDR _{L2} a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:177):	NAKTLAA
CDR _{L3} a PD-1 mAb 9 (SEQ ID NO:178):	QHHYAVPWT

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

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga
 tattgtcacc atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag
catgggatca gcagaaacag gaaaaatctc ctgagctcct ggtctataaat
gcaaaaaacct 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“

Anticorpul PD-1 anti-uman murin descris mai sus, PD-1 mAb 9, 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 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 împerecheată cu domeniile VH umanizate. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul dintre domeniile VL umanizate împerecheată 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)“.

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 9 VH1 (**SEQ ID NO:179**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H 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_H sunt prezentate subliniat):

gaggtgcagc tgggtgaaaag tggggggcggc ctgggtgcgac ccggggggaag
tctgaaactg tctgtgtcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg
tgtcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggggaag
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga
tttgacggcg catggtttgc ctactggggga cagggcacat tggtaacctg
tagctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 9 VH2 (**SEQ ID NO:181**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

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

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VH2 este **SEQ ID NO:182** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaggtgcagc tgggtgaaaag tggggggcggc ctggcgcgac ccggggggaag
tctgaaactg tctgtgtcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg
tgggctgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg gacggccact
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggggaag
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
actccgcagc cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga
tttgacggcg catggtttgc ctactggggga cagggcacat tggtaacctg
tagctcc

CDR_{H1} 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_{H1} 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_H sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
GTKLEIK

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VL1 este **SEQ ID NO:185** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga
 tcgggtcacc atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcataoctog
cctggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacaac
gccaagaccc tgcgagctgg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc
 aggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg
 ccaacttacta ctgcccagcat cattacgcag tgcctggac 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_H sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASENIY NYLAWYQQK GKAPKLLIYD
AKTLAAGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
 GTKLEIK

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 9 VL2 este **SEQ ID NO:187** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga
 tcgggtcacc atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctog
cctggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacgac
gccaagaccc tgcgagctgg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc
 aggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg
 ccaacttacta ctgcccagcat cattacgcag tgcctggac cttcggacaa
 ggcactaagc tcgagatcaa a

CDR_{L1} 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_{L1} ale PD-1 mAb 9 descrise mai sus.

CDR_{L2} 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_{L2} ale PD-1 mAb 7 descrise mai sus.

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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:192):	NYLMS
CDR _{H2} a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:193):	SISGGGSNIYYPDSVKG
CDR _{H3} 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_H sunt prezentate subliniat):

gaagtgatac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
 cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt
attagtggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg
 attcaccata tccagggaca atgccaagaa cacctgtac ctgcaaatga
 acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa
ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctcc

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO:195**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRTSQDIS NFLNWYQQKP DGTIKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GSTLPWTFGG
 GTKLEII

CDR _{L1} a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:197):	RTSQDISNFLN
CDR _{L2} a PD-1 mAb 10 (SEQ ID NO:198):	YTSRLHS
CDR _{L3} 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_L sunt prezentate subliniat):

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgect ctctgggaga
 cagagtcacc atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatTTTTTaa
actgggatca gcagaaacca gatggaacta ttaaactcct gatctacttac
acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc
 tggaaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg
 ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcgggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcat a

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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:202):	GYWMH
CDR _{H2} a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:203):	AIYPGNSDTHYNQKFKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:204):	GTYSYFDV

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 11 este **SEQ ID NO:201** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

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 aatgaggac tctgcatct attactgtac tactgggacc
tactcgtact tcgatgtctg gggcacagg accacgtca ccgtctctc a

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO:205**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQHRT NGSPRLLIKY
ASESISGIPS RFGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWLTFGAG
 TKLELK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:207):	RASQSIGTSIH
CDR _{L2} a PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO:208):	YASESIS
CDR _{L3} 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_L sunt prezentate subliniat):

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga
 aagagtcaatg ttctctctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac
actggtatca gcacagaaca aatggttctc caaggcttct cataaagtat
gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc aggttttagtg gcagtggatc
 agggactgat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct gaagatattg
 cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cgggtgctggg
 accaagctgg agctgaaa

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_H sunt prezentate subliniat).

QGHLLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGT
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TVDKSSTTY MELRSLTSED SAVFYCSRER
ITTVVEGAYW YFDVWGTGTT VTVSS

CDR _{H1} a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:212):	DYEMH
CDR _{H2} a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:213):	TIDPETGGTAYNQKFKG
CDR _{H3} 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_H sunt prezentate subliniat):

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctgggtgaggc ctgggggcttc
 agtgacgctg tcttgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga
tgcactgggt gaaacagaca cctgtgcatg gcttggaatg gattgggact
attgatcctg aaactgggtg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa
 ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagaggagagg
attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac
 aggaccacg gtcaccgtct cctca

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO:215**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRRSSQNIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLICKVSTRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFOGSHVP
YTFGGGTKLE IK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:217):	RSSQNIVHSNGNTYLE
CDR _{L2} a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:218):	KVSTRFS
CDR _{L3} a PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO:219):	FQGSHPYT

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

gatgttttga tgaccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg
gaaacaccta tttagaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct gaaagtctc caccggattt tctggggctcc cagacagggt
 cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
 aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

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_H sunt prezentate subliniat).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SHTMSWVRQT PEKRLEWVAT
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSLRSED TALYYCARQA
YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S

CDR _{H1} a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:222):	SHTMS
CDR _{H2} a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:223):	TISGGGSNIYYPDSVKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:224):	QAYYGNYWYFDV

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

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

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO:225**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITCLLASQTIG TWLAWYQQKPK GKSPQLLIYA
AATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSKISSLQA EDFVSYCCQ LDSIPWTFGG
 GTKLEIK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:227):	LASQTIGTWLA
CDR _{L2} a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:228):	AATSLAD
CDR _{L3} a PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO:229):	QLLDSIPWT

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 13 este **SEQ ID NO:226** (nucleotidele care codifică resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

gacattcaga tgaccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga
 aagtgtcacc atcacgtgc c tggcaagtca gaccattggt acatggttag
catgggatca gcagaaacca gggaaatctc ctgagctct gatttatgct
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc
 tggcaca^{aaaa} ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg
 taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

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_H sunt prezentate subliniat).

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI SYWITWVKQR PGQGLQWIGN
IYPGTDGTTY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLRRLTSED SAVYYCATGL
HWYFDVWGTG TTVTSS

CDR _{H1} a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:232):	SYWIT
CDR _{H2} a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:233):	NIYPGTDGTTYNEKFKS
CDR _{H3} a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:234):	GLHWYFDV

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 14 este **SEQ ID NO:231** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

caggccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc
 agtgaagatg tctgcaagg cttctggcta caacttcac agctactgga
taacctgggt gaaacagagg cctggacaag gccttcagtg gattggaaat
atztatcctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagcaa
 ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac atgcacctca
 gtcgctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta
actggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc c

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO:235**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQSVG TNVAWYQQKP GQSPKALIYS
ASSRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNSYPYTFGG
 GTKLEIK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:237):	KASQSVGTNVA
CDR _{L2} a PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO:238):	SASSRFS
CDR _{L3} 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_L sunt prezentate subliniat):

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga
 cagggtcagt gtcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag
cttggtatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaagcact gatttacttcg
gcacctccc gattcagtgg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc
 tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct gaagacttgg
 cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg
 gggaccaagc tggaaataaa a

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_H sunt prezentate subliniat):

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS SYLISWVRQT PEKRLWVAA
ISGGGADTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTRRG
TYAMDYWGQG TSVTVSS

CDR _{H1} a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:242):	SYLIS
CDR _{H2} a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:243):	AISGGGADTYADSVKG
CDR _{H3} a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:244):	RGTYAMDY

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VH al PD-1 mAb 15 este **SEQ ID NO:241** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
 cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca
tctcttgggt tgc ccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcgctgcc
attagtgggtg gtgggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaagggtcg
 attcaccatc tccagagaca atgccaaaga cacctgtat ctgcaaatga
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgagggg
acctatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtca ccgtctctc c

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO:245**) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA
AATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSKISSLQA EDFVNYCQQ LYSIPWTFGG
 GTKLEIK

CDR _{L1} a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:247):	LASQTIGTWLA
CDR _{L2} a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:248):	AATSLAD
CDR _{L3} a PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO:249):	QLYSIPWT

Un exemplu de polinucleotidă care codifică domeniul VL al PD-1 mAb 15 este **SEQ ID NO:246** (nucleotidele care codifică resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

gacattcaga tgaccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga
 aagtgtcacc atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag
catgggatca gcagaaacca gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc
 tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg
 taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

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 împerecheat 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_H sunt prezentate subliniat):

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA
ISGGADTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG
TYAMDYWGQG TLVTSS

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 15 VH1 este **SEQ ID NO:251** (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gaagtgcaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtgggtc
 actcagactg tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatotta
tctcttgggt ggcceaagcc ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc
attagtgggg gtggtgccga tacatattat gccgacagcg tcaagggacg
 tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac ctgcagatga
 actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc cgggcgcggg
acttacgcta tggactattg gggccagggc accttggta ctgtctcacc c

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al hPD-1 mAb 15 VL1 (SEQ ID NO:252) este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKPKAPKLLIYA
ATSLADGVPS RFGSGSGTD FTFTISLQP EDFATYYCQQ LYSIPWTFGO
 GTKLEIK

Un exemplu de polinucleotidă care codifică hPD-1 mAb 15 VL1 este SEQ ID NO:253 (nucleotidele care codifică resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

gatatccaga tgaccagtc tccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga
 ccgtgtgacc atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg
cctgggatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc
gccacctccc tgcagatgg agtgccctcc cgatttagcg ggtccgggtc
 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

În funcția imună tradițională, interacțiunea complexilor 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 complexilor imunitari la receptori 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.

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 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 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, 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 FcγRIIA. 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 când 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 FcγRIIA 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 FcγRIIA 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 FcγRIIA 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 FcγRIIA 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 FcγRIIA 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 imunospecific 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 Fleisch 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 Brüggemann 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.

Într-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 FcγRIIIA) 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, cvadrupe 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 & R292P	F243L, P247L & N421K	L234F, F243L, R292P & Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L
D270E	F243L & Y300L	F243L, R292P & Y300L	L235I, F243L, R292P & Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L
R292G	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I	L235Q, F243L, R292P & Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L	F243L, R292P & P396L	F243L, P247L, D270E & N421K	
	R292P & Y300L	F243L, Y300L & P396L	F243L, R255L, D270E & 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 & V305I	P247L, D270E & N421K	F243L, D270E, G316D & R416G	
	R292P & P396L	R255L, D270E & P396L	F243L, D270E, K392T & P396L	
	Y300L & P396L	D270E, G316D & R416G	F243L, D270E, P396L & Q419H	
	P396L & Q419H	D270E, K392T & P396L	F243L, R292P, Y300L, & P396L	
		D270E, P396L & Q419H	F243L, R292P, V305I & P396L	
		V284M, R292L & K370N	P247L, D270E, Y300L & N421K	
		R292P, Y300L & P396L	R255L, D270E, R292G & P396L	
			R255L, D270E, Y300L & P396L	
			D270E, G316D, P396L & R416G	
Raport de afinități < 1				
Y300L	F243L & P396L		F243L, R292P & V305I	
P396L	P247L & N421K			
	R255L & P396L			
	R292P & V305I			
	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

Într-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, I328 sau V330. Într-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.

Într-un caz preferat, în variantele regiunilor Fc care se leagă la un FcyR 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.

Într-un caz diferit, în variantele regiunilor Fc care se leagă la un Fc γ R (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.

Într-un caz diferit, în variantele regiunilor Fc care se leagă la un Fc γ R (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. Într-un caz diferit, în variantele regiunilor Fc care se leagă la Fc γ RIIA 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.

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.

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	323I;
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

Grup	VARIANTĂ	Grup	VARIANTĂ
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
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 / I332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N

Grup	VARIANTĂ	Grup	VARIANTĂ
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 / I332E
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		

Într-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.

Într-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
- (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
- (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.

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

- (A) F243L, R292P, și Y300L;
- (B) L235V, F243L, R292P, Y300L, și P396L; sau
- (C) F243L, R292P, Y300L, V305I, și P396L.

Într-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 FcyRIA (CD64), FcyRIIA (CD32A), FcyRIIB (CD32B), FcyRIIIA (CD16a) sau FcyRIIIB (CD16b) (față de legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Într-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 FcyR (de exemplu, FcyRIIIA) 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; 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 GQPREPQVYF LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

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

Într-un caz diferit, o moleculă de legare la PD-1 din divulgare cuprinde o regiune Fc care în mod inerent prezintă o legare scăzută (sau substanțial nici una) la FcyRIIIA (CD16a) și/sau funcții efectoare reduse (față de legarea prezentată de regiunea Fc IgG1 de tip sălbatic (**SEQ ID NO:1**)). Într-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 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, (Lu și colab., (2008) „The Effect Of A Point Mutation 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 FcγR: Current Models“, Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. și colab. (2002) „Engineering 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 Fc γR1, Fc γR2, Fc γR3, And FcγR4 And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc γR“, J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. și colab. (2000) „Mapping Of The C1q 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 Molecules Lacking FcγR1 Binding And Monocyte Triggering Activities“, Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. și colab. (1996) „Modulation Of Fc(γ)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 Fc γR1 And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains“, J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins și colab. (1995) „Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A γ4 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 Fc γR: The Role Of Glycosylation“, Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. și colab. (1995) „Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc γR“, 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 γR1“, Mol. Immunol. 29:53-59; Lund și colab. (1991) „Human Fc γR1 And Fc γR2 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, 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.

Într-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 hidroxiamino, *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. Într-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 efectoare 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. Anticorpilor 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.

Într-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. Într-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. Într-un caz, al doilea epitop nu este un epitop de PD-1. Într-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, anticorpul bispecific capabil 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_{PD-1}/VH_{PD-1} și VL2/VH2, în care PD-1 este „primul“ epitop, sau VL1/VH1 și VL_{PD-1}/VH_{PD-1}, în care PD-1 este „al doilea“ epitop).

Primul lanț de polipeptidă al unei instanțe de astfel de diacorpi bispecifici 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_{PD-1} sau fie VL_{Epitop 2}), 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_{PD-1}) sau fie la primul epitop (dacă un astfel de prim lanț de polipeptidă conține VL_{Epitop 2}), 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 bispecifici 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_{PD-1} sau VL_{Epitop 2}, 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_{PD-1}) sau fie la PD-1 (dacă un astfel de al doilea lanț de polipeptidă conține VL_{Epitop 2}), 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 doemniilor 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**), LGGGSG (**SEQ ID NO:261**), GGGSGGGSGGG (**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 D* 65:1032-1041; 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 α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -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.

Într-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**: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), 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: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**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 micromoleculilor 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**): LAEAKVLANR 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:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP (**SEQ ID NO:26**), sau secvența de aminoacizi:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉E ILAALP (**SEQ ID NO:27**), sau secvența de aminoacizi:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉E 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 bispecifici 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. Încorporarea 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, încorporarea 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** sau **SEQ ID NO:23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**); și domeniile „K-spiralate“ (**SEQ ID NO:22: KVAAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE** sau **SEQ ID NO:24: KVAACKE-KVAAALKE-KVAAALKE-KVAAALKE**). 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 suplimentară (liantți). 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: GGGs (**SEQ ID NO:29**), LGGGSG (**SEQ ID NO:261**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:262**), ASTKG (**SEQ ID NO:30**), DKHTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**), EPKSCDKHTHTCPPCP (**SEQ ID NO:32**), LEPKSS (**SEQ ID NO:33**), APSSS (**SEQ ID NO:34**), și APSSSPME (**SEQ ID NO:35**), LEPKSADKHTHTCPPC (**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: GGGDKHTHTCPPCP (**SEQ ID NO:263**); și LEPKSSDKHTHTCPPCP (**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: EPKSCDKHTHTCPPCP (**SEQ ID NO:32**) de la IgG1, ERKCCVECPCPCP (**SEQ ID NO:11**) de la IgG2, ESKYGPPCPCPCP (**SEQ ID NO:12**) de la IgG4, și ESKYGPPCPCPCP (**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**:

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

Într-un caz specific, diacorpul din prezenta divulgare sunt bispecifici, tetravalenți (*adică*, posedă patru situsuri de legare la epitop), diacorpul care conține 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.).

Într-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 bispecifici care conțin regiunea Fc pot avea oricare din cele două orientări (**Tabelul 3**):

Tabelul 3		
Prima orientare	A 3-a catenă	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1-a catenă	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	A 2-a catenă	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
A doua orientare	A 3-a catenă	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1-a catenă	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-HPD-COOH
	A 2-a catenă	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
HPD = domeniu de promovare al heterodimerului		

Într-un caz specific, diacorpul din prezenta divulgare sunt bispecifici, 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. Diacorpul bispecific, bivalent 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.).

Într-o instanță suplimentară, diacorpul bispecific 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 CH1, 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 cincilea 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 cincilea 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 cincilea 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 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 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 cincilea, 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 disulfurică 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**:

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

Într-o instanță specifică, diacorpul din prezenta divulgare sunt bispecifici, tetravalenți (*adică*, posedă patru situsuri de legare la epitop), diacorp 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. Într-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.*). Într-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.*). Într-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 diacorp 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. Într-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.).

În 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**:

Tabelul 5		
1-a orientare cu patru catene	A 2-a catenă	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-a catenă	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3 -COOH
	A 3-a catenă	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	A 4-a catenă	NH ₂ -VL3-CL-COOH
A 2-a orientare cu patru catene	A 2-a catenă	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-a catenă	NH ₂ -CH2-CH3--VL1-VH2-HPD COOH
	A 3-a catenă	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	A 4-a catenă	NH ₂ - VL3-CL-COOH
1-a orientare cu trei catene	A 2-a catenă	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-a catenă	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3 -COOH
	A 3-a catenă	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
A 2-a orientare cu trei catene	A 2-a catenă	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-a catenă	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH
	A 3-a catenă	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-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 kapa CL IgG uman. Secvența de aminoacizi a unui exemplu de domeniu kapa CL uman este **(SEQ ID NO:8)**:

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

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

```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS
```

Cum s-a prevazut 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 WNSGALTSKV
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 WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS 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 WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS 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)**: ERKCCVECP .

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)**: ESKYGPPCPPCP.

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), FcγRIIIA (CD16a) sau FcγRIIIB (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 receptorii 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 receptorii activatori (*de exemplu*, FcγRIIA (CD16A) și reduc legarea la receptorii 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), FcγRIIIA (CD16a) sau FcγRIIIB (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 prezentă 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 FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQOG 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 FLFPPKPKDT 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*, „gaură“ (*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 molecula 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 GQPREPQVYTT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDL 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 secvență **„care poartă gaură“ (SEQ ID NO:7):**

```
APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYTT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYVSKL 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 FcγR 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**):

```
APEX1X2GGPSV FLFPPKPKDT LX3IX4RX5PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLX6CX7VK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLX8SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHX9X10YTQKS LSLSPGX11
```

în care:

- (a) X₁ și X₂ sunt ambele L (de tip sălbatic), sau sunt ambele A (o legare FcγR scăzută);
- (b) X₃, X₄, și X₅ respectiv sunt M, S și T (de tip sălbatic), sau sunt Y, T și E (perioadă de înjumătățire extinsă),
- (c) X₆, X₇, și X₈ respectiv sunt: T, L și Y (de tip sălbatic), sau sunt W, L și Y (nod), sau S, A și V (gaură);
- (d) X₉ și X₁₀ 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) X₁₁ este K sau este absent.

În alte cazuri, divulgarea cuprinde molecule de legare PD-1 care cuprind domeniile 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).

Într-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. Într-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 imunospecifiți 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 PFAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
 VLSVGGGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
 HWFNRGQGR VPVRESPPHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
 PGGPDLVLT GDNGDFTLRL EDVSAQAGT YTCHIHLEQEQ QLNATVTLAI

 ITVTPKSFSG PSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSLDTPSQ RSFSGPWLEA
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL 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 subliniat):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNTNSN PSLKSRVTLT LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
DYEYNWFDPW 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 subliniat):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP 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_H sunt prezentate subliniat).

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

CDR _{H1} a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:42):	RNYGMN
CDR _{H2} a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:43):	WINTYTGESTYADDFEG
CDR _{H3} 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_L sunt prezentate subliniat):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRF TGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKLE IK

CDR _{L1} a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:46):	KSSQSLHSDGKTYLN
CDR _{L2} a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:47):	LVSELDS
CDR _{L3} a LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:48):	WQGT HFPYT

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 împerecheat cu oricare din domeniile VH umanizate pentru a genera un domeniu de legare LAG-3. Corespunzător, orice anticorp cuprinzând unul dintre domeniile VL umanizate împerecheat 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_H sunt prezentate subliniat):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFV FV SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

Secvența de aminoacizi a domeniului VH al **hLAG-3 mAb 1 VH2** (**SEQ ID NO:50**) este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

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

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO:51) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

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

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL2 (SEQ ID NO:52) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWWQGTHFP
YTFGGGTKVE IK

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

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

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al hLAG-3 mAb 1 VL4 (SEQ ID NO:54) este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

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

CDR_{L1} 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 substituită este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR_{L1} 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_H sunt prezentate subliniat):

EVLVQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTTLTVSS

CDR _{H1} a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:57):	DYNMD
CDR _{H2} a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:58):	DINPDNGVTIYNQKFEG
CDR _{H3} a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:59):	EADYFYFDY

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 SVVAWYQKP GQSPKLLIFS
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

CDR _L 1 a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:61):	KASQDVSSWA
CDR _L 2 a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:62):	SASYRYT
CDR _L 3 a LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO:63):	HYSTPWT

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 împerecheat 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_H sunt prezentate subliniat):

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

O secvență de aminoacizi a domeniului VH al **hLAG-3 mAb 6 VH2 (SEQ ID NO:295)** este prezentată mai jos (resturile CDR_H sunt prezentate subliniat):

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNLSRAED TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTTLTVSS

Secvența de aminoacizi a domeniului VL al **hLAG-3 mAb 6 VL1 (SEQ ID NO:296)** este prezentată mai jos (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):

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_L sunt prezentate subliniat):

DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVDP RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

CDR_L1 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 substituțată este prezentată subliniat). Se are în vedere că o substituție similară poate fi încorporată în oricare din domeniile CDR_L1 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 bispecifici, 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_{LAG-3} 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_{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 A este o variantă din **SEQ ID NO:267**:

```
DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLI HSDX1KTYLNL LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHTFP
YTFGGGTKVE IKGSGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP
KPKDTLX2IX3R X4PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL
G
```

în care X₁, X₂, X₃ și X₄ sunt selectați în mod independent, și în care X₁ este A sau G; X₂ este Y sau M; X₃ este T sau S; și X₄ 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**, în care X₁ este A; X₂ este Y; X₃ este T; și X₄ 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_{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 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 A este (**SEQ ID NO:268**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
 YGMNWRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASSTAYL
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG 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 în CDR_{L1}. 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_{LAG-3} 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_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); o peptidă liant de intervenție (**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 B este **SEQ ID NO:267**, în care X₁ este G; X₂ este Y; X₃ este T; și X₄ 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_{LAG-3} 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_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO:147**); o peptidă liant de intervenție (**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**); 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 X₁ este G; X₂ este M; X₃ este S; și X₄ 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**.

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 LSASVGRVIT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPV RFGSGSGGTD FTLTISLQF EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDVAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
ALEKEVALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
LYITREPEVT CVVDVDSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NWFSCVMHE ALHNHYTQKS LLSLGL
```

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 NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TLTVSSGGC GGGKVAACEK
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E
```

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

Au fost generate patru exemple de diacorpi PD-1 X LAG-3 bispecfici, care conțin regiunea Fc cu patru lanțuri, care cuprind domeniile CL/CH1 denumiți „DART D“, „DART E“, „DART J“ și „DART 1“. 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.

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 SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTN

YGMNWRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASSTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYSSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKTYTCNV 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 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_{LAG-3} 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_{PD-1} 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.

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 ISCKSSQSLI HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGRTVAA
PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
VTEQDSKST YSLSTLTLS KADYKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG
EC
```

2. DART E

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.

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_{LAG-3} 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 anticorpului monoclonal capabil de legare la PD-1 (VH_{PD-1} 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 E este (**SEQ ID NO:271**):

```
DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSL L HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGASTKG
PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
NWIYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
SVMHEALHNH YTKSLSLSL 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_{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 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 QOKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVSKV CKASGYTFTN
YGMNWRQAP GQGLEWMIWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASSTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMYDWG QGTTVTVSSL GGGSGRTVAA
PSVFIFFPSD EQLKSGTASV VCLLNIFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
VTEQDSKST YSLSTLTLS KADYEKHKVY 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_{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 (**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 LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPV RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVCKAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP
LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED 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_{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 (**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 J este (**SEQ ID NO:293**):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TLTIVSSLGG GSGRTVAAPS
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
EQDSKDYSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
```

4. DART 1

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 FcyR 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_{PD-1} 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_{LAG-3} 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.

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

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVPQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
 WVRQAPGKGL EWVAVIWYDG SKRYIADSVK GRFTISRDNK KNTLFLQMNS
 LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSLG GSGGASTKGP SVFPLAPSSK
 STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPCCPAPE
 AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
 VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFI PSDIAVEWES
 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SPG

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_{LAG-3} 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_{PD-1} 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 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSLTCAVY GGSFSDYYWN
 WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRV
 TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGTI VTVSSLGGGS GRTVAAPSVE
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLV STLTLSKADY 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 bispecifici, 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 Fc γ R redusă și perioadă de înjumătățire extinsă, și domeniile 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_{PD-1} 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 X₁ este A, X₂ este A; X₃ este Y, X₄ este T, X₅ este E, X₆ este S, X₇ este A, X₈ este V, X₉ este A, X₁₀ este K, și X₁₁ 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 SYWMNWRQA PGQGLEWIGV
 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
 YGTS PFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TTPAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSN TKVDKRVPEK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
 DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
 DSDGSFFLVLS KLTVDKSRWQ QGNVFSVCSVM 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_{PD-1} 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 SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLSKADY EKHKVYACEV
 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_{PD-1} 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 X₁ este A, X₂ este A; X₃ este Y, X₄ este T, X₅ este E, X₆ este W, X₇ este L, X₈ este Y, X₉ este N, X₁₀ este H, și X₁₁ 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_{LAG-3} 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_{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) (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 LYSLSVTVV PSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSN TKVDKRVPEK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
 DTLYITREPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSQSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
 GSGGGSGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI SCKSSQSLH SDAKTYLNWL
 LQKPGQPPER LIYLVSELDG GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDVGVY
 YCWQGTTHFPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS
 CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT
 VDKSTSTAYM ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
 CGGGEVAALE KEVAALEKEV 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_{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 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 patrulea lanț de polipeptide ale DART F este (**SEQ ID NO:276**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYFTN
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASSTAYL
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
 KEKVAALKEK VAALKEKVAAL 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_{LAG-3} 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 X₁ este A, X₂ este A; X₃ este Y, X₄ este T, X₅ este E, X₆ este S, X₇ este A, X₈ este V, X₉ este A, X₁₀ este K, și X₁₁ 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
 LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 LLDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVVFSCSV 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_{LAG-3} 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 YYCWQGTDFP
 YTFGGGTVKE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

Al treilea lanț de polipeptide 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_{LAG-3} 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 X₁ este A, X₂ este A, X₃ este Y, X₄ este T, X₅ este E, X₆ este W, X₇ este L, X₈ este Y, X₉ este N, X₁₀ este H, și X₁₁ este absent); o peptidă liant de intervenție (GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:262**)); 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**: GGGSGGG (**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 a 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 polipeptide al DART G este (SEQ ID NO:279):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWRQA PGQGLEWMGW
 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
 LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKHTTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG
 GSGGGGGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF
 QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY
 FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS
 CKASGYSFTS YWMNWRQAP 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_{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 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 (K-spiralat) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:22**); și un C-terminal.

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
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYSFTS
 YWMNWRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVITIT VDKSTSTAYM
 ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK
 EKVAALKEV AALKEKVAAL KE

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 bispecifici, 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_{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 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: GGGDKHTCPPCP (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 SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
 YGMNWRQAP GQGLEWMGIW NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLSLS
 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_{LAG-3} 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_{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 (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 YYCWQGTTHFP
 YTFGGGTKVE IGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
 SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGKVAAL
 KEKVAALKEK VAALKEKVAAL 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 (DKHTHTCPPCP (**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**):

DKHTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE 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).

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_{PD-1} 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 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
IHPSDSETWL DQFKKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCEKTHTCPE CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCE VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

```

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_{PD-1} 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 LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

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_{LAG-3} 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.

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 GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 LDDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

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_{LAG-3} 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 YYCWQGTTHFP
 YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

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_H sunt prezentate subliniat):
QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DKKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTTLVT VSS

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului ușor al **PD-1 mAb A** are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:65**) (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTSSLEP 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_H sunt prezentate subliniat):
QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

Secvența de aminoacizi a domeniului variabil al lanțului ușor al **PD-1 mAb B** are secvența de aminoacizi (**SEQ ID NO:67**) (resturile CDR_L sunt prezentate subliniat):
 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGTKVEIK

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

Într-o alternativă, anticorpii pot fi făcuți recombinant și exprimați utilizând orice metodă cunoscută în domeniu. Anticorpii pot fi făcuți recombinant prin izolarea prima dată a anticorpilor făcuți din animale gazdă, obținând secvența genică, și utilizând secvența genică pentru a exprima anticorpii 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. Într-o altă alternativă, anticorpii 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).

Anticorpii 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).

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 anticorpii, 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 anticorpii sau proteina de interes.

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 celalalt 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 enzimatică, 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 bispecifici 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 bispecifici, diacorpi bispecifici (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) măresc 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 mășirea 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).

Cancerle care pot fi tratate cu astfel de molecule de legare la PD-1 ale prezentei divulgări includ cancerle 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 cordom, 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 fibrogenză 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 gât, 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*, *Pneumonococci*, bacteria rickettsia, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus* (fumigatus, niger, etc.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (albicansi, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis*, *Borrelia burgdorferi*, paraziți helmint (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; Almqvist, 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^b/Le^y** cum s-a găsită 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-A 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^b); **CO-514** (grupă de sânge Le^a) 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**; **D₅₆₋₂₂**; **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 **E₁** (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_{D2}; Saleh și colab. (1993) „Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen“, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398); **gangliosidă GD3** (G_{D3}; 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_{M2}; 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_{M3}; 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 (Ab1, 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^{HER2}; 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 Antidiotypic 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 IL13Rα2 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-13Rα2“, J. Immunol. 187(1):561-569; Bozinov, O. și colab. (2010) „Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Rα2 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; Möller 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 adenocarcinomuri; **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); **T_{5A7}** găsit în celulele 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- α , receptor TNF- β ; **receptor TNF- γ** (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 virusii 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 hapten**, **Le^y** 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, anticorpul 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 alogenice. 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 anticorpilor care activează responsivitatea imună a gazdei pentru a furniza niveluri crescute de activare ale celulelor T. În particular, s-a demonstrat că anticorpilor anti-PD-1, anticorpilor anti-PD-L1 și/sau anticorpilor 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 ajutoare 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, 4-1BB, 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. Transl. 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 bispecifici, etc.) sau care concurează pentru legare cu astfel de anticorpi pot fi marcați detectabil (*de exemplu*, cu radicali radioactivi, enzimatici, fluorescenți, chemiluminiscenti, paramagnetici, diamagnetici, sau cu alți radicali de marcare) 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_L-uri și cele 3 CDR_H-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.

Într-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 divulgării (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 umanizate 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_L-uri și cele 3 CDR_H-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 vânzării 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 conjugate a divulgării, sau a unei compoziții farmaceutice care cuprinde o proteină de fuziune sau o moleculă conjugată 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 mediată 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 greutateii 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) „Intratamoral 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. Într-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). Într-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, în 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 Homeobox 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 anticorpii anti-PD-1 au fost utilizați la 3, 1,0, 0,3333, 0,1111, 0,0370, 0,0123, sau 0,0041 μg/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 Wallac, 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 anticorpii anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se leagă la ambele PD-1 solubile, uman și de maimuță cynomolgus.

Pentru a caracteriza suplimentar anticorpii 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 anticorpii 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 μg/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 μg/mL imobilizat pe o placă acoperită cu streptavidină. Pentru aceste studii au fost utilizați anticorpii anti-PD-1 la 10, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, sau 0,1563 μg/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 Wallac, Perkin Elmers). Rezultatele acestui experiment sunt prezentate în **Figurile 9A-9D**.

Rezultatele acestor teste de inhibare (**Figurile 9A-9D**) arată că anticorpii 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 anticorpii 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-mulgFc umană solubilă biotinitată (shPD-L2; Ansell Cat# 573-030), fiecare la 0,1 μg/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 x 10⁻¹, 6,25 x 10⁻², 1,56 x 10⁻², 3,90 x 10⁻³, 9,76 x 10⁻⁴, 2,4 x 10⁻⁴, 0,6 x 10⁻⁴ μg/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 IC50 pentru inhibarea legării PD-1/PD-L1 și este furnizată media mostrei (□) din cel puțin două experimente (exceptând unde indicat) în **Tabelul 6**.

Tabelul 6			
Anticorp anti-PD-1	IC50 (μg/test)	Anticorp anti-PD-1	IC50 (μg/test)
PD-1 mAb A	0,0044	PD-1 mAb 8	0,6611 ‡
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 ‡
PD-1 mAb 3	0,0361 ‡	PD-1 mAb 12	0,0238 ‡
PD-1 mAb 4	0,0156 ‡	PD-1 mAb 13	0,0117
PD-1 mAb 5	0,0039	PD-1 mAb 14	0,0149 ‡
PD-1 mAb 6	0,0051	PD-1 mAb 15	0,0060
PD-1 mAb 7	0,0024		
‡ 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 anticorpilor 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.

În mod similar, anticorpilor 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 anticorpilor PD-1 de referință (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B). Anticorpilor PD-1 PD-1 mAb 11 și PD-1 mAb 15 nu au fost testați în acest test. Rezultatele pentru câțiva anticorpi anti-PD-1 umanizați incluzând hPD-1 mAb 15 sunt furnizate mai jos.

Exemplul 2

Umanizarea și caracterizarea suplimentară

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, anticorpilor 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 denumită 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)“. Anticorpii umanizați 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)).

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 WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDRVEP
KCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDDSGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKLSLSPG
```

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 balama 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.

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 SYWMNWRQA PGQGLEWIGV
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSVGH TFAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDRVEPK SCDKTHTCP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTP ETCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSV MHEALHNHYT QKLSLSPG
```

În **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 (subliniate) (**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 WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYLSVSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCVMHE ALHNHYTQKS LLSLGL

```

În **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 (subliniate) (**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 SYWMNWRQA PGQGLEWIGV
IHPDSEITWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFP L APCRSTSES TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTKTY
TCNVDPKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLLGGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQEPENNY KTTTPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGL

```

În **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 (subliniate) (**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 QOKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

În **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 încorporarea diferitelor regiuni constante și/sau prin introducerea uneia sau mai multor substituții de aminoacizi, aditii 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. Anticorpilor anti-PD-1 himerici cuprinzând domeniile variabile murine și regiunile constante umane, sunt generați cum s-a descris mai sus.

Anticorpilor umanizați (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, anticorpilor umanizați au 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. Anticorpilor anti-PD-1 au fost capturați 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, anticorpilor 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)₂ imobilizați 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							
Captură de proteină A							
Annticorp ati-PD-1	Uman^a			Maimuță cynomolgus^b			
	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-4}$) 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)₂							
PD-1 mAb A	13	8,4	6,5		8,1	4,5	5,6
IgG1 (AA)							
PD-1 mAb A	13	7,9	6,1		8,4	5,0	6,0
IgG4 (P)							

Tabelul 7								
Captură de proteină A								
Anticorp anti-PD-1	Uman ^a				Maimuță cynomolgus ^b			
	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)		k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-4}$) d	KD (nM)	
PD-1 mAb B		25	28	11,2		20	6,4	3,2
IgG1 (AA)								
PD-1 mAb B		26	25	9,6		20	7,9	4,0
IgG4 (P)								
hPD-1 mAb		25	3,8	1,5		16	7,8	4,9
7(1,2) IgG1 (AA)								
hPD-1 mAb		27	4,1	1,5		17	7,8	4,6
7(1,2) IgG4 (P)								
hPD-1 mAb		5,6	6,1	10,9		5,6	5,2	9,3
9(1,1) IgG1 (AA)								
hPD-1 mAb		6,1	5,8	9,5		4,9	7,4	15,1

^aPD-1 uman solubil matcat His (shPD-1 His)
^bPD-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 anticorpul anti-PD-1, PD-1 mAb 1-15, sau anticorpul 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 (~250.000 celule/godeu) în tampon de blocare (FACS + 10% albumină din ser uman). Pentru aceste studii, anticorpul anti-PD-1 au fost utilizați la 50, 12,5, 3,13, 2,0 $\times 10^{-6}$

$1, 4,9 \times 10^{-2}, 1,2 \times 10^{-2}, 3,0 \times 10^{-3}, 1,9 \times 10^{-4}, 7,6 \times 10^{-4}, 4,75 \times 10^{-5}$, sau $1,19 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{test}$ (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 σ) din patru experimente separate sunt furnizate în **Tabelul 8**.

Tabelul 8				
Anticorp anti-PD-1	Legare la saturație			
	EC50 ($\mu\text{g}/\text{test}$)		EC90 ($\mu\text{g}/\text{test}$)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
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 anticorpii examinați.

Pentru a caracteriza suplimentar anticorpii 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 σ) din trei experimente separate sunt furnizate în **Tabelul 9**.

Tabelul 9								
Anticorp anti-PD-1	sPD-L1				sPD-L2			
	IC50 ($\mu\text{g}/\text{test}$)		IC90 ($\mu\text{g}/\text{test}$)		IC50 ($\mu\text{g}/\text{test}$)		IC90 ($\mu\text{g}/\text{test}$)	
	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 μ L de mediu de cultură (RPMI + 10% FBS + 100 μ g/mL higromicină B + 100 μ g/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 μ L 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 μ g/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 μ L 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**.

Anticorp anti-PD-1	Semnalizare reporter			
	EC50 (μ g/test)		EC90 (μ g/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	,01858
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 placcate 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, supernatanții au fost recoltați pentru a măsura secreția de citokine utilizând truse ELISA umane DuoSet pentru IFN γ , TNF α , 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 anticorpul unic 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 γ din PBMC-urile stimulate SEB (0,1 ng/mL) de la un donator responsabil 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 μ g/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 μ g/mL. **Figurile 15A-15B** prezintă IFN γ (**Figura 15A**) și TNF α (**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 γ în mostrele tratate cu SEB+Ab pentru mostrele tratate cu anticorpi anti-PD-1 la 0,625, 2,5 și 10 μ g/mL și media mostrei (SM) și deviația standard (SD σ) de la 3 donatori respondenți diferiți (cu excepția unde este notat) sunt furnizate în **Tabelul 11**. Raportul de IFN γ 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 IFNγ (pg/mL)						
μg/mL anticorp anti-PD1	0,625 μ g/mL		2,5 μ g/mL		10 μ g/mL	
Anticorp anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
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‡	323,79‡	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

‡ Rezultă de la doi donatori respondenți

Tabelul 12						
Raport de secreție IFNγ (anti-PD-I/PD-1 mAb A nou)						
μg/mL anticorp anti-PD1	0,625 μ g/mL		2,5 μ g/mL		10 μ g/mL	
Anticorp anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
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

Tabelul 11						
Secreție de IFN γ (pg/mL)						
μ g/mL anticorp anti-PD1	0,625 μ g/mL		2,5 μ g/mL		10 μ g/mL	
Anticorp anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
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 γ (anti-PD-1/PD-1 mAb B nou)						
μ g/mL anticorp anti-PD1	0,625 μ g/mL		2,5 μ g/mL		10 μ g/mL	
Anticorp anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
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

Rezultatele acestor studii demonstrează că anticorpii 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 γ (**Figurile 14 și 15A**, și **Tabelele 11-13**), și TNF α (**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 anticorpu anti-LAG-3 unic LAG-3 mAb 1 a furnizat cea mai mare sporire.

Exemplul 5

Studii de legare ale moleculelor bispecifice PD-1 \times LAG-3

A fost generat un număr de molecule bispecifice PD-1 \times 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 domeniile 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 1**“. 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 \times LAG-3 sunt furnizate mai sus și sunt rezumate în **Tabelul 14** mai jos.

Tabelul 14					
Nume	mAb-uri parentale	Fc \ddagger	Lanțuri	SEQ ID NO:	Alte componente
DART A	hPD-1 mAb 7(1,2)	IgG4 (YTE)	4	267 (X ₁ =A; X ₂ =Y; X ₃ =T; X ₄ =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 ₁ =G; X ₂ =Y; X ₃ =T; X ₄ =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 ₁ =G; X ₂ =M; X ₃ =S; X ₄ =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)				

Tabelul 14					
Nume	mAb-uri parentale	Fc [‡]	Lanțuri	SEQ ID NO:	Alte componente
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)				
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)				

‡ 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 bispecifici 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 bispecifici 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 μM sau 85,0-0,0021 μM (de patru ori diluții seriale). Valorile EC50 și EC90 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 σ).

Tabelul 15				
Moleculă	Saturație de legare PD-1			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1,9297	0,4324	9,6027	0,4801
DART B	1,7640 [§]		12,2700 [§]	
DART D	2,2267	0,4140	10,9313	2,6351
DART E	3,2180	0,5742	23,840	3,2385
DART F	1,4320 [§]		14,5800 [§]	
DART G	1,1488	0,6227	3,4220	2,4600
DART H	4,5310 [§]		22,6600 [§]	
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
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

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 [§]		9,8580 [§]	
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

Tabelul 15				
Moleculă	Saturație de legare PD-1			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART H	2,3840 [§]		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. Diacorpilor 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

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 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 inhibarea legării ligandului demonstrează că construcțiile de diacorpi bispecfici PD-1 x LAG-3 rețin abilitatea de a inhiba legarea sPD-L1 și sPD-L2 la PD-1 pe suprafața celulei.

În 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 anticorpilor 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 biotinitată (shLAG-3), (la 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) și au fost incubate separat cu celule Daudi pozitive MHC II (2,5 x 10⁶ celule). Cantitatea de legare LAG-3 la suprafața celulelor Daudi a fost determinată utilizând un anticorp secundar de streptavidină conjugat PE prin analiză FACS. Diacorpilor și anticorpilor 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).

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).

Tabelul 18				
Moleculă	Blocarea legării shLAG-3/MHC de clasă II			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1,3835	1,6465	8,396102	8,3962
DART B	0,4081	0,1104	3,0645	0,3924

Tabelul 18				
Moleculă	Blocarea legării shLAG-3/MHC de clasă II			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
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
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 inhibare a 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

Tabelul 19				
Moleculă	Semnalizare reporter			
	IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
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 obținute pentru câteva din aceste construcții bispecifice examinate într-un test reporter PD-L2.

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 anticorpilor 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 anticorpilor 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 γ 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.

Într-un astfel de studiu, a fost examinată abilitatea moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B; anticorpul anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpul 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 anticorpul 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 γ de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la doi donatori reprezentativi, D: 55515 și respectiv D: 54024.

Într-un alt studiu, au fost examinate moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART C; anticorpul anti-PD-1: hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpul 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 anticorpul 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 prevăzută 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 γ de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la doi donatori reprezentativi (D: 20990 și respectiv D: 54947).

Într-un studiu suplimentar, a fost examinată eliberarea de citokine IL-2. Specific, au fost examinate moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3: DART D, DART H; anticorpul anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpul 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 anticorpul 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 prevăzută 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 studiul suplimentar, au fost examinate moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3: DART B, și DART I; anticorpul anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), și hPD-1 mAb 7(1,2) IgG4(P); anticorpul 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 anticorpul 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 anticorpilor, fiecare anticorp este prevăzută la concentrația indicată și astfel concentrația totală de anticorp este de două ori concentrația utilizată pentru fiecare anticorp (*adică*, 0,0122, 0,048, 0,18, 0,78, 3,12, 12,5 sau 50 nM). **Figura 20** prezintă profilul secreției de IFN γ de la PBMC-urile stimulate cu SEB de la un donator reprezentativ (D: 56041).

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 utilizând 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 utilizând 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 (începând la 25nM) 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 γ au fost măsurate utilizând ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) în zilele 5-7. **Figurile 21A-D** prezintă profilurile secreției de IFN γ (**Figurile 21A, 21C**) și IL-2 (**Figurile 21B, 21D**) în ziua 7, de la doi donatori reprezentativi (D50702 și D54267).

Rezultatele acestor studii demonstrează că moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 au sporit dramatic producția de IFN γ (**Figurile 16A-16B, 17A-17B, 18A-18B, 20**), și IL-2 (**Figura 19**) de la PBMC-urile stimulate cu SEB după restimulare. În plus, moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 au sporit dramatic producția de IFN γ (**Figurile 21A și 21C**) de la celulele T de memorie CD4 stimulate cu toxoid de tetanus. În particular, moleculele bispecifice PD-1 x LAG-3 tetravalente au furnizat o sporire mai mare decât combinația de anticorpi anti-PD-1 cu anticorpi anti-LAG-3.

Exemplul 9

Farmacocineticile moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3

Farmacocineticile 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 $9,775 \text{ ng/mL}$.

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 farmacocineticile unei molecule bispecifice PD-1 x LAG-3 sunt comparabile cu cele ale unui anticorp anti-PD-1 la maimuța cynomolguss.

Exemplul 10

Studiu toxicologic al anticorpilor PD-1 și moleculelor bispecifice PD-1 x LAG-3

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.

În 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 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 ^a	1 ^a
2A	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 ^a	1 ^a
2B	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 ^b	1 ^b
3A	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 ^a	1 ^a
3B	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 ^b	1 ^b
4	DART I	5	1	5	1	1 ^c	1 ^c
^a 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.							
^b 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.							
^c 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, parametri de patologie clinică (hematologie, coagulare, și chimie clinică), bioanaliza și parametri 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 curbelor 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 posibilă 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 cynomolguss la niveluri de 1 și 100 mg/kg. Un infiltrat limfohistiocitic ușor până la moderat, dependent de doză, al pulpei roșii splenice 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 corporală, temperatura corpului, hematologie, sau parametrii 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 cynomolguss 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 ≥ 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 ≥ 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 ^a	Nivel de dozare (mg/kg)	Volum de dozare (mL/kg)	Doză (mg/mL)	Nr. de animale ^b			
					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

^a Controlul și hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) au fost administrate săptămânal prin perfuzie intravenoasă

^b 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 corporală, examinările fizice, oftalmice, și neurologice, electrocardiologie, temperaturile corporale, ratele respiratorii, presiune sanguină și ritmurile cardiace, coagulare, chimie clinică, și parametrii de urinaliză, greutatea organelor, sau constatări de necropsie brute.

Modificările asociate cu hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) în parametrii hematologici au inclus scăderea tranzitorie a titrurilor de limfocite. Titrurile de limfocite au scăzut moderat în comparație cu pre-studiul (ziua 1 înainte de administrare) în ziua 2 (23 ore după perfuzie) la masculi și femele

la ≥ 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_{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) înaintea apariției ADA, a fost de 0,21 mL/h/kg, substanțial mai scăzută decât rata de filtrare glomerulară a maimuței cynomolguss, 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 interferă 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 cenzurate. 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 parametrii 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_2 , 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 parametrii obținuți de la NCA a primei doze. În absența ADA, simulările au predicat 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 perivascularare 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 ≥ 40 mg/kg și la femele la ≥ 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).

În timp ce invenția a fost descrisă în conexiune cu instanțe specifice ale acesteia, se va înțelege că ea este capabilă de modificări suplimentare și această cerere de brevet este intenționată să acopere variații, utilizări, sau adaptări ale divulgării, după, în general, principiile divulgării și încluzând astfel de abateri de la prezenta divulgare care se încadrează în practica cunoscută sau obișnuită în domeniul la care se referă divulgarea și așa cum se poate aplica caracteristicilor esențiale stabilite aici mai sus.

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> MacroGenic, Inc. Shah, Kalpana Smith, Douglas La Motte-Mohs, Ross Johnson, Leslie Moore, Paul Bonvini, Ezio Koenig, Scott

<120> PD-1-Binding Molecules and Methods of Use Thereof

<130> 1301.0122PCT

<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 patentIn 3.5

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(217)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG1 uman

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(216)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG2 uman

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (216)..(216)

<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

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(217)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG3 uman

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (217)..(217)

<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

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(217)

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG4 uman

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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 IgG1 uman având substituții L234A/L235A

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG1 uman "Knob-Bearing"

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<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

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu CH2-CH3 IgG1 uman "Hole-Bearing"

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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

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> DIFERITE CARATTERISTICI

<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> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(98)

<223> Domeniu CH1 IgG 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

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(12)

<223> Regiune balama IgG2 umană

<400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(12)

<223> Regiune balama IgG4 umană

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Regiune balama IgG4 stabilizată

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<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>

<223> Liant 2 care conține cisteină

<400> 15

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu promotor de heterodimer

<400> 16

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Domeniu promotor de heterodimer
 <400> 17
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5
 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Domeniu promotor de heterodimer
 <400> 18
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Domeniu promotor de heterodimer
 <400> 19
 Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Domeniu promotor de heterodimer
 <400> 20
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5
 <210> 21
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Domeniu (E-spiralat) promotor de heterodimer
 <400> 21

Glu Val Ala Ala Leu 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> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu "K-spiralat" promotor de heterodimer

<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

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu "E-spiralat" promotor de heterodimer 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

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniu "K-spiralat" promotor de heterodimer care conține cisteină

<400> 24

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

<212> PRT

<213> Streptococcus dysgalactiae

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(46)

<223> Domeniul 3 de legare la albumină al Proteinei G de tulpină G148 de Streptococ

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Variantă deimunizată a domeniului de legare la albumină

<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

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Variantă deimunizată a domeniului de legare la albumină

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<210> 28

<211> 46

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Varianta de imunizatã a domeniului de legare la albuminã

<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

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 2 alternativ

<400> 29

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 2 alternativ

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

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

<220>

<223> Liant

<400> 31

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<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

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 2 alternativ

<400> 33

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 2 alternativ

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant

<400> 35

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<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

<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
1				5					10					15	

<210> 38

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(525)

<223> LAG-3 uman (secvență de semnalizare a proteinei mature)

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(28)

<223> Secvență de semnalizare

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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

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

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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(120)

<223> Domeniu variabil al lanțului greu al mAb A LAG-3

<400> 39

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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniu variabil al lanțului ușor al mAb A LAG-3

<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

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul variabil al lanțului greu al mAb 1 LAG-3

<400> 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

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(6)

<223> CDRH1 a mAb 1 LAG-3

<400> 42

Arg Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 1 LAG-3

<400> 43

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu
1 5 10 15
Gly

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRH3 a mAb 1 LAG-3

<400> 44

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(112)

<223> Domeniul VL al mAb 1 LAG-3

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 a mAb 1 LAG-3

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 1 LAG-3

<400> 47

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 1 LAG-3

<400> 48

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 mAb 1 hLAG-3

<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

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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VL1 mAb 1 hLAG-3

<400> 51

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH2 mAb 1 hLAG-3

<400> 50

<400> 53

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 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL4 mAb 1 hLAG-3

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1 a Domeniului VL al VL4 mAb 1 hLAG-3

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(118)

<223> Domeniul VH al mAb 6 LAG-3

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 6 LAG-3

<400> 57

Asp Tyr Asn Met Asp
 1 5

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 6 LAG-3

<400> 58

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

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 6 LAG-3

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
 1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 6 LAG-3

<400> 62

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL3 a mAb 6 LAG-3

<400> 63

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 64

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(113)

<223> Domeniul variabil al lanțului greu al mAb A PD-1

<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

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul variabil al lanțului ușor al mAb A PD-1

<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

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(120)

<223> Domeniul variabil al lanțului greu al mAb B PD-1

<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

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(111)

<223> Domeniul variabil al lanțului ușor al mAb B PD-1

<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

<210> 68

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(288)

<223> Polipeptidă PD-1 umană (secvență NCI NP 005009.2)

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(20)

<223> Secvență semnal PD-1 umană

<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> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(121)

<223> Domeniul VH al mAb 1 PD-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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70

<211> 373

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(373)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 1 PD-1

<400> 70

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc	60
tctgtccctc acctgcactg tcaactgctt 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 tttggactac tggggtcaag gtacctcagt	360
caccgtctcc tcc	373

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(6)

<400> 71

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRH2 a mAb 1 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(12)

<223> CDRH3 a mAb 1 PD-1

<400> 73

Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 74

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(106)

<223> Domeniul VL al mAb 1 PD-1

<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> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(318)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 1 PD-1

<400> 75

```

caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga      120
tctctcccc aaccctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc      180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa      240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg      300
accaagctgg aaataaaa

```

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(10)

<223> CDRL1 a mAb 1 PD-1

<400> 76

Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 1 PD-1

<400> 77

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 1 PD-1

<400> 78

Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 79

<211> 121

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 mAb 1 hPD-1

<400> 79

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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH1 mAb 1 hPD-1

<400> 80

```

gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg      60
acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag      120
cctcccggta aagggctgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat      180
aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttggt      240
ctgacatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat      300
ggttctgggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc      360
tcc                                                                 363

```

<210> 81

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL1 mAb 1 hPD-1

<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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL1 mAb 1 hPD-1

<400> 82

gaaatcgttc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc 60
 attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggg 120
 caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt 180
 ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa 240
 gacgccgcca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc 300
 accaaagtcg aaataaag 318

<210> 83

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(116)

<223> Domeniu VH al mAb 2 PD-1

<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> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(348)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH mAb 2 PD-1

<400> 84

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttgaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
 ccagagaagg ggctggagt ggtcgcatat atcagtagtg gcagtatgag catttctat 180
 gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300
 gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 2 PD-1

<400> 85

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 2 PD-1

<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

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRH3 a mAb 2 PD-1

<400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(112)

<223> Domeniul VL al mAb 2 PD-1

<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

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(336)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 2 PD-1

<400> 89

gatgttgatga tgtcccaaac tccactctoc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gaggcttggt cacagtactg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggttcc taaccgattt 180
 tctgggggtcc ccgacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 a mAb 2 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 2 PD-1

<400> 91

Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 2 PD-1

<400> 92

Ser	Gln	Thr	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 93

<211> 116

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 mAb 2 hPD-1

<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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH1 mAb 2 hPD-1

<400> 94

gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg 60

tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattgggt gcgccaggct 120

cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat 180

gccgacacag tgaaggcag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cactactgtac 240

ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttcctgtct 300

gattacttgc actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc 348

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL1 mAb 2 hPD-1

<400> 95

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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL1 mAb 2 hPD-1

<400> 96

gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccoctgggcca gccagccagt 60

atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg 120

tacctgcaaa aaccagggca gagccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt 180

tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc ggtctggca ctgatttcac actgaaaatc 240

tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc 300

tggacttttg gccaaggtac taagctggaa atcaag 336

<210> 97

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(125)

<223> Domeniul VH al mAb 3 PD-1

<400> 97

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

<210> 98

<211> 375

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(375)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 3 PD-1

<400> 98

caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg	60
tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca	120
cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac	180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctcaa cacagcctac	240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag	300
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg	360
gtcaccgtct cctca	375

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 3 PD-1

<400> 99

Asp Tyr Val Met His

1 5

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 3 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRH3 a mAb 3 PD-1

<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

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(112)

<223> Domeniul VL al mAb 3 PD-1

<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

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(336)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 3 PD-1

<400> 103

gatgttttgc tgacccaaac tccactctoc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ataaagtffc caaccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggffc acatcttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 a mAb 3 PD-1

<400> 104

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 3 PD-1

<400> 105

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 3 PD-1

<400> 106

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 107

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(116)

<223> Domeniul VH al mAb 4 PD-1

<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> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(348)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 4 PD-1

<400> 108

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggctgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 4 PD-1

<400> 109

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 4 PD-1

<400> 110

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRH3 a mAb 4 PD-1

<400> 111

Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(112)

<223> Domeniul VL al mAb 4 PD-1

<400> 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

<210> 113

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(336)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb PD-1

<400> 113

gatgttgatga tgtcccaaac tccactctoc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc	60
atctcctgca gatctagtca gaggcctggt cacagtactg gaaacaccta tttccattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggttcc 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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 a mAb 4 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 4 PD-1

<400> 115

Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 4 PD-1

<400> 116

Ser	Gln	Thr	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 117

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(119)

<223> Domeniul VH al mAb 5 PD-1

<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> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(357)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 5 PD-1

<400> 118

caggccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcctcctt ccgatagtga aacttgggta 180

aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccagc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac 300

tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgca 357

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 5 PD-1

<400> 119

Ala Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 5 PD-1

<400> 120

Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 a mAb 5 PD-1

<400> 121

Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 122

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(111)

<223> Domeniul VL al mAb 5 PD-1

<400> 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 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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 Thr 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

<210> 123

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(333)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 5 PD-1

<400> 123

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180
 ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat 240
 cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa 333

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(15)

<223> CDRL1 a mAb 5 PD-1

<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

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 5 PD-1

<400> 125

Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser
1			5			

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 5 PD-1

<400> 126

Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 127

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(118)

<223> Domeniul VH al mAb 6 PD-1

<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

<210> 128

<211> 333

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(333)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 6 PD-1

<400> 128

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

gggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 6 PD-1

<400> 129

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 6 PD-1

<400> 130

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRH3 a mAb 6 PD-1

<400> 131

Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 132

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(111)

<223> Domeniul VL al mAb 6 PD-1

<400> 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

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

<210> 133

<211> 333

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(333)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 6 PD-1

<400> 133

```

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc      60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc      120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc      180
ggggtcacctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat      240
cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg      300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaatc aaa                                     333
  
```

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(15)

<223> CDRL1 a mAb 6 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 6 PD-1

<400> 135

Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 6 PD-1

<400> 136

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 137

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(119)

<223> Domeniul VH al mAb 7 PD-1

<400> 137

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> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(357)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 7 PD-1

<400> 138

gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc 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 aaggagcac 300

tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc 357

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 7 PD-1

<400> 139

Ser	Tyr	Trp	Met	Asn
1				5

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 7 PD-1

<400> 140

Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Asp

<210> 141

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 a mAb 7 PD-1

<400> 141

Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

<210> 142

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(111)

<223> Domeniul VL al mAb 7 PD-1

<400> 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

<210> 143

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(333)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 7 PD-1

<400> 143

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 144

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(15)

<223> CDRL1 a mAb 7 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 7 PD-1

<400> 145

Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser
1				5		

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 7 PD-1

<400> 146

Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 147

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 mAb 7 hPD-1

<400> 147

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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH1 mAb 7 hPD-1

<400> 148

caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac cgggcgccag tgttaaggtg	60
tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca	120
ccagggcagg gtctggaatg gattgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg	180
gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtogata agtccacaag cactgcttac	240
atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac	300
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc togtaaccgt atcctcc	357

<210> 149

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH2 mAb 7 hPD-1

<400> 149

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH2 mAb 7 hPD-1

<400> 150

caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac cgggcgccag tgtaaggtg 60
 tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120
 ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180
 gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtogata agtcacaag cactgcttac 240
 atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300
 tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc togtaaccgt atcctcc 357

<210> 151

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL1 mAb 7 hPD-1

<400> 151

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
 gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60
 ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120
 cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct 180
 ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240
 tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300
 acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 152

<211> 333

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL1 mAb 7 hPD-1

<400> 152

<210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL2 mAb 7 hPD-1

<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

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL2 mAb 7 hPD-1

<400> 154

```

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact      60
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt      120
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccagc cgcctctaa ccagggatct      180
ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc      240
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat      300
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa                                    333

```

<210> 155

<211> 111

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL3 mAb 7 hPD-1

<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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL3 mAb 7 hPD-1

<400> 156

```

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact      60
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt      120
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg cgcctctaa ccgcggatct      180
gggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc      240
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat      300
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa                                    333

```

<210> 157

<211> 15

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1 a domeniului VL al VL2 mAb 7 hPD-1 și VL3 mAb 7 hPD-1

<400> 157

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL2 a domeniului VL al VL3 mAb 7 hPD-1

<400> 158

Ala	Ala	Ser	Asn	Arg	Gly	Ser													
1				5															

<210> 159

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(113)

<223> Domeniul VH al mAb 8 PD-1

<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

<210> 160

<211> 339

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(339)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 8 PD-1

<400> 160

```

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata      60
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac      120
catgaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatgggtga cactcactac      180
aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac      240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcagatttt      300
gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc                                339

```

<210> 161

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 8 PD-1

<400> 161

```

Asp Tyr Tyr Met Asn
1             5

```

<210> 162

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 8 PD-1

<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

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(4)

<223> CDRH3 a mAb 8 PD-1

<400> 163

Asp Phe Asp Tyr

1

<210> 164

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(112)

<223> Domeniul VL al mAb 8 PD-1

<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

<210> 165

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(336)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 8 PD-1

<400> 165

```

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg      120
ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt      180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca      300
ttcacgttgc gctcggggac aaagttggaa ataaaa                                  336

```

<210> 166

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 a mAb 8 PD-1

<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

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 8 PD-1

<400> 167

```

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1           5

```

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 8 PD-1

<400> 168

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 169

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(119)

<223> Domeniul VH al mAb 9 PD-1

<400> 169

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

<210> 170

<211> 357

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(357)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 9 PD-1

<400> 170

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtgggtggtaa cacctactat 180
 tcagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatggt 300
 ttcgacggcg cctgggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357
 <210> 171

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 9 PD-1

<400> 171

Ser Tyr Leu Val Ser
 1 5

<210> 172

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 9 PD-1

<400> 172

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 a mAb 9 PD-1

<400> 173

Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 174

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul VL al mAb 9 PD-1

<400> 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

<210> 175

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(321)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 9 PD-1

<400> 175

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc statctgcat ctgtgggaga tattgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
 gaaaaatctc ctgagctcct 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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 9 PD-1

<400> 176

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 177

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 9 PD-1

<400> 177

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala
 1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 9 PD-1

<400> 178

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 179

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 mAb 9 hPD-1

<400> 179

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH1 mAb 9 hPD-1

<400> 180

gaggtgcagc tggtagaaag tgggggcggc ctggtgcgac cgggggaag tctgaaactg 60
 tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca 120
 cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180
 agcgacagtg tcaaggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240
 ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300
 ttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaacctg tagctcc 357
 <210> 181

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH2 mAb 9 hPD-1

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH2 mAb 9 hPD-1

<400> 182

gaggtgcagc tgggtgaaag tgggggcggc ctggcgcgac cggggggaag tctgaaactg 60
 tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca 120
 cccggaaaag gcttggaatg gacggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180
 agcgacagtg tcaaggaag attaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240
 ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300
 ttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaacctg tagctcc 357
 <210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRH1 a domeniului VH al VH2 mAb 9 hPD-1 având o substituție de aminoacid serină cu glicină

<400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly
 1 5

<210> 184

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL1 mAb 9 hPD-1

<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> DNA

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL1 mAb 9 hPD-1

<400> 185

```

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc      60
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct      120
ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaaagacc tcgcagctgg cgtgccaagt      180
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc      240
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttgac cttcggacaa      300
ggcactaagc tcgagatcaa a                                             321

```

<210> 186

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL2 mAb 9 hPD-1

<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 VL2 mAb 9 hPD-1

<400> 187

```

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc      60
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctggtatca acagaaacct      120
ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaaagacc tcgcagctgg cgtgccaagt      180
aggttctcag gcagcgggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc      240
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttggac cttcggacaa      300
ggcactaagc tcgagatcaa a                                          321

```

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1a domeniului VL al VL2 mAb 9 hPD-1

<400> 188

```

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala
1           5           10

```

<210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL2 a domeniului VL al VL2 mAb 9 hPD-1

<400> 189

```

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1           5

```

<210> 190

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(116)

<223> Domeniul VH al mAb 10 PD-1

<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> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(348)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 10 PD-1

<400> 191

gaagtgatac tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtgggtg gtggtagtaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggctg attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa 300

ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 192

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 10 PD-1

<400> 192

Asn Tyr Leu Met Ser
1 5

<210> 193

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 10 PD-1

<400> 193

Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 194

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRH3 a mAb 10 PD-1

<400> 194

Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 195

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul VL al mAb 10 PD-1

<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

<210> 196

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(321)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 10 PD-1

<400> 196

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aattttttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag gtagtagcgc ttccgtggac gttcgggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcat a 321

<210> 197

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 10 PD-1

<400> 197

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 10 PD-1

<400> 198

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (19)..()

<223> CDRL3 a mAb 10 PD-1

<400> 199

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 200

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(117)

<223> Domeniul VH al mAb 11 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(351)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH mAb 11 PD-1

<400> 201
 gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct attatcctg gaaatagtga tactcactac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgctac 240
 atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcatct attactgtac tactgggacc 300
 tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca cagtctcctc a 351
 <210> 202

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 11 PD-1

<400> 202

Gly Tyr Trp Met His
1 5

<210> 203

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 11 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(8)

<223> CDRH3 a mAb 11 PD-1

<400> 204

Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 205

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(106)

<223> Domeniul VL al mAb 11 PD-1

<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

<211> 318

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(318)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 11 PD-1

<400> 206

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60
 ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcacagaaca 120
 aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180
 aggttttagtg gcagtgatc agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 240
 gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacggt cggtgctggg 300
 accaagctgg agctgaaa 318

<210> 207

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 11 PD-1

<400> 207

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 208

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 11 PD-1

<400> 208

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 209

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(8)

<223> CDRL3 a mAb 11 PD-1

<400> 209

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr
1 5

<210> 210

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(125)

<223> Domeniul VH al mAb 12 PD-1

<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> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(375)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 12 PD-1

<400> 211

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcactgggt gaaacagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300

attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 212

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<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

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(336)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 12 PD-1

<400> 216

gatgttttga tgaccocagac tocactctoc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct gcaaagtffc cacccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggffc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 a mAb 12 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 12 PD-1

<400> 218

Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser
 1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 12 PD-1

<400> 219

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 220

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(121)

<223> Domeniul VH al mAb 13 PD-1

<400> 220

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> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(363)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 13 PD-1

<400> 221

```

---
gaagtgatgc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact      120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggttctaa tatctactat      180
ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac      240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct      300
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc      360
tcc
  
```

<210> 222

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 13 PD-1

<400> 222

Ser His Thr Met Ser
1 5

<210> 223

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 13 PD-1

<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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(12)

<223> CDRH3 a mAb 13 PD-1

<400> 224

Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 225

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul VL al mAb 13 PD-1

<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

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(321)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 13 PD-1

<400> 226

gacattcaga tgaccagtc tctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60
 atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa tttctttca agatcagcag cctacaggct 240
 gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 227

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 13 PD-1

<400> 227

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 228

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

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 Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 229

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 13 PD-1

<400> 229

Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 230

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(117)

<223> Domeniul VH al mAb 14 PD-1

<400> 230

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 13 PD-1

<400> 228

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

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(351)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 14 PD-1

<400> 231

cagggtccaac	tgacagcagcc	tggggctgag	cttgtgaagc	ctggggcttc	agtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggcta	caacttcac	agctactgga	taacctgggt	gaaacagagg	120
cctggacaag	gccttcagtg	gattgaaat	atttatcctg	gtactgatgg	tactacctac	180
aatgagaagt	tcaagagcaa	ggccacactg	actgtagaca	catcctccag	cacagcctac	240
atgcacctca	gtcgcctgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aactgggcta	300
cactggtact	tcgatgtctg	gggcacaggg	accacgggtca	ccgtctcctc	c	351

<210> 232

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 14 PD-1

<400> 232

Ser Tyr Trp Ile Thr
1 5

<210> 233

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 14 PD-1

<400> 233

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 234

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(8)

<223> CDRH3 a mAb 14 PD-1

<400> 234

Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 235

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul VL al mAb 14 PD-1

<400> 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

<210> 236

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(321)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 14 PD-1

<400> 236

```

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt      60
gtcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaagccc      120
ggccaatctc ctaaagcact gatttactog gcatcctccc gattcagtgg cgtccctgat      180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagtaa tgtgcagtct      240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa a                                              321
    
```

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 14 PD-1

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

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(351)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VH al mAb 15 PD-1

<400> 241

gaagtgatgc tggatggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgtgcc attagtgggt gtggtgctga cacctactat 180

gccgacagtg tgaagggctc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg 300

acctatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtc cogtctcctc c 351

<210> 242

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 a mAb 15 PD-1

<400> 242

Ser Tyr Leu Ile Ser
1 5

<210> 243

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 a mAb 15 PD-1

<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

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(8)

<223> CDRH3 a mAb 15 PD-1

<400> 244

Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 245

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(107)

<223> Domeniul VL al mAb 15 PD-1

<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

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(321)

<223> Polinucleotidă care codifică domeniul VL al mAb 15 PD-1

<400> 246

gacattcaga tgaccagtc tcccgctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60
 atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatggtag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gtagtggatc tggcacaata tttctttca agatcagcag cctacaggct 240
 gaagattttg taaattatta ctgtcaaaa ctttacagta ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 247

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 a mAb 15 PD-1

<400> 247

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 248

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 a mAb 15 PD-1

<400> 248

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 249

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 a mAb 15 PD-1

<400> 249

Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 250

<211> 117

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 hmAb 15 PD-1

<400> 250

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VH1 hmAb 15 PD-1

<400> 251

gaagtgaac tggttgaaag tggcgcgagg ctggtgcggc caggtggttc actcagactg 60
 tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta tctcttgggt gcgccaagcc 120
 ccagtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat 180
 gccgacagcg tcaagggacg tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac 240
 ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc cggcgcgagg 300
 acttacgcta tggactattg gggccagggc accttgggtca ctgtctcatc c 351

<210> 252

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL1 hmAb 15 PD-1

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Polinucleotidă care codifică VL1 hmAb 15 PD-1

<400> 253

gatatccaga tgaccagtc tcccagctct ctcaagtcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc 60

atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg cctggatca gcagaaacct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tcgcagatgg agtgccctcc 180

cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag 300

ggtactaaac tggagatcaa a 321

<210> 254

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț greu al anticorpului IgG1 umanizat

<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
 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
 145 150 155 160

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
 225 230 235 240

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

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
 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

<210> 257

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DIFERITE CARATTERISTICI

<222> (1)..(98)

<223> Domeniu CH1 al IgG2 uman

<400> 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>

<223> Secvență IgG1 pentru domeniile CH2 și CH3

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<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

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Secvență IgG4 pentru domeniile CH2 și CH3

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (217)..(217)

<223> Xaa este o lizină (K) sau este absent

<400> 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

<210> 260

<211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniile CH2 și CH3 ale variantelor IgG1 de tip sălbatic și umană

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (4)..(5)

<223> Xaa4 și Xaa5 sunt ambele L (de tip sălbatic), sau sunt ambele A (legare FcgamaR scăzută)

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<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 înjumătățire extinsă)

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (136)..(177)

<223> Xaa136, Xaa138, și respectiv Xaa177 sunt: T, L și Y (de tip sălbatic), sau sunt W, L și Y (nod), sau S, A și V (gaură)

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (204)..(205)

<223> Xaa204 și respectiv Xaa205 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)

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (217)..(217)

<223> Xaa217 este K sau este absent

<400> 260

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

<211> 6

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Liant 2 alternativ

<400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 262

<211> 11

<212> PRT

<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

<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

<210> 264

<211> 218

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț ușor al anticorpului PD-1 umanizat (mAb 7(1,2) hPD-1)

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Heavy Chain of a Humanized Antibody ((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

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 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 Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Lanț greu al anticorpului umanizat (mAb 7(1,2) hPD-1)

<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
 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Prima și a treia catenă de polipeptide ale DART A

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (34)..(34)

<223> Xaa34 este A sau G

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (307)..(307)

<223> Xaa307 este Y sau M

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (309)..(309)

<223> Xaa309 este T sau S

<220>

<221> DIFERITE CARACTERISTICI

<222> (311)..(311)

<223> Xaa311 este E sau T

<400> 267

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
 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 Glu Val Ala Ala Cys 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 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300

Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 370 375 380

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 405 410 415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

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 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
 <210> 269

<211> 571<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Prima și a treia catenă de polipeptide ale DART D

<400> 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

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
385 390 395 400

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> 270

<211> 352

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a patra catenă de polipeptide ale DART D

<400> 270

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
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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Prima și a treia catenă de polipeptide ale 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 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90

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
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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a patra catenă de polipeptide ale DART E

<400> 272

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
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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Prima catenă de polipeptidă a 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

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 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

<210> 274

<211> 218

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a cincea catenă de polipeptide ale DART F

<400> 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A treia catenă de polipeptide a 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

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 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 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

<210> 276

<211> 273

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A patra catenă de polipeptide a DART F

<400> 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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Prima catenă de polipeptide a 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a cincea catenă de polipeptide ale DART G

<400> 278

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A treia catenă de polipeptide a DART G

<400> 279

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

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 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A patra catenă de polipeptide a DART G

<400> 280

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> Prima catenă de polipeptide a DART H

<400> 281

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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua catenă de polipeptide a 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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A treia catenă de polipeptid a DART H

<400> 283

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

<400> 284

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 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
 145 150 155 160

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

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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a patra catenă de polipeptide ale 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

<400> 286

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 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

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> A treia catenă de polipeptide a BSAB A

<400> 288

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
 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A patra catenă de polipeptide a BSAB A

<400> 289

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> 290

<211> 496

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Prima și a treia catenă de polipeptide ale 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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a patra catenă de polipeptide ale DART I

<400> 291

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> Prima și a treia catenă de polipeptide ale DART J

<400> 292

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> A doua și a patra catenă de polipeptide ale 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

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH1 mAb 6 hLAG-3

<400> 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

<210> 295

<211> 118

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VH al VH2 mAb 6 hLAG-3

<400> 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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL1 mAb 6 hLAG-3

<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

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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Domeniul VL al VL2 mAb 6 hLAG-3

<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

<213> Secvență artificială

<220>

<223> CDRL1 a domeniului VL al VL1 și VL2 mAb 6 hLAG-3

<400> 298

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
1 5 10