

ANTICUERPOS ANTI-PD1 Y SUS MÉTODOS DE USO

1. CAMPO

[0001] La presente invención está relacionada con anticuerpos que se unen específicamente a la PD-1 humana y con métodos para usarlos.

2. ANTECEDENTES

[0002] La proteína de la muerte celular programada 1 (PD-1) es un miembro inhibidor de la familia de receptores CD28. La PD-1 se expresa en las células activadas B, las células T y las células mieloides (Agata y col. (1996), *Int. Immunol.*, 8:765-72; Okazaki y col. (2002), *Curr. Opin. Immunol.*, 14:391-779-82; Bennett y col. (2003), *J. Immunol.*, 170:711-8). La PD-1 es una proteína transmembrana tipo I de 55 kDa que forma parte de la superfamilia de genes de la Ig y que contiene un motivo inhibidor de los inmunoreceptores de tirosina próximo a la membrana (ITIM) y un motivo interruptor basado en tirosina alejado de la membrana (ITSM) (Thomas, M.L. (1995), *J. Exp. Med.*, 181:1953-6; Vivier, E., y Daeron, M. (1997), *Immunol. Today.*, 18:286-91). Se han identificado dos ligandos de la PD-1, PD-L1 y PD-L2, y se ha demostrado que regulan negativamente la activación de las células T al unirse a la PD-1 (Freeman y col. (2000), *J. Exp. Med.*, 192:1027-1034; Latchman y col. (2001), *Nat. Immunol.*, 2:261-8; Carter y col. (2002), *Eur. J. Immunol.*, 32:634-43). La PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (Dong y col. (2002), *Nat. Med.*, 8:787-9). La interacción entre la PD-1 y el PD-L1 provoca una disminución en la cantidad de linfocitos que infiltran los tumores, una disminución en la proliferación de las células T mediada por receptores y la evasión inmune de las células cancerosas (Dong y col. (2003), *J. Mol. Med.*, 81:281-7; Blank y col. (2005), *Cancer. Immunol. Immunother.*, 54:307-314; Konishi y col. (2004), *Clin. Cancer. Res.*, 10:5094-100). Esta supresión inmune puede ser revertida mediante la inhibición de la interacción local entre la PD-1 y el PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción entre la PD-1

y el PD-L1 es bloqueada de esta manera (Iwai y col. (2002), Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA., 99:12293-7; Brown y col. (2003), J. Immunol., 170:1257-1266).

[0003] La PD-1 es una molécula inhibidora de las células inmunes. En los animales deficientes en la PD-1, se desarrollan fenotipos autoinmunes como una cardiomiopatía autoinmune o un síndrome similar al lupus con artritis y nefritis (Nishimura y col. (1999), Immunity, 11:141-51; Nishimura y col. (2001), Science, 291:319-22). Además, se ha determinado que la PD-1 participa en la encefalomiелitis autoinmune, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad del injerto contra huésped (GVHD), la diabetes tipo I y la artritis reumática (Salama y col. (2003), J. Exp. Med., 198:71-78; Prokunina y Alarcón-Riquelme (2004), Hum. Mol. Genet., 13:R143; Nielsen y col. (2004), Lupus, 13:510). En una línea de tumores de células B murinas, se ha demostrado que el ITSM de PD-1 es esencial para bloquear el flujo del Ca^{2+} y la fosforilación de las moléculas efectoras ulteriores mediada por BCR (Okazaki y col. (2001), PNAS, 98:13866-71).

[0004] Teniendo en cuenta el papel de la PD-1 humana en la modulación de la respuesta inmune, los agentes terapéuticos diseñados para antagonizar la señalización de la PD-1 son muy prometedores para el tratamiento de las enfermedades donde hay una supresión inmune mediada por la PD-1.

3. RESUMEN

[0005] En presente la invención se proveen anticuerpos que se unen específicamente a la PD-1 humana y antagonizan su función, por ejemplo, la supresión inmune mediada por la PD-1. También se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que los codifican, vectores de expresión y células huésped para elaborarlos y métodos para tratar sujetos en los que se los emplea. Los anticuerpos que se describen en la presente son particularmente útiles para incrementar la activación de las células T en respuesta a un antígeno (por ejemplo, un antígeno tumoral o un antígeno de

una enfermedad infecciosa) y/o para disminuir la supresión inmune mediada por las Treg, y por lo tanto, para tratar un cáncer en un sujeto o para prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto.

[0006] Por consiguiente, en una invención, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH (SEQ ID N° 1); (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID N° 32), donde X₁ es Y o F; X₂ es K o E; y X₃ es K o M; (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos NX₁DX₂ (SEQ ID N° 33), donde X₁ es G o V; y X₂ es H o Y; (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSNLA (SEQ ID N° 4); (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos GASTRAT (SEQ ID N° 5); y (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYNNWPRT (SEQ ID N° 6).

[0007] En determinadas formas de realización, CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 2 y 34-36.

[0008] En determinadas formas de realización, CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 3, 7 y 37.

[0009] En determinadas formas de realización, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, que se detallan en SEQ ID N° 1, 2 y 3; 1, 2 y 7; 1, 2 y 37; 1, 34 y 7; 1, 35 y 7; o 1, 36 y 7.

[0010] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región

variable de la cadena liviana que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos que se detallan en SEQ ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

[0011] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos que se detallan en SEQ ID N° 1, 2, 7, 4, 5 y 6, respectivamente.

[0012] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 49.

[0013] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 17 y 26-31. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 17 y 26-31. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 15. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 17. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 27. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 28. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 29. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 30. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 31. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 18. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 21. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 20. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 22. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 23. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 24. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 25. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 52. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 53. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 54. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 55. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 56. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 57. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 58.

[0014] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGHV3-33 (por ejemplo, IGHV3-33*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 50).

[0015] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0016] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGKV3-15 (por ejemplo, IGKV3-15*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 51).

[0017] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una variable región de la cadena liviana,

donde la región variable de la cadena pesada y la variable región de la cadena liviana, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos que se detallan en SEQ ID N° 15 y 16; 17 y 16; 26 y 16; 27 y 16; 28 y 16; 29 y 16; 30 y 16; o 31 y 16.

[0018] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 15 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0019] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 17 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0020] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0021] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 27 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0022] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 28 y

(b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0023] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 29 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0024] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 30 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0025] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGHV3-33 (por ejemplo, IGHV3-33*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 50) y (b) una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGKV3-15 (por ejemplo, IGKV3-15*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 51).

[0026] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 31 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0027] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende una región variable de la

cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 17 y 26-31.

[0028] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0029] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 18; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0030] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 20; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0031] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 21; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0032] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 22; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0033] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 23; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0034] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 52; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0035] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 53; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0036] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 54; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0037] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 55; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0038] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 56; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0039] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYGMH (SEQ ID N° 1); (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID N° 32), donde X₁ es Y o F; X₂ es K o E; y X₃ es K o M; (c) CDRH3

comprende la secuencia de aminoácidos NX_1DX_2 (SEQ ID N° 33), donde X_1 es G o V; y X_2 es H o Y; (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSNLA (SEQ ID N° 4); (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos GASTRAT (SEQ ID N° 5); y (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYNNWPRT (SEQ ID N° 6).

[0040] En determinadas formas de realización, CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 2 y 34-36.

[0041] En determinadas formas de realización, CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 3, 7 y 37.

[0042] En determinadas formas de realización, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, que se detallan en SEQ ID N° 1, 2 y 3; 1, 2 y 7; 1, 2 y 37; 1, 34 y 7; 1, 35 y 7; o 1, 36 y 7.

[0043] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos que se detallan en SEQ ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

[0044] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones de determinación de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos que se detallan en SEQ ID N° 1, 2, 7, 4, 5 y 6, respectivamente.

[0045] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 49.

[0046] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 17 y 26-31. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 17 y 26-31. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 15. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 17. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 27. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 28. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 29. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 30. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 31. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 18. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 21. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 20. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 22. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 23. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 24. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 25. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 52. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 53. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 54. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 55. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 56. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 57. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 58.

[0047] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que

deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGHV3-33 (por ejemplo, IGHV3-33*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 50).

[0048] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0049] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGKV3-15 (por ejemplo, IGKV3-15*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 51).

[0050] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una variable región de la cadena liviana, donde la región variable de la cadena pesada y la variable región de la cadena liviana, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos que se detallan en SEQ ID N° 15 y 16; 17 y 16; 26 y 16; 27 y 16; 28 y 16; 29 y 16; 30 y 16; o 31 y 16.

[0051] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 15 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0052] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana,

que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 17 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0053] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0054] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 27 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0055] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 28 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0056] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 29 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0057] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 30 y (b) una región variable de la

cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0058] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 31 y (b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0059] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGHV3-33 (por ejemplo, IGHV3-33*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 50) y (b) una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos que deriva de una secuencia de la línea germinal humana IGKV3-15 (por ejemplo, IGKV3-15*01, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 51).

[0060] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 15, 17 y 26-31.

[0061] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

[0062] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID N° 18; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0063] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 20; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0064] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 21; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0065] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 22; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0066] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 23; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0067] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 52; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0068] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 53; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0069] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 54; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0070] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 55; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0071] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une específicamente a la PD-1 humana, que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 56; y (b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 19.

[0072] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que compite por la unión a la PD-1 humana con cualquiera de los anticuerpos que se describen en la presente. En otra forma de realización en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une, por ejemplo, se une específicamente, al mismo epítipo de la PD-1 humana que cualquiera de los anticuerpos que se describen en la presente.

[0073] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un

anticuerpo que se une, por ejemplo, se une específicamente, a un epítopo de la PD-1 humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 107-122 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 107-122 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 5-22 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 5-22 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 6-15 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 6-15 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 130-138 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 130-138 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 106-113 de SEQ ID N° 74. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 106-113 de SEQ ID N° 74.

[0074] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo que, una vez que se une a la proteína PD-1 humana y se agrega deuterio, da como resultado una sustitución del hidrógeno en la proteína PD-1 humana por deuterio, en una región que comprende residuos 107-122 de SEQ ID

Nº 74, que es sustancialmente menor que la sustitución del hidrógeno por deuterio en la misma región de la proteína PD-1 humana en ausencia del anticuerpo, determinada en función de la sustitución de hidrógeno por deuterio. En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo que, una vez que se une a la proteína PD-1 humana y se agrega deuterio, da como resultado una sustitución del hidrógeno en la proteína PD-1 humana por deuterio, en una región que comprende residuos 5-22 de SEQ ID Nº 74, que es sustancialmente menor que la sustitución del hidrógeno por deuterio en la misma región de la proteína PD-1 humana en ausencia del anticuerpo, determinada en función de la sustitución de hidrógeno por deuterio.

[0075] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une, por ejemplo, se une específicamente, al mismo epítipo de la PD-1 humana que cualquiera de los anticuerpos de la presente invención. En una forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 107-122 de SEQ ID Nº 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 107-122 de SEQ ID Nº 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 5-22 de SEQ ID Nº 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 5-22 de SEQ ID Nº 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 6-15 de SEQ ID Nº 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 6-15 de SEQ ID Nº 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1

humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 130-138 de SEQ ID N° 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 130-138 de SEQ ID N° 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 106-113 de SEQ ID N° 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que consiste en los residuos 106-113 de SEQ ID N° 74. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se une a un epítipo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 6-15 de SEQ ID N° 74 y/o un epítipo de la PD-1 humana que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 130-138 de SEQ ID N° 74 y/o que comprende, consiste esencialmente o consiste en los residuos 106-113 de SEQ ID N° 74. La unión a un epítipo preferiblemente se determina con un análisis Pepscan, particularmente como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, la unión a la secuencia de más de uno de los epítipos de la PD-1 humana puede ocurrir en el caso de los epítipos discontinuos.

[0076] En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une, por ejemplo, se une específicamente, al mismo epítipo de la PD-1 humana que cualquiera de los anticuerpos de la presente invención y que, una vez que se une a la proteína PD-1 humana y se agrega deuterio, da como resultado una sustitución del hidrógeno en la proteína PD-1 humana por deuterio, en una región que comprende residuos 107-122 de SEQ ID N° 74, que es sustancialmente menor que la sustitución del hidrógeno por deuterio en la misma región de la proteína PD-1 humana en ausencia del anticuerpo, determinada en función de la sustitución de hidrógeno por deuterio. En otra forma de realización, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une, por ejemplo, se une

específicamente, al mismo epítopo de la PD-1 humana que cualquiera de los anticuerpos de la presente invención y que, una vez que se une a la proteína PD-1 humana y se agrega deuterio, da como resultado una sustitución del hidrógeno en la proteína PD-1 humana por deuterio, en una región que comprende residuos 5-22 de SEQ ID N° 74, que es sustancialmente menor que la sustitución del hidrógeno por deuterio en la misma región de la proteína PD-1 humana en ausencia del anticuerpo, determinada en función de la sustitución de hidrógeno por deuterio. En una forma de realización más preferida, una vez que el anticuerpo se une a la proteína PD-1 humana y se agrega deuterio, da como resultado una sustitución del hidrógeno en la proteína PD-1 humana por deuterio, en una región que comprende residuos 107-122 de SEQ ID N° 74, que es sustancialmente menor que la sustitución del hidrógeno por deuterio en la misma región de la proteína PD-1 humana en ausencia del anticuerpo, determinada en función de la sustitución de hidrógeno por deuterio, y una vez que el anticuerpo se une a la proteína PD-1 humana y se agrega deuterio, da como resultado una sustitución del hidrógeno en la proteína PD-1 humana por deuterio, en una región que comprende residuos 5-22 de SEQ ID N° 74, que es sustancialmente menor que la sustitución del hidrógeno por deuterio en la misma región de la proteína PD-1 humana en ausencia del anticuerpo, determinada en función de la sustitución de hidrógeno por deuterio. Por ejemplo, la unión a la secuencia de más de uno de los epítopos de la PD-1 humana puede ocurrir en el caso de los epítopos discontinuos.

[0077] En otro aspecto, en la presente invención se provee un anticuerpo o un anticuerpo aislado que se une, por ejemplo, se une específicamente, al mismo epítopo de la PD-1 humana que cualquier anticuerpo de la presente invención, donde el epítopo se determina a partir de la sustitución del hidrógeno por deuterio (HDX), particularmente como se describe en los ejemplos, o mediante un análisis

Pepscan, particularmente como se describe en los ejemplos, más preferiblemente a partir de la sustitución del hidrógeno por deuterio.

[0078] Las siguientes formas de realización se aplican a todos los aspectos precedentes.

[0079] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada que se selecciona del grupo que consiste en la IgG₁, la IgG₂, la IgG₃, la IgG₄, la IgA₁ y la IgA₂ humanas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana que carece de una unidad de glucano en la posición N297, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana que comprende una mutación N297A, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana que comprende una mutación N297Q, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana que comprende una mutación D265A, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG₄ humana que comprende una mutación S228P, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

[0080] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana salvaje, donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une a

un receptor Fc humano con una afinidad menor que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana salvaje. En determinadas formas de realización, el receptor Fc humano es un FcγR. En determinadas formas de realización, el FcγR es FcγRIIB. En determinadas formas de realización, el FcγR se expresa en una célula que se selecciona del grupo que consiste en las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, los granulocitos, las células B y las células asesinas naturales. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana es una variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana, la IgG₂ humana o la IgG₄ humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana que se selecciona del grupo que consiste en la IgGκ y la IgGλ humanas.

[0081] En determinadas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es un antagonista de la PD-1 humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo desactiva, disminuye o elimina una actividad de la PD-1 humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo inhibe la unión entre la PD-1 humana y el PD-L1 o el PD-L2 humano. En determinadas formas de realización, el anticuerpo incrementa la producción de IL-2 en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) estimuladas con la enterotoxina de los estafilococos A (SEA). En determinadas formas de realización, el anticuerpo incrementa la producción de IFNγ en un cocultivo de células T humanas T y células dendríticas alogénicas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo incrementa la proliferación de células las T CD4⁺ o CD8⁺ estimuladas con anticuerpos anti-CD3 cocultivadas con fluido ascítico de cáncer de ovario. En determinadas formas de realización, el anticuerpo incrementa la señalización de NFAT en las células indicadoras con NFAT-luciferasa donde se expresa la PD-1 cocultivadas con

células blanco donde se expresa el PD-L1.

[0082] En determinadas formas de realización, un anticuerpo de la presente invención está conjugado con un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina, un radionucleido o una marca detectable.

[0083] En otro aspecto, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0084] En otro aspecto, en la presente invención se provee un polinucleótido o un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo de la presente invención. En otro aspecto, en la presente invención se provee un vector que comprende este polinucleótido. En aún otro aspecto, en la presente invención se provee una célula huésped recombinante que comprende este polinucleótido o este vector. En un aspecto adicional, en la presente invención se provee un método para producir un anticuerpo que se une a la PD-1 humana, que comprende cultivar una célula huésped de manera tal de expresar el polinucleótido y producir el anticuerpo. En una forma de realización preferida, el método es un método in vitro.

[0085] En una forma de realización, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, una composición farmacéutica, un polinucleótido, un vector o una célula huésped recombinante de la invención que pueden usarse como medicamentos.

[0086] En una forma de realización, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, una composición farmacéutica, un polinucleótido, un vector o una célula huésped recombinante de la invención que pueden usarse en el diagnóstico.

[0087] En una forma de realización, la presente invención está relacionada con el uso de un anticuerpo de la presente invención en la preparación de

composiciones farmacéuticas o medicamentos para la inmunoterapia. Preferiblemente, la inmunoterapia es para incrementar la actividad de las células T, opcionalmente para tratar un cáncer o para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa.

[0088] En otro aspecto, en la presente invención se provee un método para incrementar la activación de las células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica de la presente invención.

[0089] En otro aspecto, en la presente invención se provee un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en el melanoma, el cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, el cáncer escamoso de cabeza y cuello), el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer en las células pulmonares no pequeñas o el cáncer en las células pulmonares pequeñas), el cáncer de mama (por ejemplo, el cáncer de mama resistente a la herceptina o el cáncer de mama resistente al trastuzumab-DM1 (T-DM1)), el cáncer de próstata, el glioblastoma multiforme, el cáncer colorrectal, el sarcoma, el cáncer de vejiga, el cáncer cervical, los cánceres asociados al HPV, los cánceres en la vagina, los cánceres en la vulva, los cánceres en el pene, los cánceres en el ano, los cánceres en el recto, los cánceres en la orofaringe, el mieloma múltiple, el carcinoma de las células renales, el cáncer de ovario, el cáncer hepatocelular, el cáncer de endometrio, el cáncer de páncreas, el linfoma y la leucemia (por ejemplo, la leucemia en los ancianos, la leucemia mieloide aguda (LMA) o la LMA en los ancianos). En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administran por vía subcutánea o intravenosa. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la

composición farmacéutica se administran por vía intratumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administran en un ganglio linfático que drena un tumor. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administran por vía intraarterial.

[0090] En un aspecto, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención que pueden usarse en un método para incrementar la activación de las células T en respuesta a un antígeno.

[0091] En un aspecto, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención que pueden usarse en un método para incrementar la activación de las células T en respuesta a un antígeno en un sujeto.

[0092] En un aspecto, la presente invención está relacionada con el uso de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para incrementar la activación de las células T en respuesta a un antígeno en un sujeto.

[0093] En un aspecto, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención que pueden usarse en un método para incrementar la activación de las células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención.

[0094] En un aspecto, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención que pueden usarse en un método para

tratar un cáncer, donde el cáncer preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en el melanoma, el cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, el cáncer escamoso de cabeza y cuello), el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer en las células pulmonares no pequeñas o el cáncer en las células pulmonares pequeñas), el cáncer de mama (por ejemplo, el cáncer de mama resistente a la herceptina o el cáncer de mama resistente al trastuzumab-DM1 (T-DM1)), el cáncer de próstata, el glioblastoma multiforme, el cáncer colorrectal, el sarcoma, el cáncer de vejiga, el cáncer cervical, los cánceres asociados al HPV, los cánceres en la vagina, los cánceres en la vulva, los cánceres en el pene, los cánceres en el ano, los cánceres en el recto, los cánceres en la orofaringe, el mieloma múltiple, el carcinoma de las células renales, el cáncer de ovario, el cáncer hepatocelular, el cáncer de endometrio, el cáncer de páncreas, el linfoma y la leucemia (por ejemplo, la leucemia en los ancianos, la leucemia mieloide aguda (LMA) o la LMA en los ancianos).

[0095] En un aspecto, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención que pueden usarse en un método para tratar un cáncer en un sujeto, donde el cáncer preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en el melanoma, el cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, el cáncer escamoso de cabeza y cuello), el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer en las células pulmonares no pequeñas o el cáncer en las células pulmonares pequeñas), el cáncer de mama (por ejemplo, el cáncer de mama resistente a la herceptina o el cáncer de mama resistente al trastuzumab-DM1 (T-DM1)), el cáncer de próstata, el glioblastoma multiforme, el cáncer colorrectal, el sarcoma, el cáncer de vejiga, el cáncer cervical, los cánceres asociados al HPV, los cánceres en la vagina, los cánceres en la vulva, los cánceres en el pene, los cánceres en el ano, los cánceres en el recto, los cánceres en la orofaringe, el

mieloma múltiple, el carcinoma de las células renales, el cáncer de ovario, el cáncer hepatocelular, el cáncer de endometrio, el cáncer de páncreas, el linfoma y la leucemia (por ejemplo, la leucemia en los ancianos, la leucemia mieloide aguda (LMA) o la LMA en los ancianos).

[0096] En un aspecto, la presente invención está relacionada con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención que pueden usarse en un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención, donde el cáncer preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en el melanoma, el cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, el cáncer escamoso de cabeza y cuello), el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer en las células pulmonares no pequeñas o el cáncer en las células pulmonares pequeñas), el cáncer de mama (por ejemplo, el cáncer de mama resistente a la herceptina o el cáncer de mama resistente al trastuzumab-DM1 (T-DM1)), el cáncer de próstata, el glioblastoma multiforme, el cáncer colorrectal, el sarcoma, el cáncer de vejiga, el cáncer cervical, los cánceres asociados al HPV, los cánceres en la vagina, los cánceres en la vulva, los cánceres en el pene, los cánceres en el ano, los cánceres en el recto, los cánceres en la orofaringe, el mieloma múltiple, el carcinoma de las células renales, el cáncer de ovario, el cáncer hepatocelular, el cáncer de endometrio, el cáncer de páncreas, el linfoma y la leucemia (por ejemplo, la leucemia en los ancianos, la leucemia mieloide aguda (LMA) o la LMA en los ancianos).

[0097] En una forma de realización preferida del uso de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención, el anticuerpo, el polinucleótido, el vector, la célula

huésped recombinante y/o la composición farmacéutica, más preferiblemente el anticuerpo o la composición farmacéutica, se administran por vía subcutánea o intravenosa. En otra forma de realización preferida de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención, el anticuerpo, el polinucleótido, el vector, la célula huésped recombinante y/o la composición farmacéutica, más preferiblemente el anticuerpo o la composición farmacéutica, se administran por vía intratumoral o intraarterial.

[0098] En determinadas formas de realización, los métodos anteriores también comprenden administrarle un agente terapéutico adicional al sujeto. Por lo tanto, en una forma de realización preferida del uso de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica en un método de la presente invención, el método también comprende administrarle un agente terapéutico adicional al sujeto.

[0099] En un aspecto, la presente invención está relacionada con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención y (b) un agente terapéutico adicional, que pueden usarse como medicamentos.

[00100] En un aspecto, la presente invención está relacionada con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención y (b) un agente terapéutico adicional, que pueden usarse en un método para tratar un cáncer.

[00101] En un aspecto, la presente invención está relacionada con una composición farmacéutica, un conjunto de elementos o un conjunto de partes que comprenden (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención y (b) un agente terapéutico adicional.

[00102] En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente dirigido a los puntos de verificación. En determinadas formas de realización, el agente dirigido a los puntos de verificación se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo antagonista anti-PD-1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L2, un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4, un anticuerpo antagonista anti-TIM-3, un anticuerpo antagonista anti-LAG-3, un anticuerpo antagonista anti-CEACAM1, un anticuerpo antagonista anti-TIGIT, un anticuerpo agonista anti-CD137, un anticuerpo agonista anti-ICOS, un anticuerpo agonista anti-GITR y un anticuerpo agonista anti-OX40. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). En determinadas formas de realización, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en epacadostat, F001287, indoximod y NLG919. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una vacuna. En determinadas formas de realización, la vacuna comprende un complejo de péptidos y proteínas de choque térmico (HSPPC) que comprende una proteína de choque térmico en un complejo con un péptido antigénico. En determinadas formas de realización, la proteína de choque térmico es hsc70 y está en un complejo con un péptido antigénico asociado a un tumor. En determinadas formas de realización, la proteína de choque térmico es la proteína gp96 y está en un complejo con un péptido antigénico asociado a un tumor, donde el HSPPC deriva de un tumor obtenido de un sujeto. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional comprende un TCR. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un TCR soluble. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una célula donde se expresa un TCR. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una célula donde se expresa un receptor de antígenos

quimérico. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de péptidos-MHC. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un coadyuvante. En un aspecto, la presente invención está relacionada con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención, así como su uso en la preparación de medicamentos, y (b) una vacuna que puede usarse como medicamento, particularmente en un método para tratar un cáncer, donde la vacuna preferiblemente comprende un complejo de péptidos y proteínas de choque térmico (HSPPC) que comprende una proteína de choque térmico en un complejo con un péptido antigénico. En un aspecto, la presente invención está relacionada con una composición farmacéutica, un conjunto de elementos o un conjunto de partes que comprenden (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención y (b) una vacuna, donde la vacuna preferiblemente comprende un complejo de péptidos y proteínas de choque térmico (HSPPC) que comprende una proteína de choque térmico en un complejo con un péptido antigénico.

4. DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[00103] Las Figuras 1A, 1B, 1C, y 1D son gráficos que muestran la unión de los anticuerpos anti-PD-1 a células T primarias activadas de humano o cinomólogas medido por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó y se graficó contra un rango de concentraciones de anticuerpo. En la Figura 1A, se midió la unión de AGEN2046w, AGEN2047w, y un control de isotipo de IgG₁ humana a células T CD4⁺ de humano estimuladas por Enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). El AGEN2034w y un control de isotipo de IgG₄ humana se ensayaron contra células T CD4⁺ humanas estimuladas con SEA (Figuras 1B y 1D) y células T CD4⁺ de cinomólogo estimuladas con Enterotoxina B de

Staphylococcus (SEB) (Figura 1C).

[00104] La Figura 2 es un gráfico que muestra la unión de AGEN2034w a PD-1-Fc humano, ROBO2-Fc humano, B7-H7-Fc humano, o SIRPy-His. La interacción se midió por tecnología de arreglo en suspensión y se grafica la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) respecto a las concentraciones de anticuerpo.

[00105] Las Figuras 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, y 3F son gráficos que muestran el porcentaje de unión de PD-L1-Fc y/o PD-L2-Fc recombinante a esferas acopladas a PD-1 en presencia de una titulación de dosis de anticuerpos anti-PD-1. En las Figuras 3A, 3B, 3C, y 3D, los anticuerpos anti-PD-1 ensayados son AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, y AGEN2047w, respectivamente. En las Figuras 3E y 3F, se muestran resultados similares para AGEN2034w y un anticuerpo control de isotipo.

[00106] Las Figuras 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, y 4F son gráficos que describen la actividad funcional de anticuerpos anti-PD-1 en cultivos de PBMC humanos primarios luego de la estimulación con SEA. La Figura 4A es un gráfico que muestra la producción de IL-2 inducida por los anticuerpos anti-PD-1 AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w, y un control de isotipo de IgG₁. Se muestran los valores medios (barra) de IL-2 secretada. La Figura 4B es un gráfico que muestra la producción de IL-2 en presencia de una titulación de dosis de AGEN2034w comparado con un control de isotipo. Las barras de error representan una desviación estándar. Se ensayó AGEN2034w o un anticuerpo control de isotipo en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CTLA-4 Ipilimumab (Figura 4C), anticuerpo anti-TIGIT pab2197 o pab2196 (Figura 4D), anticuerpo anti-CD137 pab2225 (Figura 4E), o anticuerpo anti-OX40 pab1928 (Figura 4F).

[00107] Las Figuras 5A, 5B, y 5C son resultados de estudios que examinan el impacto del acoplamiento de receptor de Fc gamma (FcγR) sobre la

actividad antagonista de anticuerpos anti-PD-1 sobre PBMC humanos primarios luego de la estimulación con SEA. La Figura 5A es un gráfico que muestra la producción de IL-2 inducida por un anticuerpo anti-PD-1 de referencia o un control de isotipo en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CD16. La Figura 5B es el resultado de un estudio similar que examina la secreción de IL-2 inducida por AGEN2034w o un control de isotipo en presencia de un control de isotipo, un anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD32, un anticuerpo anti-CD64. La Figura 5C es un gráfico que muestra la producción de IL-2 inducida por AGEN2047w con región Fc de IgG₁ humana de tipo salvaje, tres mutantes de Fc correspondientes (N297A, S267E/L328F, y S239D/A330L/I332E), y sus respectivos controles de isotipo. Se muestran los valores medios (barra) de IL-2 secretada.

[00108] La Figura 6 es un gráfico que muestra la producción de IFN γ de un cocultivo de células T de humano y células dendríticas alogénicas en ausencia de cualquier anticuerpo o en presencia de un anticuerpo control de isotipo o el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w. Se muestran los valores medios (barra) de IFN γ .

[00109] Las Figuras 7A, 7B, y 7C son resultados de ensayos que miden la proliferación de células T estimuladas con anticuerpo anti-CD3 después del cocultivo con fluido ascítico de cáncer de ovario en presencia de anticuerpo AGEN2034w o un control de isotipo. Las Figuras 7A y 7B son histogramas representativos que muestran la fluorescencia de CFSE de células T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente, en presencia de anticuerpo AGEN2034w o de un control de isotipo a 10 μ g/ml. La Figura 7C es un gráfico que muestra los resultados de un estudio similar. En la Figura 7C, se normalizó la proliferación de células T CD4⁺, medido por dilución CFSE, a la proliferación de las células T CD4⁺ en ausencia de fluido ascítico de cáncer de ovario y se graficó respecto a las concentraciones de anticuerpo.

[00110] La Figura 8 es un gráfico que muestra la respuesta en un ensayo reportero de Jurkat NFAT-luciferasa inducida por el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w o un anticuerpo control de isotipo de IgG₄. La respuesta, medida por la expresión de luciferasa, se normalizó a la respuesta inducida en presencia del anticuerpo control de isotipo a la menor concentración ensayada (veces de inducción) y graficado respecto a las concentraciones de anticuerpo.

[00111] Las Figuras 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, y 9F son gráficos que muestran el porcentaje de unión de PD-L1-Fc y PD-L2-Fc recombinantes a esferas acopladas a PD-1 en presencia de una titulación de dosis de anticuerpos anti-PD-1 AGEN2001w (Figura 9A), AGEN2002w (Figura 9B), EP11_pl1_B03 (Figura 9C), EP11_pl1_B05 (Figura 9D), EP11_pl1_C02 (Figura 9E), o EP11_pl1_C03 (Figura 9F).

[00112] La Figura 10 es un gráfico que describe la actividad funcional del anticuerpo anti-PD-1 AGEN2002w o un control de isotipo de IgG₁ sobre cultivos de PBMC humanos primarios luego de la estimulación con SEA, como se demuestra por la producción de IL-2. Se muestran los valores medios (barra) de IL-2 secretada.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00113] La presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana y antagonizan la función del PD-1, por ejemplo, una supresión inmune mediado por PD-1. También se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para elaborar estos anticuerpos, y métodos de tratamiento de un sujeto usando estos anticuerpos. Los anticuerpos divulgados en la presente son de particular utilidad para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno (por ejemplo, un antígeno

tumoral o un antígeno de enfermedad infecciosa) y por ende para el tratamiento de cáncer en un sujeto o para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto. Todos los casos de “anticuerpos aislados” descritos en la presente se contemplan adicionalmente como anticuerpos que pueden aislarse, pero no necesariamente. Todos los casos de “polinucleótidos aislados” descritos en la presente se contemplan adicionalmente como polinucleótidos que pueden aislarse, pero no necesariamente. Todos los casos de “anticuerpos” descritos en la presente se contemplan adicionalmente como anticuerpos que pueden aislarse, pero no necesariamente. Todos los casos de “polinucleótidos” descritos en la presente se contemplan adicionalmente como polinucleótidos que pueden aislarse, pero no necesariamente.

5.1 Definiciones

[00114] Como se usan en la presente, los términos “aproximadamente” y “alrededor de”, cuando se usan para modificar un valor numérico o un rango numérico, indican que las desviaciones de hasta entre 5% y 10% por encima y hasta entre 5% y 10% por debajo de dicho valor o rango se encuentran dentro del significado pretendido del valor o rango indicado.

[00115] Como se usa en la presente, el término "PD-1" se refiere a la proteína de muerte celular programada 1. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de PD-1 son bien conocidas en el arte. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la PD-1 humana se encuentra en GenBank, depósito GI: 167857792.

[00116] Como se usa en la presente, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de longitud completa de unión al antígeno y moléculas que comprenden CDR, regiones VH o regiones VL de anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de

manera recombinante, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, inmunoglobulinas, anticuerpos sintéticos, anticuerpos tetraméricos que comprenden dos moléculas de la cadena pesada y dos de la cadena liviana, un monómero de la cadena liviana del anticuerpo, un monómero de la cadena pesada del anticuerpo, un dímero de la cadena liviana del anticuerpo, un dímero de la cadena pesada del anticuerpo, un par de cadena liviana de anticuerpo-cadena pesada de anticuerpo, intrabodies, anticuerpos heteroconjugados, conjugados de anticuerpo-fármaco, anticuerpos de dominio simple, anticuerpos monovalentes, anticuerpos de cadena simple o Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos camelizados, affybodies, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos mediante enlaces disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-anti-Id) y fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los mencionados. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se describen en la presente se refieren a poblaciones de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), de cualquier clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2) o de cualquier subclase (por ejemplo, IgG2a o IgG2b) de moléculas de inmunoglobulina. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se describen en la presente son anticuerpos IgG, o una clase (por ejemplo, IgG1 o IgG4 humana) o una subclase de los mismos. En una forma de realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado. En otra forma de realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano. En determinadas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente es un anticuerpo de IgG1 o IgG2.

[00117] Como se usa en la presente, los términos "región VH" y

"región VL" se refieren a regiones variables simples de la cadena pesada y liviana del anticuerpo, respectivamente, que comprende las FR (regiones de esqueleto) 1, 2, 3 y 4 y las CDR (regiones determinantes de complementariedad) 1, 2 y 3 (véase Kabat y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (publicación del NIH N°: 91-3242, Bethesda), que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

[00118] Como se usa en la presente, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" se refiere a los sitios de combinación de antígenos no contiguos presentes dentro de la región variable de polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. Estas regiones particulares fueron descritas por Kabat y col., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y Kabat y col., *Sequences of protein of immunological interest*, (1991) y por Chothia y col., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), y por MacCallum y col., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996), las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad, donde dichas definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR definida por Kabat, basada en comparaciones de secuencia. CDRH1, CDRH2 y CDRH3 indican las CDR de la cadena pesada y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 indican las CDR de la cadena liviana.

[00119] Como se usa en la presente, el término "sistema de numeración EU" se refiere a la convención de numeración EU para las regiones constantes de un anticuerpo, como se describe en Edelman, G.M. y col., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969) y Kabat y col, en "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", U.S. Dept. Health y Human Services, 5ª edición, 1991, que se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

[00120] Según se emplea en la presente, el término "residuos de aminoácidos del esqueleto (FR) de la región variable" hace referencia a aquellos

aminoácidos en la región esqueleto de una cadena de inmunoglobulina. Los términos “región esqueleto” y “región FR”, tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a los residuos de aminoácidos que forman parte de la región variable pero que no forman parte de las CDR (por ejemplo, de acuerdo con la definición de Kabat de las CDR).

[00121] Como se usan en la presente, los términos “región variable” y “dominio variable” se utilizan como sinónimos y son comunes en el arte. La región variable típicamente se refiere a una porción de un anticuerpo, generalmente, una porción de una cadena liviana o pesada, típicamente aproximadamente entre los 110 y 125 aminoácidos aminoterminales en la cadena pesada madura y entre aproximadamente 90 y 115 aminoácidos en la cadena liviana madura, que difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en aquellas regiones llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) mientras que las regiones más fuertemente conservadas en el dominio variable son llamadas regiones esqueleto (FR). En determinadas formas de realización, la región variable es una región variable humana. En determinadas formas de realización, la región variable comprende CDR de roedor o murinas y regiones esqueleto (FR) humanas. En formas de realización particulares, la región variable es una región variable de primate (por ejemplo, primate no humano). En determinadas formas de realización, la región variable comprende CDR de roedor o murinas y regiones esqueleto (FR) de primate (por ejemplo, primate no humano).

[00122] Los términos “VL” y “dominio VL” se utilizan como sinónimos para referirse a la región variable de la cadena liviana de un anticuerpo.

[00123] Los términos “VH” y “dominio VH” se utilizan como sinónimos para referirse a la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

[00124] Como se usan en la presente, los términos “región constante” y “dominio constante” se usan como sinónimos y son comunes en el arte. La región constante es una porción de anticuerpo, por ejemplo, una porción de carboxilo terminal de una cadena liviana y/o pesada que no está directamente involucrada en la unión de un anticuerpo al antígeno pero que puede exhibir diferentes funciones efectoras, tales como la interacción con un receptor de Fc (por ejemplo, receptor de Fc gamma). La región constante de una molécula de inmunoglobulina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación a un dominio variable de inmunoglobulina.

[00125] Como se usa en la presente, el término “cadena pesada” cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo diferente, por ejemplo, alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ), y mu (μ), en base a la secuencia de aminoácidos del dominio constante, que da lugar a las clases IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM de anticuerpos, respectivamente, que incluyen las subclases de IgG, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄.

[00126] Como se usa en la presente, el término “cadena liviana” cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo diferente, por ejemplo, kappa (κ) o lambda (λ) en base a la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana son bien conocidas en el arte. En formas de realización específicas, la cadena liviana es una cadena liviana de humano.

[00127] “Afinidad de unión” generalmente se refiere a la potencia de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión individual de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otra manera, como se usa en la presente, “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y

antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (K_D). La afinidad puede medirse y/o expresarse de varias maneras conocidas en el arte, que incluyen, a título enunciativo no taxativo, constante de disociación en equilibrio (K_D), y constante de asociación en equilibrio (K_A). La K_D se calcula a partir del cociente k_{off}/k_{on} , mientras que K_A se calcula a partir del cociente k_{on}/k_{off} . k_{on} se refiere a la constante de velocidad de asociación de, por ejemplo, un anticuerpo a un antígeno, y k_{off} se refiere a la constante de la velocidad de disociación de, por ejemplo, un anticuerpo a un antígeno. La k_{on} y k_{off} pueden determinarse por técnicas conocidas para una persona con experiencia ordinaria en el arte, tal como BIAcore[®] o KinExA.

[00128] Como se usa en la presente, el término "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno con una constante de disociación (K_d) de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o menor, y/o se une a un antígeno con una afinidad que es por lo menos dos veces más grande que su afinidad por un antígeno no específico. En una forma de realización, una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos, generalmente con menor afinidad como se determina por, por ejemplo, instrumentos de inmunoensayos, BIAcore[®], KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), u otros ensayos conocidos en el arte. En una forma de realización, una molécula que se une específicamente a un antígeno se une al antígeno con una constante de asociación (K_A) que es por lo menos 2 unidades de logaritmo, 2,5 unidades de logaritmo, 3 unidades de logaritmo, 4 unidades de logaritmo o mayor que la K_A cuando la molécula se une no específicamente a otro antígeno. En una forma de realización, una molécula que se une específicamente a un antígeno se une al

antígeno con una K_d de 1×10^{-6} M o menor, 1×10^{-7} M o menor, 1×10^{-8} M o menor, 1×10^{-9} M o menor, 1×10^{-10} M o menor, 1×10^{-11} M o menor, o 1×10^{-12} M o menor.

[00129] En otra forma de realización específica, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas bajo condiciones de unión similares. En otra forma de realización específica, las moléculas que se unen específicamente a PD-1 no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas no PD-1. En una forma de realización específica, en la presente se provee un anticuerpo que se une a PD-1 (por ejemplo, PD-1 humana) con mayor afinidad que a otro antígeno no relacionado. En determinadas formas de realización, en la presente se provee un anticuerpo que se une a PD-1 (por ejemplo, PD-1 humana) con una afinidad de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o mayor que a otro antígeno no relacionado medido por, por ejemplo, un radioinmunoensayo, resonancia de plasmón superficial, o ensayo de exclusión cinética. En una forma de realización específica, el grado de unión de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente a una proteína no PD-1 no relacionada es menor que 10%, 15%, o 20% de la unión del anticuerpo a la proteína PD-1 medido por, por ejemplo, un radioinmunoensayo.

[00130] Como se usa en la presente, un “epitope” es un término del arte y se refiere a una región localizada de un antígeno a la cual un anticuerpo se puede unir específicamente. Un epitope puede comprender, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epitope lineal o contiguo) o un epitope puede provenir, por ejemplo, de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o de polipéptidos (epitope de conformación, no lineal, discontinuo o no contiguo). En determinadas formas de realización, el epitope al cual se une un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante espectroscopia de RMN,

estudios de cristalografía por difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masas (por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas con electroatomización), ensayos de barrido de oligopéptidos basados en ordenamientos (por ejemplo, unión de péptidos usando CLIPS (Unión química de péptidos sobre esqueletos) para mapear epitopes discontinuos o conformacionales) y/o mapeo por mutagénesis (por ejemplo, mapeo por mutagénesis dirigida al sitio). Para la cristalografía por rayos X, la cristalización se efectúa usando cualquiera de los métodos conocidos en el arte (por ejemplo, Giegé R y col., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Los cristales de anticuerpo:antígeno pueden estudiarse usando técnicas de difracción de rayos X bien conocidas y puede refinarse usando programas de computadora tales como X-PLOR (Universidad de Yale, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, *Meth Enzymol* (1985) volúmenes 114 & 115, eds Wyckoff HW y col.,; U.S. 2004/0014194), y BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P y col., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia). Los estudios de mapeo por mutagénesis pueden realizarse usando cualquier método conocido por una persona con experiencia en el arte. Véase, por ejemplo, Champe M y col., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 y Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia, para una descripción de las técnicas de mutagénesis, que incluyen técnicas de mutagénesis por barrido de alanina.

CLIPS (unión química de péptidos a esqueletos) es una tecnología para presentar uno o más péptidos en una configuración estructuralmente restringida para que se comporten como miméticos funcionales de dominios proteicos complejos. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de los EE.UU. Nos. US 2008/0139407 A1 y US 2007/099240 A1, y la Patente de los EE.UU. No. 7.972.993, las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad. En una forma de realización específica, el epítopo de un anticuerpo se determina usando estudios de mutagénesis por barrido de alanina. En una forma de realización específica, el epítopo de un anticuerpo se determina usando intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado a espectrometría de masas. En una forma de realización específica, el epítopo de un anticuerpo se determina usando la tecnología de mapeo de epítopos CLIPS de Pepscan Therapeutics.

[0001] Como se usan en la presente, los términos “receptor de células T” y “TCR” se utilizan como sinónimos y se refieren a TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ heterodiméricos de longitud completa, fragmentos de unión a antígeno de TCR de longitud completa, y moléculas que comprenden CDR o regiones variables de TCR. Los ejemplos de TCR incluyen, a título enunciativo no taxativo, TCR de longitud completa, fragmentos de unión a antígeno de TCR de longitud completa, regiones transmembrana y citoplasmáticas que carecen de TCR solubles, TCR de cadena simple que contienen regiones variables de TCR unidas por un conector flexible, cadenas de TCR unidas por un enlace disulfuro diseñado, TCR monoespecíficos, TCR multiespecíficos (que incluyen TCR biespecíficos), fusiones de TCR, TCR humanos, TCR humanizados, TCR quiméricos, TCR producidos de manera recombinante, y TCR sintéticos. El término abarca TCR de tipo salvaje y TCR diseñados genéticamente (por ejemplo, un TCR quimérico que comprende una cadena de TCR quimérica que incluye una primera porción de un TCR de una primera especie y una segunda porción de un TCR de una segunda especie).

[0002] Como se usan en la presente, los términos “complejo mayor de histocompatibilidad” y “MHC” se utilizan como sinónimos y se refiere a una molécula de MHC clase I y/o una molécula de MHC clase II.

[0003] Como se usa en la presente, el término “complejo péptido-MHC” se refiere a una molécula de MHC (MHC clase I o MHC clase II) con un bolsillo del MHC de unión a péptido reconocido en el arte unido a péptido.

[00131] Como se usa en la presente, el término “tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a las medidas terapéuticas o preventivas que se describen en la presente. Los métodos de “tratamiento” emplean la administración de un anticuerpo a un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno, o que está predispuesto a padecer dicha enfermedad o trastorno, a fin de prevenir, curar, demorar, reducir la severidad o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o del trastorno o de una enfermedad o trastorno recurrente o a fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en la ausencia de dicho tratamiento.

[00132] Según se usa en la presente, el término “cantidad eficaz” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a la cantidad de una terapia que permite lograr un efecto profiláctico o terapéutico deseado.

[00133] Según se usa en la presente, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. En una forma de realización preferida, el sujeto es un humano o mamífero no humano, más preferiblemente un humano.

[00134] La determinación de la “identidad porcentual” entre dos secuencias (por ejemplo, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico) puede realizarse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante específico de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, modificado como en Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877,

cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul SF y col., (1990) J Mol Biol 215: 403, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST pueden realizarse con el grupo de parámetros del programa para nucleótidos NBLAST, por ejemplo, para puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a moléculas de ácido nucleico descritas en la presente. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el conjunto de parámetros de programa XBLAST, por ejemplo, para puntuación 50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en la presente. Para obtener alineamientos con huecos con propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describió en Altschul SF y col., (1997) Nuc Acids Res 25: 3389-3402, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Como alternativa, puede usarse PSI BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas (*Id.*). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, National Center for Biotechnology Information (NCBI) en el sitio de internet, ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo no limitante, específico, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. El mencionado algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte de un paquete de programas de computación de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para la comparación de secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalidad de longitud de no coincidencia de 12, y una

penalidad de no coincidencia de 4.

[00135] La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas precedentemente, con el permiso o no de no coincidencias. En el cálculo de la identidad porcentual, típicamente solo se cuentan las coincidencias exactas.

5.2. Anticuerpos anti-PD-1

[00136] En un aspecto la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana y antagonizan la función de PD-1. Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos ejemplificativos se detallan en las Tablas 1-6, en la presente.

Tabla 1. Secuencias de regiones variables, CDR, y FR de anticuerpos ejemplificativos anti-PD-1

SEQ ID NO:	Descripción		Secuencia de aminoácidos
1	AGEN2033w CDRH1	Kabat	SYGMH
2	AGEN2033w CDRH2	Kabat	VIWYDGSNKYYADSVKG
3	AGEN2033w CDRH3	Kabat	NVDY
4	AGEN2033w CDRL1	Kabat	RASQSVSSNLA
5	AGEN2033w CDRL2	Kabat	GASTRAT
6	AGEN2033w CDRL3	Kabat	QQYNNWPRT
7	AGEN2034w	Kabat	NGDH

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
	CDRH3	
8	AGEN2033w IMGT CDRH1	GFTFSSYG
9	AGEN2033w IMGT CDRH2	IWYDGSNK
10	AGEN2033w IMGT CDRH3	ASNVDY
11	AGEN2033w IMGT CDRL1	QSVSSN
12	AGEN2033w IMGT CDRL2	GAS
13	AGEN2033w IMGT CDRL3	QQYNNWPRT
14	AGEN2034w IMGT CDRH3	ASNGDH
15	AGEN2033w, AGEN2046w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQGTLVTV SS
16	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYNNWPRTFGQGTKVEIK
17	AGEN2034w,	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
	AGEN2047w VH	FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSS
18	AGEN2033w cadena pesada IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK
52	AGEN2033w cadena pesada IgG4 S228P (sin lisina del extremo C terminal)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG
19	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w cadena liviana	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYNNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
20	AGEN2034w cadena pesada IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK
53	AGEN2034w cadena pesada IgG4 S228P (sin lisina del extremo C terminal)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		HEALHNHYTQKSLSLGLG
21	AGEN2046w cadena pesada IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	AGEN2046w cadena pesada IgG1 (sin lisina del extremo C terminal)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
22	AGEN2047w cadena pesada IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	AGEN2047w cadena	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
	pesada IgG1 (sin lisina del extremo C terminal)	FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	AGEN2047w cadena pesada IgG1 N297A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	AGEN2047w cadena pesada IgG1 N297A (sin lisina del extremo C terminal)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	AGEN2047w cadena pesada IgG1 S267E/L328F	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	AGEN2047w cadena pesada IgG1 S267E/L328F (sin lisina del extremo C terminal)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQ

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25	AGEN2047w cadena pesada IgG1 S239D/A330L/I332E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	AGEN2047w cadena pesada IgG1 S239D/A330L/I332E (sin lisina del extremo C terminal)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	AGEN2001w (BADD426-2614)	VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCATNGDYWGQGTLVTV SS
27	AGEN2002w (BADD426-2615)	VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDYWGQGTLVTV SS
28	EP11_pl1_B03 (BADD438-2743)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG SNEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		VSS
29	EP11_pl1_B05 (BADD438-2745)	QVQLVESGGGMVQPGRSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFD GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLV TVSS
30	EP11_pl1_C02 (BADD438-2746)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGHGTLVT VSS
31	EP11_pl1_C03 (BADD438-2747)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSV MGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVT VSS
32	consenso CDRH2	VIWX ₁ DGSNX ₂ YYADSVX ₃ G X ₁ es Y o F; X ₂ es K o E; y X ₃ es K o M
33	consenso CDRH3	NX ₁ DX ₂ X1 es G o V; y X2 es H o Y
34	CDRH2	VIWYDGSNEY YADSVKG
35	CDRH2	VIWFDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
36	CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVMG
37	CDRH3	NGDY
38	FR1 de VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FS
39	FR1 de VH	QVQLVESGGGMVQPGRSLRLSCAASGF TFS
40	FR2 de VH	WVRQAPGKGLEWVA
41	FR3 de VH	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAS
42	FR3 de VH	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAT
43	FR4 de VH	WGQGTLVTVSS
44	FR4 de VH	WGHGTLVTVSS
45	FR1 de VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
46	FR2 de VL	WYQQKPGQAPRLIY
47	FR3 de VL	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YC
48	FR4 de VL	FGQGTKVEIK
49	secuencia consenso VH	QVQLVESGGGX ₁ VQPGRSLRLSCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWX ₂ DGSNX ₃ YYADSVX ₄ GRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAX ₅ NX ₆ DX ₇ WGX ₈ G TLVTVSS X ₁ es V o M, X ₂ es Y o F,

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		X₃ es K o E, X₄ es K o M, X₅ es S o T, X₆ es G o V, X₇ es H o Y, y X₈ es Q o H
50	secuencia de línea germinal IGHV3-33*01	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR
51	secuencia de línea germinal IGKV3-15*01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYY CQQYNNWP
59	IgG1 humana alotipo G1m3 (sin lisina del extremo C terminal)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		MHEALHNHYTQKSLSLSPG
60	IgG1 humana alotipo G1m3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1 N297A (sin lisina del extremo C terminal)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
62	IgG1 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	IgG4 S228P (sin lisina del extremo C terminal)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLG
64	IgG4 S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
		KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK
65	Región constante de cadena liviana kappa humana IGKC*01 alotipo Km3	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabla 2. Secuencias de CDR de cadena pesada de anticuerpos ejemplificativos anti-PD-1 ¹

Anticuerpo	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NVDY (3)
AGEN2034w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
AGEN2001w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
AGEN2002w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)

EP11_pl1_B03	SYGMH (1)	VIWYDGSNEYADSVKG (34)	NGDH (7)
EP11_pl1_B05	SYGMH (1)	VIWFDGSNKYYADSVKG (35)	NGDH (7)
EP11_pl1_C02	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
EP11_pl1_C03	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVMG (36)	NGDH (7)

¹ Las CDR de VH en la Tabla 2 se determinan de acuerdo con Kabat.

Tabla 3. Secuencias de CDR de cadena liviana de anticuerpos ejemplificativos anti-PD-1 ²

Anticuerpo	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2034w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2001w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2002w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_B03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_B05	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_C02	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_C03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)

² Las CDR de VL en la Tabla 3 se determinan de acuerdo con Kabat.

Tabla 4. Secuencias esqueleto (FR) de VH de anticuerpos ejemplificativos anti-PD-1 ³

Anticuerpo	FR1 de VH (SEQ ID NO:)	FR2 de VH (SEQ ID NO:)	FR3 de VH (SEQ ID NO:)	FR4 de VH (SEQ ID NO:)
AGEN2033	QVQLVESGGGVV	WVRQAPG	RFTISRDNSKNTLYL	WGQG

w	QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	KGLEWVA (40)	QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	TLVTV SS (43)
AGEN2034 w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	WGQG TLVTV SS (43)
AGEN2001 w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAT (42)	WGQG TLVTV SS (43)
AGEN2002 w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	WGQG TLVTV SS (43)
EP11_pl1_ B03	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	WGQG TLVTV SS (43)
EP11_pl1_ B05	QVQLVESGGGMV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (39)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	WGQG TLVTV SS (43)
EP11_pl1_ C02	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	WGHG TLVTV SS (44)
EP11_pl1_ C03	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPG KGLEWVA (40)	RFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYY CAS (41)	WGQG TLVTV SS (43)

³ Las regiones esqueleto de VH descritas en la Tabla 4 se determinan en base a los límites del sistema de numeración de Kabat para las CDR. En otras palabras, las CDR de VH se determinan por Kabat y las regiones esqueleto son los residuos aminoacídicos que rodean las CDR en la región variable en el

formato FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3, y FR4.

Tabla 5. Secuencias esqueleto (FR) de VL de anticuerpos ejemplificativos anti-PD-1 ⁴

Anticuerpo	FR1 de VL (SEQ ID NO:)	FR2 de VL (SEQ ID NO:)	FR3 de VL (SEQ ID NO:)	FR4 de VL (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)
AGEN2034w	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)
AGEN2001w	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)
AGEN2002w	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)
EP11_pl1_B0 3	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)
EP11_pl1_B0 5	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)
EP11_pl1_C0 2	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS	WYQQKPG QAPRLLIY	GIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDF	FGQGTKV EIK (48)

	C (45)	(46)	AVYYC (47)	
EP11_pl1_C03	EIVMTQSPATL SVSPGERATLS C (45)	WYQQKPG QAPRLLIY (46)	GIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDF AVYYC (47)	FGQGTKV EIK (48)

⁴ Las regiones esqueleto de VL descritas en la Tabla 5 se determinan en base a los límites del sistema de numeración de Kabat para las CDR. En otras palabras, las CDR de VL se determinan por Kabat y las regiones esqueleto son los residuos aminoacídicos que rodean las CDR en la región variable en el formato FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3, y FR4.

Tabla 6. Secuencias de VH y VL de anticuerpos ejemplificativos anti-PD-1

Anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	SEQ ID NO:	Región variable de la cadena liviana	SEQ ID NO:
AGEN2033w	BADD438-2742	15	3738	16
AGEN2034w	BADD438-2744	17	3738	16
AGEN2001w	BADD426-2614	26	3738	16
AGEN2002w	BADD426-2615	27	3738	16
EP11_pl1_B03	BADD438-2743	28	3738	16
EP11_pl1_B05	BADD438-2745	29	3738	16
EP11_pl1_C02	BADD438-2746	30	3738	16
EP11_pl1_C03	BADD438-2747	31	3738	16

Tabla 7. Secuencias ejemplificativas de PD-1

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
------------	-------------	--------------------------

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
74	Secuencia de PD-1 madura ejemplificativa	PGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFT CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDR SQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDS GTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT AHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVW VLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFS VDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVF PSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCS WPL
75	Epitope de PD-1 (residuos 107-122)	SLAPKAQIKESLRAEL
76	Epitope de PD-1 (residuos 5-22)	LDSPDRPWNPPPTFSPALL
77	Epitope de PD-1 (residuos 6-15)	DSPDRPWNPP
78	Epitope de PD-1 (residuos 130-138)	EVPTAHPSP
79	Epitope de PD-1 (residuos 106-113)	ISLAPKAQ

[00137] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1

humana, que comprende:

(a) CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYGMH (SEQ ID NO: 1); y/o

(b) CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), en donde

X₁ es Y o F;

X₂ es K o E; y

X₃ es K o M; y/o

(c) CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), en donde

X₁ es G o V; y

X₂ es H o Y; y/o

(d) CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); y/o

(e) CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 5); y/o

(f) CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00138] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR de VH precedentes. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRH1 de uno de los anticuerpos de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRH2 de uno de los anticuerpos de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRH3 de uno de los anticuerpos de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres de las CDR de VH de uno de los anticuerpos de la Tabla 2 (por ejemplo, las CDR de VH en una fila de la Tabla 2, por ejemplo, todas las CDR de

VH de AGEN2033w o AGEN2034w). En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende los esqueletos de VH descritos en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende las regiones esqueleto de VH de un anticuerpo descrito en la Tabla 4 (por ejemplo, una, dos, tres, o cuatro de las regiones esqueleto en una fila de la Tabla 4).

[00139] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres de las CDR de VL precedentes. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRL1 de uno de los anticuerpos de la Tabla 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRL2 de uno de los anticuerpos de la Tabla 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRL3 de uno de los anticuerpos de la Tabla 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres de las CDR de VL de uno de los anticuerpos de la Tabla 3 (por ejemplo, las CDR de VL en una fila de la Tabla 3, por ejemplo, todas las CDR de VL de AGEN2033w o AGEN2034w). En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende las regiones esqueleto de VL descritas en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende las regiones esqueleto (FR) de VL de un anticuerpo descrito en la Tabla 5 (por ejemplo, una, dos, tres, o cuatro de las regiones esqueleto en una fila de la Tabla 5).

[00140] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SYGMH (SEQ

ID NO: 1);

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO: 32), en donde

X₁ es Y o F;

X₂ es K o E; y

X₃ es K o M;

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de NX₁DX₂ (SEQ ID NO: 33), en donde

X₁ es G o V; y

X₂ es H o Y;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4);

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 5); y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00141] En determinadas formas de realización, la CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2 y 34-36. En determinadas formas de realización, la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3, 7, y 37.

[00142] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, detalladas en las

SEQ ID NOs: 1, 2, y 3; 1, 2, y 7; 1, 2, y 37; 1, 34, y 7; 1, 35, y 7; o 1, 36, y 7.

[00143] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6; 1, 2, 7, 4, 5, y 6; 1, 2, 37, 4, 5, y 6; 1, 34, 7, 4, 5, y 6; 1, 35, 7, 4, 5, y 6; o 1, 36, 7, 4, 5, y 6, respectivamente.

[00144] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende:

- (a) una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYGMH (SEQ ID NO: 1); y/o
- (b) una CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); y/o
- (c) una CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de NVDY (SEQ ID NO: 3) o NGDH (SEQ ID NO: 7); y/o
- (d) una CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 4); y/o
- (e) una CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 5); y/o
- (f) una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQYNNWPRT (SEQ ID NO: 6).

[00145] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR de VH detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, y 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR de VH detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, y 7. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres de las CDR de VL detalladas en las SEQ ID NOs: 4, 5, y 6.

[00146] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, y 3, respectivamente.

[00147] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, y 7, respectivamente.

[00148] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 detalladas en las SEQ ID NOs: 4, 5, y 6, respectivamente.

[00149] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6, respectivamente.

[00150] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos detalladas en las SEQ ID NOs: 1, 2, 7, 4, 5, y 6, respectivamente.

[00151] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, el cual se refiere a la localización de los bucles estructurales de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B y col., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C y col., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A y col., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; y Patente de los EE.UU. No. 7.709.226, las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad). Típicamente, cuando se usa la convención de la numeración de Kabat, el bucle de CDRH1 por Chothia está presente en los aminoácidos de la cadena pesada 26 a o 32, 33, o 34, el bucle de CDRH2 de Chothia está presente en los aminoácidos de la cadena pesada 52 a 56, y el bucle de CDRH3 de Chothia está presente en los aminoácidos de la cadena pesada 95 a 102, mientras que el bucle de CDRL1 de Chothia está presente en los aminoácidos de la cadena liviana 24 a 34, el bucle de CDRL2 de Chothia está presente en los aminoácidos de la cadena liviana 50 a 56, y el bucle

de CDRL3 de Chothia está presente en los aminoácidos de la cadena liviana 89 a 97. El extremo del bucle de CDRH1 de Chothia cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto es porque el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si 35A y 35B están presentes, el bucle termina en 34).

[00152] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende las CDR de VL de Chothia de una VL de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en la presente (por ejemplo, AGEN2033w o AGEN2034w). En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende las CDR de VH de Chothia de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en la presente (por ejemplo, AGEN2033w o AGEN2034w). En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, el anticuerpo comprende las CDR de VH de Chothia y las CDR de VL de Chothia de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en la presente (por ejemplo, AGEN2033w o AGEN2034w). En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana comprenden una o más CDR, en las cuales las CDR de Chothia y Kabat tienen la misma secuencia de aminoácidos. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y comprende las combinaciones de CDR de Kabat y CDR de Chothia.

[00153] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el sistema de numeración de

IMGT como se describe en Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 y Lefranc M-P y col., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia. De acuerdo con el esquema de numeración de IMGT, CDRH1 se encuentra en las posiciones 26 a 35, CDRH2 se encuentra en las posiciones 51 a 57, CDRH3 se encuentra en las posiciones 93 a 102, CDRL1 se encuentra en las posiciones 27 a 32, CDRL2 se encuentra en las posiciones 50 a 52, y CDRL3 se encuentra en las posiciones 89 a 97. En una forma de realización particular, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana y comprende las CDR de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en la presente (por ejemplo, AGEN2033w o AGEN2034w) tal como se determina por el sistema de numeración IMGT, por ejemplo, como se describe en Lefranc M-P (1999) precedentemente y Lefranc M-P y col., (1999) precedentemente.

[00154] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con MacCallum RM y col., (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. También véase, por ejemplo, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody variable domains", en *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Capítulo 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. En una forma de realización particular, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana y comprenden CDR de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en la presente (por ejemplo, AGEN2033w o AGEN2034w) como se determina por el método en MacCallum RM y col., (1996) precedentemente.

[00155] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el esquema de numeración AbM, el cual se refiere a regiones hipervariables de AbM, que representan un

compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usados por el programa de computación para modelaje de anticuerpos de AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.), que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. En una forma de realización particular, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana y comprenden las CDR de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en la presente (por ejemplo, AGEN2033w o AGEN2034w) como se determina por el esquema de numeración de AbM.

[00156] En consecuencia, en determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3 detalladas en SEQ ID NO: 15, y las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3 detalladas en SEQ ID NO: 16, en donde cada CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat, la definición de Chothia, la combinación de la definición de Kabat y la definición de Chothia, el sistema de numeración de IMGT, la definición de AbM, o la definición de contacto de CDR.

[00157] En consecuencia, en determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3 detalladas en SEQ ID NO: 17, y las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3 detalladas en SEQ ID NO: 16, en donde cada CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat, la definición de Chothia, la combinación de la definición de Kabat y la definición de Chothia, el sistema de numeración de IMGT, la definición de AbM, o la definición

de contacto de CDR.

[00158] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos detalladas en las SEQ ID NOS: 8, 9, 10, 11, 12, y 13, respectivamente.

[00159] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos detalladas en las SEQ ID NOS: 8, 9, 14, 11, 12, y 13, respectivamente.

[00160] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49.

[00161] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal IGHV3-33 humana. Una o más regiones seleccionadas de esqueleto 1, esqueleto 2, esqueleto 3, CDRH1, y CDRH2 (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco es estas

regiones) pueden derivar de una secuencia de línea germinal IGHV3-33 humana. En una forma de realización, esqueleto 1, esqueleto 2, esqueleto 3, CDRH1, y CDRH2 derivan todas de una secuencia de línea germinal IGHV3-33 humana. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% (por ejemplo, por lo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15, 17, y 26-31. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 15, 17, y 26-31. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 15. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 17. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 26. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 27. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 28. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 29. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la

secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 30. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 31. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 18. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 21. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 20. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 22. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 23. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 24. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 25. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 52. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 53. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 54. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 55. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 56. En

determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 57. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 58.

[00162] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal IGKV3-15 humana. Una o más regiones seleccionadas de esqueleto 1, esqueleto 2, esqueleto 3, CDRL1, y CDRL2 (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) pueden derivar de una secuencia de línea germinal IGKV3-15 humana. En una forma de realización, esqueleto 1, esqueleto 2, esqueleto 3, CDRL1, y CDRL2 derivan todas de una secuencia de línea germinal IGKV3-15 humana. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% (por ejemplo, por lo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 19.

[00163] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75%, 80%, 85%,

90%, 95%, o 100% (por ejemplo, por lo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17, y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% (por ejemplo, por lo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, 17, y 26-31, y una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16.

[00164] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana secuencias de aminoácidos detalladas en las SEQ ID NOs: 15 y 16; 17 y 16; 26 y 16; 27 y 16; 28 y 16; 29 y 16; 30 y 16; o 31 y 16, respectivamente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 15, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 17, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 26, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende

una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 27, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 28, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 29, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 30, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 31, y la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en SEQ ID NO: 16. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

[00165] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 15 y 16, respectivamente.

[00166] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en la PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 15 y 16, respectivamente.

[00167] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 17 y 16, respectivamente.

[00168] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 17 y 16, respectivamente.

[00169] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la

unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 26 y 16, respectivamente.

[00170] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 26 y 16, respectivamente.

[00171] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 27 y 16, respectivamente.

[00172] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 27 y 16, respectivamente.

[00173] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 28 y 16, respectivamente.

[00174] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 28 y

16, respectivamente.

[00175] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 29 y 16, respectivamente.

[00176] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 29 y 16, respectivamente.

[00177] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 30 y 16, respectivamente.

[00178] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 30 y 16, respectivamente.

[00179] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a PD-1 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 31 y 16, respectivamente.

[00180] En determinadas formas de realización, la presente

divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo en PD-1 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana detalladas en las SEQ ID NOs: 31 y 16, respectivamente.

[00181] Se puede usar cualquier región constante de Ig en los anticuerpos descritos en la presente. En determinadas formas de realización, la región Ig es una región constante de la cadena pesada de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂ humana. En determinadas formas de realización, la región Ig es una IgG₁ humana. En determinadas formas de realización, la región Ig es una IgG₄ humana. En determinadas formas de realización, la Ig (por ejemplo, IgG₁) carece de la porción glicano ligada a N que está normalmente presente en la posición N297 (de acuerdo con el sistema de numeración EU) en los anticuerpos IgG₁ maduros de tipo salvaje *in vivo*. La falta de glicano N297 produce una pérdida sustancial de la función efectora. La eliminación del glicano N297 puede lograrse usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la eliminación del glicano N297 se logra por mutación del residuo N297 para eliminar el sitio de glicosilación. En consecuencia, en determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante de la cadena pesada (por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de IgG₁ humana) que comprende una mutación N297A, de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante de cadena pesada (por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG₁) que comprende una mutación N297Q, de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante de cadena pesada de IgG₁ (por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG₁ humana) que

comprende una mutación D265A, de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante de cadena pesada de IgG₄ (por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG₄ humana) que comprende una mutación S228P, de acuerdo con el sistema de numeración EU.

[00182] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63, o 64. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65.

[00183] En determinadas formas de realización, las regiones IgG de los anticuerpos descritos en la presente tienen una afinidad aumentada por CD32B (también conocido como FcγRIIB o FCGR2B), por ejemplo, en comparación con un anticuerpo con una región Fc de tipo salvaje, por ejemplo, un Fc de IgG₁. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente tienen una afinidad selectivamente aumentada por CD32B (FcγRIIB) respecto a CD32A (FcγRIIA) y CD16 (FcγRIIIA). Las alteraciones de la secuencia que dan como resultado una afinidad aumentada por CD32B son conocidas en el arte, por ejemplo, en Mimoto y col., *Protein Engineering, Design & Selection* 10: 589-598 (2013), Chu y col., *Molecular Immunology* 45: 3926-3933 (2008), y Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), cada una de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o un fragmento de la misma que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F, y L328E, y combinaciones de las mismas, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que

comprende las sustituciones S267E y L328F, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende las sustituciones P238D y L328E, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende una sustitución P238D y una sustitución seleccionada del grupo que consiste en E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, y combinaciones de las mismas, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende las sustituciones P238D, E233D, G237D, H268D, P271G, y A330R, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende las G236D y S267E, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende S239D y S267E, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende V262E, S267E, y L328F, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de IgG₁ o fragmento de la misma que comprende

V264E, S267E, y L328F, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU.

[00184] En determinadas formas de realización, Una, dos, o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) se introducen en la región Fc de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, dominio CH2 (residuos 231-340 de IgG₁ humana) y/o dominio CH3 (residuos 341-447 de la IgG₁ humana) y/o la región bisagra, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno.

[00185] En determinadas formas de realización, se introducen una, dos, o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) en la región bisagra de la región Fc (dominio CH1) tal que se altera el número de residuos de cisteína en la región bisagra (por ejemplo, aumenta o disminuye) como se describe en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.677.425, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. El número de residuos de cisteína en la región bisagra del dominio CH1 puede alterarse para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas liviana y pesada, o para alterar (por ejemplo, aumentar o disminuir) la estabilidad del anticuerpo.

[00186] En una forma de realización específica, se introducen una, dos, o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de la misma (preferiblemente un fragmento de dominio Fc o bisagra-Fc) para alterar (por ejemplo, disminuir o aumentar) la vida media del anticuerpo *in vivo*. Véase, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO 02/060919; WO 98/23289; y WO 97/34631; y las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.869.046, 6.121.022, 6.277.375 y 6.165.745, las cuales se incorporan en su totalidad a la

presente a modo de referencia, como ejemplos de mutaciones que alterarán (por ejemplo, disminuir o aumentar) la vida media de un anticuerpo *in vivo*. En algunas formas de realización, se introducen una, dos o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones, o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de la misma (preferiblemente un fragmento de dominio Fc o bisagra-Fc) para disminuir la vida media del anticuerpo *in vivo*. En otras formas de realización, se introducen una, dos o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de la misma (preferiblemente un fragmento de dominio Fc o bisagra-Fc) para aumentar la vida media del anticuerpo *in vivo*. En una forma de realización específica, los anticuerpos pueden tener una o más mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en el segundo dominio constante (CH2) (residuos 231-340 de la IgG₁ humana) y/o el tercer dominio constante (CH3) (residuos 341-447 de IgG₁ humana), numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En una forma de realización específica, la región constante de la IgG₁ de un anticuerpo descrito en la presente comprende una sustitución de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una sustitución de serina (S) a treonina (T) en la posición 254, y una sustitución de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. Véase la Patente de los EE.UU. No. 7.658.921, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Se ha mostrado que este tipo de IgG mutante, referido como “mutante YTE” presenta una vida media cuatro veces aumentada en comparación a las versiones de tipo salvaje del mismo anticuerpo (véase Dall’Acqua WF y col., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad). En determinadas formas de realización, un anticuerpo comprende un dominio constante de IgG que comprende una, dos, tres o más sustituciones de

aminoácidos de los residuos de aminoácidos en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-436, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU.

[00187] En algunas formas de realización, se introducen una, dos, o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) en la región Fc de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, dominio CH2 (residuos 231-340 de IgG₁ humana) y/o dominio CH3 (residuos 341-447 de IgG₁ humana) y/o la región bisagra, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU, para aumentar o disminuir la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc activado) en la superficie de una célula efectora. Las mutaciones en la región Fc de un anticuerpo que disminuye o aumenta la afinidad de un anticuerpo por un receptor de Fc y las técnicas para introducir dichas mutaciones en el receptor de Fc o fragmento del mismo son conocidas para las personas con experiencia en el arte. Los ejemplos de mutaciones en el receptor de Fc de un anticuerpo que pueden hacerse para alterar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc se describen en, por ejemplo, Smith P y col., (2012) PNAS 109: 6181-6186, Patente de los EE.UU. No. 6.737.056, y las Publicaciones Internacionales Nos. WO 02/060919; WO 98/23289; y WO 97/34631, las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

[00188] En una forma de realización adicional, se introducen una, dos, o más sustituciones de aminoácidos en un región Fc del dominio constante de IgG para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoacídicos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU, por un residuo aminoacídico diferente tal que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector pero retiene la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector para el

cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe con mayor detalle en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia. En algunas formas de realización, la eliminación o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo circulante aumentando de esta manera la localización en el tumor. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.585.097 y 8.591.886, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia, para una descripción de mutaciones que eliminan o inactivan el dominio constante y aumentan de esta manera la localización al tumor. En determinadas formas de realización, pueden introducirse una o más sustituciones de aminoácido en la región Fc de un anticuerpo descrito en la presente o para eliminar potenciales sitios de glicosilación en la región Fc, que pueden reducir la unión al receptor de Fc (véase, por ejemplo, Shields RL y col., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad). En diferentes formas de realización, pueden hacerse una o más de las siguientes mutaciones en la región constante de un anticuerpo descrito en la presente: una sustitución N297A; una sustitución N297Q; una sustitución L235A y una sustitución L237A; una sustitución L234A y una sustitución L235A; una sustitución E233P; sustitución L234V; una sustitución L235A; una eliminación C236; una sustitución P238A; una sustitución D265A; una sustitución A327Q; o una sustitución P329A, numerada de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, puede hacerse una mutación seleccionada del grupo que consiste en D265A, P329A, y una combinación de las mismas, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU, en la región constante de un anticuerpo descrito en la presente.

[00189] En una forma de realización específica, un anticuerpo descrito en la presente comprende el dominio constante de una IgG₁ con una sustitución de aminoácido N297Q o N297A, numerada de acuerdo con el sistema de numeración EU. En una forma de realización, un anticuerpo descrito en la presente comprende el dominio constante de una IgG₁ con una mutación seleccionada del grupo que consiste en D265A, P329A, y una combinación de las mismas, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En otra forma de realización, un anticuerpo descrito en la presente comprende el dominio constante de una IgG₁ con una mutación seleccionada del grupo que consiste en L234A, L235A, y una combinación de las mismas, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, los residuos aminoacídicos en la región constante de un anticuerpo descrito en la presente en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235, y D265 en una cadena pesada de IgG₁ humana, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU, no son L, L, y D, respectivamente. Esta estrategia se describe en detalle en la Publicación Internacional No. WO 14/108483, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. En una forma de realización particular, los aminoácidos correspondientes a las posiciones L234, L235, y D265 en una cadena pesada IgG₁ humana son F, E, y A; o A, A, y A, respectivamente, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU.

[00190] En determinadas formas de realización, pueden reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos aminoacídicos 329, 331, y 322 en la región constante de un anticuerpo descrito en la presente, numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU, por un residuo aminoacídico diferente tal que el anticuerpo tenga una unión alterada a C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento reducida o abolida (CDC). Esta estrategia se describe con mayor detalle en la Patente de los EE.UU. No. 6.194.551 (Idusogie y

col.), que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, uno o más residuos aminoacídicos en las posiciones de aminoácido 231 a 238 en la región N terminal del dominio CH2 de un anticuerpo descrito en la presente se alteran para alterar de esta manera la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento, numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU. Esta estrategia se describe con mayor detalle en la Publicación Internacional No. WO 94/29351, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. En determinadas formas de realización, la región Fc de un anticuerpo descrito en la presente se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc γ por mutación de uno o más aminoácidos (por ejemplo, por introducción de sustituciones de aminoácido) en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, o 439, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU. Esta estrategia se describe adicionalmente en la Publicación Internacional No. WO 00/42072, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

[00191] En determinadas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente comprende la región constante de un anticuerpo IgG₄ y la serina en el residuo aminoacídico 228 de la cadena pesada, numerada de acuerdo con el sistema de numeración EU, se sustituye por prolina. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

[00192] En determinadas formas de realización, cualquiera de las mutaciones o modificaciones de la región constante descritas en la presente pueden introducirse en una o ambas regiones constantes de cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente que tiene dos regiones constantes de cadena pesada.

[00193] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y funciona como un antagonista.

[00194] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y disminuye la actividad de PD-1 en por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% evaluado por métodos descritos en la presente y/o conocidos por las personas con experiencia en el arte, en relación a la actividad PD-1 sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana). En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y disminuye la actividad de PD-1 en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces evaluado por métodos descritos en la presente y/o conocidos por las personas con experiencia en el arte, en relación a

la actividad de PD-1 sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana). Los ejemplos no limitantes de PD-1 actividad pueden incluir la señalización de PD-1, unión de PD-1 al ligando PD-1 (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2), inhibición de la producción de citoquinas (por ejemplo, IL-2 o IFN γ), e inhibición de la proliferación de células T. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y desactiva, reduce, o inhibe una actividad de PD-1. En formas de realización específicas, una disminución en la actividad de PD-1 se evalúa como se describe en los Ejemplos, más adelante.

[00195] En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y reduce la unión de PD-1 a su ligando (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2) en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99%, evaluado por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, más adelante) o que son conocidos por las personas con experiencia en el arte, en relación a la unión de PD-1 a su ligando (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2) sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana). En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana y reduce la unión de PD-1 a su ligando (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2) en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, evaluado por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, más adelante) o que son

conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la unión de PD-1 a su ligando (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2) sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

[00196] En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa la producción de citoquinas (por ejemplo, IL-2 o IFN γ) en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99%, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, *infra*) o conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la producción de citoquinas sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana). En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa la producción de citoquinas (por ejemplo, IL-2 o IFN γ) en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, *infra*) o conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la producción de citoquinas sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

[00197] En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana, y ya sea solo o en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo,

ipilimumab o tremelimumab), un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-CD137 (por ejemplo, urelumab o utomilumab), o un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, pogalizumab o tavolixizumab) incrementa la producción de IL-2 en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en respuesta a estimulación por Enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA) en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, *infra*) o conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la producción de IL-2 sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

[00198] En determinadas formas de realización, células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas con Enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA) en presencia de un anticuerpo descrito en la presente, que se une específicamente a PD-1 humana, ya sea solo o en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab o tremelimumab), un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-CD137 (por ejemplo, urelumab o utomilumab), o un anticuerpo anti-OX40 (por ejemplo, pogalizumab o tavolixizumab), tienen un incremento de la producción de IL-2 en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces en relación a PBMC solo estimuladas con SEA sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana), cuando se evalúa por

métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las personas con experiencia en el arte.

[00199] En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa la producción de IFN γ de un cocultivo de células T humanas y células dendríticas alogénicas en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la producción de IFN γ de un cocultivo de células T humanas y células dendríticas alogénicas sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

[00200] En determinadas formas de realización, un cocultivo de células T humanas y células dendríticas alogénicas en presencia de un anticuerpo descrito en la presente, que se une específicamente a PD-1 humana, tiene un incremento de la producción de IFN γ en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces en relación a un cocultivo de células T humanas y células dendríticas alogénicas sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana), cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las personas con experiencia en el arte.

[00201] En formas de realización específicas, la presente divulgación

provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa la proliferación de células T en por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99%, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la proliferación de células T sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana). En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa la proliferación de células T en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la proliferación de células T sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

[00202] En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa proliferación de células T CD4⁺ o CD8⁺ estimuladas con un anticuerpo anti-CD3 cocultivadas con fluido ascítico de cáncer de ovario en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las

personas con experiencia en el arte, en relación a proliferación de células T CD4+ o CD8+ estimuladas con un anticuerpo anti-CD3 cocultivadas con fluido ascítico de cáncer de ovario sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

[00203] En formas de realización específicas, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humana e incrementa la señalización por NFAT en células reporteras de NFAT-luciferasa que expresan PD-1 cocultivadas con células blanco que expresan PD-L1 en por lo menos aproximadamente 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, cuando se evalúa por métodos descritos en la presente (véanse los Ejemplos, infra) o que son conocidos para las personas con experiencia en el arte, en relación a la señalización por NFAT en células reporteras de NFAT-luciferasa que expresan PD-1 cocultivadas con células blanco que expresan PD-L1 sin ningún anticuerpo o con un anticuerpo no relacionado (por ejemplo, un anticuerpo que no se une específicamente a PD-1 humana).

1.1 Composiciones farmacéuticas

[00204] En la presente se proveen composiciones que comprenden un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente que tienen el grado de pureza deseado en un vehículo, excipiente o estabilizante fisiológicamente aceptable (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Los vehículos, excipientes o estabilizadores no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de

octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tal como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos que 10 residuos aproximadamente); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tal como sodio; complejos de metales (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o agentes tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[00205] En una forma de realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente, y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un transportador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en la presente, y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un transportador farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el anticuerpo es el único ingrediente activo incluido en la composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden ser útiles para inhibir la actividad de PD-1 y tratar una condición, tal como cáncer o una enfermedad infecciosa. En una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica de la presente invención que comprende un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención para usar como medicamento. En otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica

de la presente invención para usar en un método para el tratamiento de cáncer o una enfermedad infecciosa. En otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención para preparar una composición farmacéutica para tratar cáncer o una enfermedad infecciosa.

[00206] Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, soluciones amortiguadoras, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y de dispersión, agentes emulsionantes, secuestrantes o agentes quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuoso incluyen cloruro de sodio para inyecciones, Ringer para inyecciones, dextrosa isotónica para inyecciones, agua estéril para inyecciones, dextrosa y Ringer lactato para inyecciones. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semillas de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de maní. Se deben agregar agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en contenedores de dosis múltiples e incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, metil y propil ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de benzetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Las soluciones amortiguadoras incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y

propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pHt.

[00207] La composición farmacéutica se puede formular para cualquier ruta de administración a un sujeto. Los ejemplos específicos de rutas de administración incluyen las vías intranasal, oral, pulmonar, transdérmica, intradérmica y parenteral. En la presente también se contempla una administración parenteral, caracterizada por una inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. Las preparaciones inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para soluciones o suspensiones en líquidos antes de la inyección o como emulsiones. Los inyectables, las soluciones y las emulsiones también contienen uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se deseara, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tal como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, estabilizantes, mejoradores de la solubilidad y otros agentes similares, tal como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

[00208] Las preparaciones para una administración parenteral de un anticuerpo incluyen soluciones estériles listas para su inyección, productos solubles secos estériles, tal como polvos liofilizados, listos para su combinación con un solvente en el momento del uso, incluyendo tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para su inyección, productos insoluble secos estériles listos para su combinación con un vehículo en el momento del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

[00209] Si se administran por vía intravenosa, los vehículos

adecuados incluyen suero fisiológico o solución amortiguadora salina con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

[00210] Las mezclas tópicas que comprenden un anticuerpo se preparan como se describió para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o semejantes y se puede formular como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendas, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para una administración tópica.

[00211] Un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente se puede formular como un aerosol para una aplicación tópica, tal como mediante inhalación (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, en las cuales se describen aerosoles para la administración de un esteroide de utilidad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular asma, y se incorporan como referencia en su totalidad). Para una administración en el sistema respiratorio estas formulaciones se pueden encontrar en la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para su insuflación, ya sea solo o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán, en una forma de realización, diámetros menores que 50 micrones, en una forma de realización menores que 10 micrones.

[00212] Un anticuerpo anti-CRLA-4 descrito en la presente se puede formular para una aplicación local o tópica, tal como una aplicación tópica a la piel y las membranas mucosas, tal como sobre el ojo, bajo la forma de geles, cremas y lociones y para aplicar sobre el ojo o para aplicaciones intracistéricas intraespinales. La administración tópica se contempla para una administración

transdérmica y también para su administración en los ojos o a mucosas o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del anticuerpo, solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

[00213] Los parches transdérmicos, incluyendo dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, son bien conocidos por los especialistas en el arte y se pueden usar para administrar un anticuerpo. Por ejemplo, dichos parches se divulgan en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6.167.301, 6,024.975, 6,010.715, 5.985,317, 5.983,134, 5.948.433 y 5.860.957, todas las cuales se incorporan como referencia en su totalidad

[00214] En determinadas formas de realización, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se describe en la presente es un polvo liofilizado, que se puede reconstituir para su administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se puede reconstituir y formular como sólidos o geles. El polvo liofilizado se prepara disolviendo un anticuerpo que se describe en la presente, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en un solvente adecuado. En algunas formas de realización, el polvo liofilizado es estéril. El solvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o de la solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que se pueden usar incluyen, a modo de ejemplo, dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El solvente también puede contener una solución amortiguadora, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otra solución amortiguadora similar conocida por los especialistas en el arte, en una forma de realización, a un pH aproximadamente neutro. La posterior filtración estéril de la solución seguido de liofilización bajo condiciones estándar conocidas por los especialistas en el arte provee la formulación deseada. En una forma de

realización, la solución resultante se separará en porciones en viales para la liofilización. Cada vial va a contener una sola dosificación o múltiples dosificaciones del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tales como de entre aproximadamente 4 °C y temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyecciones provee una formulación que se puede utilizar en una administración parenteral. Para la reconstitución, el polvo liofilizado se agrega a agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Dicha cantidad se puede determinar empíricamente.

[00215] Los anticuerpos anti-PD-1 que se describen en la presente y otras composiciones provistas en la presente también se pueden formular para dirigirlos a un tejido, receptor u otro área particular del cuerpo del sujeto a tratar. Muchos de dichos métodos de direccionamiento son bien conocidos por los especialistas en el arte. Todos dichos métodos de direccionamiento están contemplados en la presente para su uso en las composiciones de la presente. Por ejemplos no taxativos de métodos de direccionamiento, véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674, 5.759.542 y 5.709.874, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. En una forma de realización específica, un anticuerpo que se describe en la presente es direccionado a un tumor.

[00216] Las composiciones que se pueden usar para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración, por ejemplo, a través de membranas de filtración estériles.

1.2 Métodos de uso u usos

[00217] En otro aspecto, la presente divulgación provee un método de

tratamiento de un sujeto que emplea los anticuerpos anti-PD-1 divulgados en la presente. Cualquier enfermedad o trastorno en un sujeto que pudiera verse beneficiado con la inhibición de la función del PD-1 puede ser tratado usando los anticuerpos anti-PD-1 divulgados en la presente. Los anticuerpos anti-PD-1 que se divulgan en la presente son de particular utilidad para inhibir la tolerancia del sistema inmunológico a tumores y por lo tanto se puede usar como una inmunoterapia para sujetos con cáncer. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-1 o una composición farmacéutica del mismo divulgada en la presente. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o la composición farmacéutica, como se divulga en la presente. Los cánceres que se pueden tratar con los anticuerpos anti-PD-1 o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente incluyen, a título enunciativo no taxativo, melanoma, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer escamoso de cabeza y cuello), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón a células no pequeñas y cáncer de pulmón a células pequeñas), cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama resistente a herceptina y cáncer de mama resistente trastuzumab-DM1 (T-DM1), cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer colorrectal, sarcoma, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cánceres asociados a HPV, cánceres de la vagina, cánceres de la vulva, cánceres del pene, cánceres del ano, cánceres del recto, cánceres de la orofaringe, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer endometrial, cáncer pancreático, linfoma, y leucemia (por ejemplo, leucemia de personas de edad, leucemia mieloide aguda (AML), y

AML de personas de edad). Por lo tanto, la presente invención se relaciona, en una forma de realización, con un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención para usar como medicamento. En una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención para preparar un medicamento para usar en un método para tratar cáncer en un sujeto, y/o para usar para la inhibición de la tolerancia del sistema inmunológico a los tumores y/o para usar en inmunoterapia para sujetos con cáncer, y/o para usar en un método para incrementar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto. En una forma de realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer escamoso de cabeza y cuello), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón a células no pequeñas and cáncer de pulmón a células pequeñas), cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama resistente a herceptina y cáncer de mama resistente trastuzumab-DM1 (T-DM1), cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer colorrectal, sarcoma, cáncer de vejiga, cáncer cervical, cánceres asociados a HPV, cánceres de la vagina, cánceres de la vulva, cánceres del pene, cánceres del ano, cánceres del recto, cánceres de la orofaringe, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer endometrial, cáncer pancreático, linfoma, y leucemia (por ejemplo, leucemia de personas de edad, leucemia mieloide aguda (AML), y AML de personas de edad).

[00218] Otros cánceres que se pueden tratar con los anticuerpos anti-PD-1 o composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente incluyen, a título enunciativo no taxativo, melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico y melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo,

adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón a células no pequeñas), cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, Enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas que incluyen a leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma de células madres de cerebro, glioma, adenoma de pituitaria, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el ambiente que incluyen a los inducidos por asbestos, cáncer esofágico, cáncer de hígado, malignidades refractarias o recurrentes, cánceres metastásicos, cánceres que expresan PD-L1, y combinaciones de dichos cánceres.

[00219] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PD-1 o una composición farmacéutica con el mismo, según se divulga en la presente. En una forma de realización, en la presente se proveen métodos para prevenir y/o tratar una infección (por ejemplo, una infección

viral, una infección bacteriana, una infección fúngica, una infección por protozoos o una infección por parásitos). La infección prevenida y/o tratada de acuerdo con los métodos puede ser causada por un agente infeccioso identificado en la presente. En una forma de realización específica, un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente o una composición con el mismo es el único agente activo administrado a un sujeto. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente o una composición con el mismo se usa en combinación con intervenciones antiinfecciosas (por ejemplo, antivirales, antibacterianos, antifúngicos o antihelmínticos) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, el uso de dicho anticuerpo para preparar composiciones farmacéuticas, y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención para usar en un método para prevenir y/o tratar una enfermedad infecciosa, más preferiblemente en donde el anticuerpo o composición farmacéutica es el único agente activo que se administra a un sujeto, o en donde el anticuerpo o composición farmacéutica se usa en combinación con intervenciones antiinfecciosas.

[00220] Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar y/o prevenir con los anticuerpos anti-PD-1 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero en un sentido no taxativo, bacterias, parásitos, hongos, protozoos y virus. En una forma de realización específica, la enfermedad infecciosa tratada y/o prevenida mediante los anticuerpos anti-PD-1 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente es causada por un virus. Las enfermedades virales o infecciones virales que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, las que son causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza (por

ejemplo, influenza A o influenza B), varicela, adenovirus, Herpes simplex tipo I (HSV-I), Herpes simplex tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus del sincicio respiratorio, virus del papiloma, virus de papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de paperas, virus de sarampión, virus de rubeola, virus del polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (HIV-II) y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

[00221] Las infecciones bacterianas que se pueden prevenir y/o tratar incluyen infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las enfermedades bacterianas causadas por bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*) que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (antrax), tétano, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *mycobacterium*, pertissus, cólera, plaga, difteria, *Chlamydia*, *S. aureus* y *Legionella*.

[00222] Las enfermedades por protozoos o las infecciones por protozoos causadas por protozoos que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, leishmaniasis, coccidiosis, tripanosomiasis, esquistosomiasis o malaria. Las enfermedades por parásitos o las infecciones por parásitos causadas por parásitos que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, Clamidia y

Rickettsia.

[00223] Las enfermedades por hongos o las infecciones por hongos que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, aquellas causadas por infecciones con *Candida*, zigomycosis, mastitis por *Candida*, tricosporonosis diseminada progresiva con tricosporonemia latente, candidiasis diseminada, paracoccidioidomicosis pulmonar, aspergilosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, meningitis criptocócica, meningoencefalitis coccidioide y vasculitis cefalorraquídeo, infección por *Aspergillus niger*, queratitis por *Fusarium*, micosis de los senos paranasales, endocarditis por *Aspergillus fumigatus*, discondroplasia tibial, vaginitis por *Candida glabrata*, candidiasis orofaríngea, enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X, tiña del pie, candidiasis cutánea, placentitis micótico, tricosporonosis diseminada, aspergilosis broncopulmonar alérgica, queratitis micótica, infección por *Cryptococcus neoformans*, peritonitis fúngica, infección geniculata *Curvularia*, endoftalmitis por estafilococos, esporotricosis y dermatofitosis.

[00224] En determinadas formas de realización, estos métodos además comprenden administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un quimioterapéutico, un radioterapéutico, o un agente contra un punto de control. En determinadas formas de realización, el agente contra un punto de control se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4, un anticuerpo antagonista anti-PD-L1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L2, un anticuerpo antagonista anti-PD-1, un anticuerpo antagonista anti-TIM-3, un anticuerpo antagonista anti-LAG-3, un anticuerpo antagonista anti-CEACAM1, un anticuerpo antagonista anti-TIGIT, un anticuerpo agonista anti-CD137, un anticuerpo agonista anti-ICOS, un anticuerpo agonista anti-GITR, y un anticuerpo

agonista anti-OX40. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4 y un anticuerpo agonista anti-ICOS. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método para tratar cáncer en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-PD-1 o una composición farmacéutica del mismo, como se divulga en la presente, en combinación con un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica del mismo, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón a células no pequeñas (NSCLC), por ejemplo, NSCLC de primera línea), melanoma (por ejemplo, melanoma de primera línea), y cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), por ejemplo, de primera línea SCCHN).

[00225] En una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, el uso de dicho anticuerpo para preparar composiciones farmacéuticas y/o composición farmacéutica de la presente invención para usar en un método de la presente invención, en donde el método además comprende administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional para usar como medicamento. En otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención, y (b) un agente terapéutico adicional para usar en un método para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización adicional, la presente invención se relaciona con una composición

farmacéutica, conjunto de componentes o partes de conjunto de componentes que comprenden (a) un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional. En una forma de realización más preferida, el agente terapéutico adicional es un quimioterapéutico, un radioterapéutico, o un agente contra un punto de control.

[00226] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 se usa en los métodos que se divulgan en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es Ipilimumab desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es Tremelimumab desarrollado por Pfizer y Medimmune. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un Proanticuerpo contra CTLA-4 desarrollado por CytomX y Bristol-Myers Squibb.

[00227] Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-CTLA-4 que se pueden usar en los métodos de tratamiento que se divulgan en la presente se divulgan en las siguientes patentes y solicitudes de patente, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades: Patente de los EE.UU. No. 6.984.720; Patente de los EE.UU. No. 7.411.057; Patente de los EE.UU. No. 7.034.121; Patente de los EE.UU. No. 8.697.845; Patente de los EE.UU. No. 8.518.404; Publicación de los EE.UU. No. US 2009/0123477 A1; Publicación de los EE.UU. No. US 2014/0105914 A1; Publicación de los EE.UU. No. US 2013/0267688 A1; Publicación de los EE.UU. No. US 2016/0145355 A1; Publicación PCT No. WO 2014/207064 A1; y Publicación PCT No. WO 2016/015675 A1.

[00228] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un compuesto que se direcciona contra una o más enzimas inmunomoduladoras tales como IDO (indoleamina-(2,3)-dioxigenasa) y/o TDO (triptófano 2,3-

dioxigenasa). Por lo tanto, en otra forma de realización más preferida, el agente terapéutico adicional es un compuesto que se direcciona contra una o más enzimas inmunomoduladoras, incluso más preferiblemente un inhibidor de la indoleamina-(2,3)-dioxigenasa (IDO). En determinadas formas de realización, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en epacadostat (Incyte Corp; véase, por ejemplo, WO 2010/005958 que se incorpora a modo de referencia en la presente en su totalidad), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), indoximod (NewLink Genetics), y NLG919 (NewLink Genetics). En una forma de realización, el compuesto es epacadostat. En otra forma de realización, el compuesto es F001287. En otra forma de realización, el compuesto es indoximod. En otra forma de realización, el compuesto es NLG919.

[00229] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con una vacuna. La vacuna puede ser por ejemplo, una vacuna peptídica, una vacuna de ADN, o una vacuna de ARN. En determinadas formas de realización, la vacuna es una vacuna antitumoral basada en una proteína de choque térmico o una vacuna con patógenos basada en una proteína de shock de calor. En una forma de realización específica, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con una vacuna antitumoral basada en una proteína de shock de calor. Las proteínas de choque térmico (HSP) constituyen una familia de proteínas altamente conservadas que son ubicuas para todas las especies. Su expresión se puede inducir fuertemente a niveles mucho más altos como resultado de un choque térmico u otras formas de estrés, incluyendo exposición a toxinas, estrés oxidativo o privación de glucosa. Se han clasificado en cinco familias de acuerdo con el peso molecular: HSP-110, -90, -70, -60 y -28. Las HSP suministran péptidos inmunogénicos por la vía de presentación cruzada en las células presentadoras de antígenos (APC), tales como macrófagos y

células dendríticas (DCs), lo cual conduce a la activación de células T. Las HSP funcionan como vehículos chaperones de complejos formadores de péptidos antigénicos asociados a tumores capaces de inducir una inmunidad específica de tumores. Luego de su liberación de las células tumorales moribundas, los complejos de HSP-antígeno son captados por las células presentadoras de antígenos (APC) en donde los antígenos son procesados en péptidos que se unen a moléculas de MHC clase I y clase II lo cual conduce a la activación de células T CD8+ y CD4+ anti-tumorales. La inmunidad generada por los complejos de HSP derivados de preparaciones de tumores está dirigida específicamente contra el único repertorio de péptidos antigénicos expresado por el cáncer de cada sujeto. Por lo tanto, en una forma de realización preferida adicional, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) una vacuna para usar como medicamento, en particular para usar en un método para el tratamiento de cáncer. En otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica, conjunto de componentes o partes de conjunto de componentes que comprenden (a) un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) una vacuna. En una forma de realización adicional preferida, la vacuna es una vacuna antitumoral a base de una proteína de choque térmico o una vacuna antipatogénica a base de una proteína de choque térmico, más preferiblemente una vacuna antitumoral a base de una proteína de choque térmico.

[00230] Un complejo de proteína-péptido de choque térmico (HSPPC) es un complejo de proteína-péptido que consiste en una proteína de choque térmico complejada de manera no covalente con péptidos antigénicos. Los HSPPC generan respuestas inmunológicas tanto innatas como adaptativas. En una forma de realización específica, el o los péptidos antigénicos presentan

antigenicidad para el cáncer bajo tratamiento. Los HSPPC son tomados eficazmente por las APC a través de los receptores de membrana (fundamentalmente CD91) o mediante unión a receptores tipo Toll. La internalización del HSPPC da como resultado una maduración funcional de las APC con producción de quimioquinas y citoquinas lo cual conduce a la activación de células asesinas naturales (NK), monocitos y respuestas inmunológicas mediadas por Th1 y Th-2. En determinadas formas de realización, los HSPPC usadas en los métodos divulgados en la presente comprenden una o más proteínas de choque térmico de la familia hsp60, hsp70 o hsp90 de proteínas de estrés formando complejos con péptidos antigénicos. En determinadas formas de realización, los HSPPC comprenden hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulina o combinaciones de dos o más de los mismos.

[00231] En una forma de realización específica, el complejo peptídico de proteína de choque térmico (HSPPC) comprende proteínas de choque térmico recombinantes (por ejemplo, hsp70 o hsc70) o un dominio de unión a péptido de las mismas complejoado con péptidos antigénicos recombinantes. Las proteínas de choque térmico recombinantes se pueden producir por tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, usando la secuencia de hsc70 humana como se describe en Dworniczak and Mirault, *Nucleic Acid Res.* 15:5181-5197 (1987) y número de acceso a GenBank no. P11142 y/o Y00371, en donde cada una de las cuales se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. En determinadas formas de realización, las secuencias de Hsp70 son como se describe en Hunt and Morimoto *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (19), 6455-6459 (1985) y en número de acceso a GenBank P0DMV8 y/o M11717, cada una de las cuales se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. Los péptidos antigénicos también se pueden preparar por métodos de ADN recombinantes conocidos en el arte.

[00232] En determinadas formas de realización, los péptidos antigénicos comprenden un aminoácido modificado. En determinadas formas de realización, el aminoácido modificado comprende una modificación postraducciona. En determinadas formas de realización, el aminoácido modificado comprende un mimético de una modificación postraducciona. En determinadas formas de realización, el aminoácido modificado es una Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys, o His que se ha fosforilado en un hidroxilo o amina de cadena lateral. En determinadas formas de realización, el aminoácido modificado es un mimético de un aminoácido Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys, o His que se ha fosforilado en un hidroxilo o amina de cadena lateral.

[00233] En una forma de realización específica, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un complejo de proteína-péptido de shock de calor (HSPPC), por ejemplo, un complejo de proteína-péptido de shock de calor-96 (HSPPC-96), para el tratamiento de cáncer. El HSPPC-96 comprende una proteína de shock de calor (Hsp) de 96 kD, gp96, complejada con péptidos antigénicos. El HSPPC-96 es una inmunoterapia contra el cáncer elaborada a partir del tumor de un sujeto y contiene la “huella digital” antigénica del cáncer. En determinadas formas de realización, esta huella digital contiene antígenos únicos que solamente están presentes en las células cancerosas específicas de dicho sujeto particular y la inyección de la vacuna pretende estimular el sistema inmunológico del sujeto para reconocer y atacar cualquier célula con esta huella digital cancerosa específica. Por lo tanto, en otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención en combinación con un complejo peptídico de proteína de choque térmico (HSPPC) para usar como medicamento y/o para usar en un método para el tratamiento de cáncer.

[00234] En determinadas formas de realización, el HSPPC, por ejemplo, el HSPPC-96, es producido a partir de tejido tumoral de un sujeto. En una forma de realización específica, el HSPPC (por ejemplo, HSPPC-96) se produce a partir de un tumor del tipo de cáncer, o una metástasis del mismo, bajo tratamiento. En otra forma de realización específica, el HSPPC (por ejemplo, HSPPC-96) es antólogo para el sujeto bajo tratamiento. En determinadas formas de realización, el tejido tumoral es un tejido tumoral no necrótico. En determinadas formas de realización, se usa por lo menos 1 gramo (por ejemplo, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 gramos) de tejido tumoral no necrótico para producir un régimen de vacuna. En determinadas formas de realización, después de una resección quirúrgica, se congela el tejido tumoral no necrótico antes de su uso en la preparación de vacunas. En algunas formas de realización, el HSPPC, por ejemplo, HSPPC-96, se aísla a partir del tejido tumoral mediante técnicas de purificación, se filtra y se prepara para una vacuna inyectable. En determinadas formas de realización, al sujeto se le administran 6-12 dosis del HSPPC, por ejemplo, HSPPC-96. En dichas formas de realización, las dosis de HSPPC, por ejemplo, HSPPC-96, se pueden administrar semanalmente para las primeras 4 dosis y luego cada dos semanas para 2-8 dosis adicionales.

[00235] Otros ejemplos de HSPPC que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente se divulgan en las siguientes patentes y solicitudes de patente, Patentes de los EE.UU. Nos. 6.391.306; 6.383.492; 6.403.095; 6.410.026; 6.436.404; 6.447.780; 6.447.781 and 6.610.659, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00236] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un

adyuvante. Existen diversos adyuvantes que se pueden usar dependiendo del contexto del tratamiento. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes apropiados incluyen, a título enunciativo no taxativo, a Adyuvante completo de Freund (CFA), Adyuvante Incompleto de Freund (IFA), montanide ISA (adyuvante Seppic incompleto), el sistema adyuvante Ribi (RAS), Titer Max, péptidos de muramilo, Syntex Adjuvant Formulation (SAF), alum (hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio), adyuvantes de sales de aluminio, adyuvantes Gerbu[®], antígeno adsorbido sobre nitrocelulosa, antígeno encapsulado o atrapado, lípido 3 De-O-acilado monofosforilo A (3 D-MPL), oligonucleótidos inmunoestimulantes, ligandos de receptor tipo toll (TLR), ligandos de lectina de unión a manano (MBL), agonistas de STING, complejos inmunoestimulantes tales como saponinas, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX, y otros. Otros adyuvantes incluyen a oligonucleótidos de CpG y moléculas de ARN de doble hebra, tales como poli(A) y poli(U). También se pueden usar combinaciones de los adyuvantes previos. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.645.495; 7.029.678; y 7.858.589, todas las cuales se incorporan en la presente a modo de referencia en sus totalidades. En una forma de realización, el adyuvante que se usa en la presente es QS-21 STIMULON.

[00237] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un agente terapéutico adicional que comprende un TCR. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un TCR soluble. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una célula que expresa un TCR. Por lo tanto, en otra forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo y/o composición farmacéutica de la presente invención en combinación con un agente terapéutico adicional que comprende un TCR para usar como medicamento y/o para usar en un método para el

tratamiento de cáncer.

[00238] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con una célula que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR). En determinadas formas de realización, la célula es una célula T.

[00239] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un anticuerpo mimético de TCR. En determinadas formas de realización, el anticuerpo mimético de TCR es un anticuerpo que se une específicamente a un complejo de péptido-MHC. Para ejemplos no limitantes de anticuerpos miméticos de TCR, véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 9.074.000 y las Publicaciones de los EE.UU. Nos. US 2009/0304679 A1 y US 2014/0134191 A1, todas las cuales se incorporan en la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00240] El anticuerpo anti-PD-1 y el agente terapéutico adicional (por ejemplo, quimioterapéutico, radioterapéutico, agente que se dirige contra punto de control, inhibidor de IDO, vacuna, adyuvante, un TCR soluble, una célula que expresa un TCR, una célula que expresa un receptor de antígeno quimérico, y/o un anticuerpo mimético de TCR) se pueden administrar separadamente, en forma secuencial o en forma concurrente como formas de dosificación separadas. En una forma de realización, un anticuerpo anti-PD-1 se administra por vía parenteral, y un inhibidor de IDO se administra por vía oral.

[00241] Un anticuerpo o composición farmacéutica descrita en la presente se puede administrar a un sujeto por una variedad de rutas. Estas incluyen, a título enunciativo no taxativo, las rutas parenteral, intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, tópica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intravenosa, intratumoral, conjuntival, intraarterial, y subcutánea.

También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante para usar como atomizador. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en la presente se administra por vía subcutánea o por vía intravenosa. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en la presente se administra por vía intraarterial. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en la presente se administra por vía intratumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en la presente se administra a un nódulo linfático que drena tumor.

[00242] La cantidad de anticuerpo o composición que será eficaz en el tratamiento y/o la prevención de una condición dependerá de la naturaleza de la enfermedad y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar.

[00243] La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración y la severidad de la infección o enfermedad causada por el mismo, y se deberá decidir de acuerdo con el buen juicio del especialista y las circunstancias de cada paciente. Por ejemplo, las dosis eficaces también pueden variar dependiendo de los medios de administración, el sitio blanco, el estado fisiológico del paciente (incluyendo edad, peso corporal y estado de salud), de si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas o si tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento se titulan óptimamente para optimizar la seguridad y la eficacia.

[00244] Un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente también se puede usar para ensayar los niveles de proteína PD-1 en una muestra biológica

usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos para las personas con experiencia en el arte, incluyendo a inmunoensayos, tales como el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), inmunoprecipitación, o transferencia Western. Los marcadores conocidos para ensayos con anticuerpos se conocen en el arte e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como iodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In), y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. Dichos marcadores se pueden usar para marcar un anticuerpo descrito en la presente. Como alternativa, se puede marcar un segundo anticuerpo que reconoce a un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente y se puede usar en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 para detectar los niveles de proteína PD-1. Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de la presente invención para la detección *in vitro* de proteína PD-1 humana en una muestra biológica. En una forma de realización adicional, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención, para ensayar y/o detectar los niveles de proteína PD-1 humana en una muestra biológica *in vitro*, preferiblemente en donde el anticuerpo anti-PD-1 se conjuga a un radionúclido o marcador detectable, y/o porta un marcador descrito en la presente, y/o en donde se usa un método inmunohistológico.

[00245] La evaluación del nivel de expresión de la proteína PD-1 tiene por objeto incluir la medición o estimación de manera cualitativa o cuantitativa el nivel de una proteína PD-1 en una primera muestra biológica ya sea directamente (por ejemplo, mediante determinación o estimación del nivel absoluto de la proteína) o relativamente (por ejemplo, por comparación con el nivel de proteína asociado con la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido PD-1 en la primera muestra

biológica se puede medir o estimar y luego comparar con un nivel de proteína PD-1 estándar, donde dicho estándar se toma de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no sufre del trastorno o se determina promediando los niveles de una población de individuos que no sufren del trastorno. Como se podrá apreciar en el arte, una vez que se conoce el nivel “estándar” del polipéptido PD-1, se puede emplear repetidamente como un estándar para comparaciones. Por lo tanto, en una forma de realización adicional, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para ensayar y/o detectar los niveles de proteína PD-1, en particular los niveles de proteína PD-1 humana, en una muestra biológica, que comprende medir cualitativamente o cuantitativamente o estimar el nivel de proteína PD-1, en particular de proteína PD-1 humana, en una muestra biológica, mediante un método inmunohistológico.

[00246] Según se usa en la presente, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto, una línea celular, un tejido u otra fuente de células que potencialmente expresan PD-1. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y de fluidos corporales de animales (por ejemplo, humanos) son bien conocidos en el arte. Las muestras biológicas incluyen células mononucleares de sangre periférica.

[00247] Un anticuerpo anti-PD-1 que se describe en la presente se puede usar en aplicaciones de pronóstico, diagnóstico, monitoreo y selección, incluyendo las aplicaciones *in vitro* e *in vivo* bien conocidas y estándar para el especialista y sobre la base de la presente descripción. Se pueden utilizar ensayos y conjuntos de elementos de pronóstico, diagnóstico, monitoreo y selección para una valoración y evaluación *in vitro* del estado del sistema inmunológico y/o de respuesta inmune para predecir, diagnosticar y monitorear las muestras de pacientes a evaluar, incluyendo aquellas que se sabe o se

sospecha que presentan una disfunción del sistema inmunológico o con respecto a una respuesta del sistema inmunológico, una respuesta de antígeno o una respuesta de vacuna anticipada o deseada. La valoración y evaluación del estado del sistema inmunológico y/o de una respuesta inmune también es de utilidad para determinar la aptitud de un paciente para un estudio clínico de un fármaco o para la administración de un agente quimioterapéutico, o agente radioterapéutico o de un anticuerpo en particular, incluyendo combinaciones de los mismos, versus un agente o anticuerpo que es diferente. Este tipo de monitoreo y valoración de pronóstico y diagnóstico ya está en uso con el empleo de anticuerpos contra la proteína HER2 en el cáncer de mama (HercepTest™, Dako), donde el ensayo también se usa para evaluar a los pacientes para una terapia con anticuerpos utilizando Herceptin®. Las aplicaciones *in vivo* incluyen una terapia celular dirigida y modulación del sistema inmunológico y obtención de imágenes radiológicas de las respuestas inmunológicas. Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-PD-1, el uso de dicho anticuerpo para preparar una composición farmacéutica y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención para usar como diagnóstico. En una forma de realización preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-PD-1, el uso de dicho anticuerpo para preparar una composición farmacéutica y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención para usar en un método para la predicción, diagnóstico y/o monitoreo de un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una disfunción del sistema inmunológico y/o con respecto a una respuesta inmunológica anticipada o deseada, respuesta a antígeno o respuesta a vacuna. En otra forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de anticuerpo anti-PD-1 de la invención, para predecir, diagnosticar y/o monitorear a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una disfunción del sistema inmunológico y/o con respecto a una respuesta del

sistema inmunológico anticipada o deseada, respuesta a antígeno o respuesta a vacuna mediante el ensayo y/o detección de los niveles de la proteína PD-1 humana en una muestra biológica del sujeto *in vitro*.

[00248] En una forma de realización, un anticuerpo anti-PD-1 se puede usar en inmunohistoquímica de muestras de biopsia. Preferiblemente, el método es un método *in vitro*. En otra forma de realización, un anticuerpo anti-PD-1 se puede usar para detectar los niveles de PD-1, o los niveles de células que contienen PD-1 en su superficie de membrana, en donde los niveles se pueden asociar a ciertos síntomas de enfermedad. Los anticuerpos anti-PD-1 que se describen en la presente pueden portar una marca detectable o funcional y/o pueden estar conjugados a un radionúclido o marca detectable. Cuando se usan marcadores fluorescentes, se puede utilizar la microscopia actualmente disponible y análisis de selección celular activado por fluorescencia (FACS) o una combinación de ambos métodos conocidos en el arte para identificar y para cuantificar los miembros específicos de unión. Los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente pueden portar o pueden estar conjugados a un marcador fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen, por ejemplo, sondas reactivas o conjugadas, por ejemplo, Aminocumarina, Fluoresceína y rojo Texas, rótulos de Alexa Fluor, rótulos Cy y rótulos DyLight. Un anticuerpo anti-PD-1 puede portar o se puede conjugar a un marcador radiactivo o radionúclido, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{186}Re . Cuando se usan marcadores radiactivos, se pueden utilizar los procedimientos de conteo actualmente disponibles conocidos en el arte para identificar y cuantificar la unión específica del anticuerpo anti-PD-1 a PD-1 (por ejemplo, PD-1 humana). En el caso en que el marcador sea una enzima, la detección se puede llevar a cabo por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas,

fluorosspectrofotométricas, amperométricas o gasométricas que se usan en el presente que son conocidas en el arte. Esto se puede conseguir mediante el contacto de una muestra o una muestra control con un anticuerpo anti-PD-1 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y PD-1. Cualquier complejo que se forme entre el anticuerpo y PD-1 se detecta y compara en la muestra y en el control. A la luz de la unión específica de los anticuerpos descritos en la presente para PD-1, los anticuerpos se pueden usar para detectar específicamente la expresión de PD-1 sobre la superficie de las células. Los anticuerpos que se describen en la presente también se pueden usar para purificar a PD-1 a través de purificación por inmutaafinidad. También se incluye en la presente un sistema de ensayo que se puede preparar en la forma de un conjunto de componentes, conjunto de componentes o partes de conjunto de componentes de ensayo para el análisis cuantitativo de la extensión de la presencia de, por ejemplo, PD-1 o complejos de PD-1/ ligando de PD-1. El sistema, conjunto de componentes de prueba, conjunto de componentes o partes de conjunto de componentes pueden comprender un componente marcado, por ejemplo, un anticuerpo marcado, y uno o más reactivos inmutaquímicos adicionales.

1.3 Polinucleótidos, vectores y métodos para producir anticuerpos anti-PD-1

[00249] En otro aspecto, en la presente se proveen polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo, (por ejemplo, una región variable de la cadena liviana y/o una región variable de la cadena pesada) que se une específicamente a un antígeno de PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano), y vectores, por ejemplo, vectores que comprenden dichos polinucleótidos para una expresión recombinante en células huésped (por ejemplo, E. coli y células de

mamíferos). En la presente se proveen polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican para una cadena pesada o liviana de cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente, así como vectores que comprenden tales secuencias de polinucleótidos, por ejemplo, vectores de expresión para una expresión eficaz en células huésped, por ejemplo, células de mamífero.

[00250] Según se usa en la presente, un polinucleótido o una molécula de ácido nucleico “aislada” es aquel que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural (por ejemplo, en un ratón o un ser humano) de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Por ejemplo, la frase “sustancialmente libre” incluye preparaciones de polinucleótidos o de moléculas de ácido nucleico que comprenden menos de aproximadamente un 15%, un 10%, un 5%, un 2%, un 1%, un 0,5% o un 0,1% (en particular menos de aproximadamente un 10%) de otro material, por ejemplo, un material celular, medio de cultivo, otras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos y/u otras sustancias químicas. En una forma de realización específica, dichas una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo descrito en la presente están aisladas o purificadas.

[00251] En aspectos particulares, en la presente se proveen polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos, que se unen específicamente a un polipéptido PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) y comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, así como anticuerpos que compiten con estos anticuerpos por la unión a

un polipéptido PD-1 (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) o que se une al mismo epítopo que el epítopo de dichos anticuerpos.

[00252] En determinados aspectos, en la presente se proveen polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana o la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican una cadena liviana que comprende las FR y CDR VL de los anticuerpos descritos en la presente (véase, por ejemplo, las Tablas 3 y 5) o las secuencias nucleotídicas que codifican para una cadena pesada que comprende las FR y CDR de VH de los anticuerpos que se describen en la presente (véase, por ejemplo, las Tablas 2 y 4).

[00253] En la presente también se proveen polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-PD-1 que están optimizados, por ejemplo, mediante optimización de codones/ARN, sustitución con secuencias señal heterólogas y eliminación de elementos inestables del ARNm. Los métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, la cadena liviana, la cadena pesada, el dominio VH o el dominio VL) para una expresión recombinante mediante introducción de cambios de codones y/o eliminación de regiones inhibitoras en el ARNm pueden llevarse a cabo mediante la adaptación consecuente de los métodos de optimización que se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498 todas las cuales se incorporan a la presente como referencia en sus totalidades. Por ejemplo, se pueden mutar los posibles sitios de corte y empalme y los elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o/U) en el ARN sin alterar los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico a fin de aumentar la estabilidad del ARN para la expresión recombinante. Las alteraciones emplean la degeneración del código

genético, por ejemplo, utilizando un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunas formas de realización, puede ser deseable alterar uno o más codones para codificar una mutación conservadora, por ejemplo, un aminoácido similar de estructura química y propiedades y/o función similares al aminoácido original. Dichos métodos pueden aumentar la expresión de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo en por lo menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces o más con relación a la expresión de un anticuerpo anti-PD-1 codificado por polinucleótidos que no fueron optimizados.

[00254] En determinadas formas de realización, una secuencia de polinucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, un dominio VL y/o un dominio VH) descrito en la presente se puede hibridizar con un polinucleótido antisentido (por ejemplo, complementario) de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo (por ejemplo, un dominio VL y/o un dominio VH) descrito en la presente. En formas de realización específicas, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento descrito en la presente se hibridiza bajo condiciones de gran severidad con un polinucleótido antisentido de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo descrito en la presente. En una forma de realización específica, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo descrito en la presente se hibridiza bajo gran severidad, o condiciones de severidad intermedia o baja con un polinucleótido antisentido de una secuencia de nucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento del mismo descrito en la presente. Hay información relativa a las condiciones de hibridación ya descrita, véase, por ejemplo, la publicación de la Solicitud de

Patente de los EE.UU. N°: US 2005/0048549 (por ejemplo, los párrafos 72-73), que se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

[00255] Se pueden obtener los polinucleótidos y se puede determinar la secuencia de nucleótidos de dichos polinucleótidos mediante cualquier método conocido en el arte. Las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente, por ejemplo, los anticuerpos descritos en las Tablaa 1 a 6, y versiones modificadas de estos anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien conocidos en el arte, es decir, se ensamblan codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos particulares de manera tal de generar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Dicho polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier G y col., (1994), *BioTechniques* 17: 242-6 que se incorpora a la presente como reerencia en su totalidad) que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, linealización y ligamiento de estos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

[00256] Como alternativa, se pueden generar un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente a partir del ácido nucleico de una fuente adecuada (por ejemplo, un hibridoma) utilizando métodos bien conocidos en el arte (por ejemplo, PCR y otros métodos de clonación molecular). Por ejemplo, se puede conducir una amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridizables con los extremos 3 'y 5' de una secuencia conocida y utilizando ADN genómico obtenido de células de hibridoma que producen el anticuerpo de interés. Dichos métodos de amplificación de PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena liviana y/o la cadena pesada de un anticuerpo. Estos métodos de

amplificación de PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la región variable de la cadena liviana y/o la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados se pueden clonar en vectores para su expresión en células huésped y para una clonación adicional, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados.

[00257] Si no se dispone de un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, se puede obtener o sintetizar químicamente un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc del anticuerpo o una biblioteca de ADNc generada a partir del anticuerpo, o ácidos nucleicos, preferiblemente ARN poli A+, aislados de cualquier tejido o célula que expresa el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo descrito en la presente) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que se pueden hibridizar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica de la secuencia genética particular a fin de identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR se pueden clonar luego en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en el arte.

[00258] El ADN que codifica los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos anti-PD-1). Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede incluir en

vectores de expresión, que luego son transfectados en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células CHO de CHO GS System™ (Lonza)) o células de mieloma que no producen de otra manera proteínas de inmunoglobulinas, para lograr la síntesis de anticuerpos anti-PD-1 en las células huésped recombinantes.

[00259] Para generar anticuerpos completos, se pueden usar cebadores para PCR que incluyan secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueadora a fin de proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL en clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por los especialistas en el arte, se pueden clonar los dominios VH amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, la región constante gamma 4 humana, y se pueden clonar los dominios VL amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de la cadena liviana, por ejemplo, las regiones constantes kappa o lambda humanas. En determinadas formas de realización, los vectores que se usarán para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para la región variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Después se co-transfectan los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena liviana en líneas celulares a fin de generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas por los especialistas en el arte.

[00260] También se puede modificar el ADN, por ejemplo, por sustitución de la secuencia codificante para los dominios constantes de las cadenas pesadas y livianas humanas en lugar de las secuencias de murinos o

mediante unión covalente de la secuencia codificante de la inmunoglobulina a todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de una inmunoglobulina.

[00261] Se proveen asimismo polinucleótidos que se hibridizan bajo condiciones de hibridación de gran severidad o de severidad intermedia o más baja con los polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente. En formas de realización específicas, los polinucleótidos descritos en la presente se hibridizan bajo condiciones de hibridación de gran severidad, de severidad intermedia o más baja con los polinucleótidos que codifican un dominio VH y/o dominio VL provistos en la presente.

[00262] Las condiciones de hibridación están descritas en el arte y son conocidas por un especialista en el arte. Por ejemplo, una hibridación bajo condiciones severas puede comprender hibridación con un ADN unido a filtros en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6x aproximadamente a 45 °C seguido por uno o más lavados en SSC 0,2x/SDS 0,1% aproximadamente a 50-65 °C; una hibridación bajo condiciones de gran severidad puede comprender una hibridación con un ácido nucleico unido a filtros en SSC 6x aproximadamente a 45 °C seguido por uno o más lavados en SSC 0,1x/SDS 0,2% aproximadamente a 68 °C. La hibridación bajo otras condiciones de hibridación severas es conocida por los especialistas en el arte y se ha descrito, véase, por ejemplo, Ausubel FM y col., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3 que se incorpora como referencia en su totalidad.

[00263] En determinados aspectos, en la presente se proveen células (por ejemplo, células huésped) que expresan (por ejemplo, de manera recombinante) los anticuerpos descritos en la presente que se unen específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) y polinucleótidos y

vectores de expresión relacionados. En la presente se proveen vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos anti-PD-1, o un fragmento, para una expresión recombinante en células huésped, preferiblemente en células de mamífero. También se proveen en la presente células huésped que comprenden dichos vectores para expresar de manera recombinante los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En un aspecto particular, en la presente se proveen procedimientos para producir un anticuerpo descrito en la presente, que comprenden expresar dicho anticuerpo a partir de una célula huésped.

[00264] La expresión recombinante de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa, una cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo o un anticuerpo de cadena simple descrito en la presente) que se une específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) comprende la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Después de obtener un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo o un fragmento de la misma (por ejemplo, las regiones variables de una cadena pesada y/o liviana) descrito en la presente, se puede producir un vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en el arte. Por consiguiente, en la presente se describen métodos para preparar una proteína mediante expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, una cadena liviana o una cadena pesada) que codifica secuencias de nucleótidos. Se pueden emplear métodos que son bien conocidos por los especialistas en el arte para construir los vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican los anticuerpos o fragmentos de

anticuerpo (por ejemplo, una cadena liviana o una cadena pesada) y señales de control de la transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas de ADN recombinante *in vitro*, las técnicas de síntesis y la recombinación genética *in vivo*. También se proveen vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo descrito en la presente, una cadena pesada o liviana de un anticuerpo, una región variable de cadena pesada o liviana de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de la cadena pesada o liviana, ligada operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, las publicaciones Internacionales N°: WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de los EE.UU. N°: 5.122.464 que se incorporan a la presente como referencia en sus totalidades) y las regiones variables del anticuerpo se pueden clonar en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena liviana completa o ambas cadenas pesadas y livianas completas.

[00265] Se puede transferir un vector de expresión a una célula (por ejemplo, una célula huésped) mediante técnicas convencionales y luego se pueden cultivar las células resultantes mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo descrito en la presente o un fragmento del mismo. Por lo tanto, en la presente se proveen células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o liviana del mismo, o un fragmento de la misma, o un anticuerpo de cadena simple descrito en la presente, ligado operativamente a un promotor para la expresión de dichas secuencias en la célula huésped. En determinadas formas de realización, para expresar anticuerpos de cadena doble, los vectores que codifican ambas cadenas pesadas y livianas, de manera individual, se pueden coexpresar en la célula huésped para expresar la molécula de

inmunoglobulina, según se detalla a continuación. En algunas formas de realización, la célula huésped contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto la cadena pesada y la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo. En formas de realización específicas, la célula huésped contiene dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana o una región variable de la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo. En otras formas de forma de realización, una primera célula huésped comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo, y una segunda célula huésped comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana o una región variable de la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente. En formas de realización específicas, la cadena pesada/región variable de la cadena pesada expresada por la primera célula está asociada con una cadena liviana/región variable de la cadena liviana de la segunda célula para formar un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente. En determinadas formas de realización, en la presente se provee una población de células huésped que comprenden dicha primera célula huésped y dicha segunda célula huésped.

[00266] En una forma de realización particular, en la presente se provee una población de vectores que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana/región variable de la cadena liviana de un anticuerpo anti-4-CTLA descrito en la presente, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena

pesada/región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente.

[00267] Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en huéspedes para expresar las moléculas de anticuerpo descritas en la presente (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5.807.715 que se incorpora a la presente comoreferencia en su totalidad). Dichos sistemas de expresión en huéspedes representan vehículos por los cuales se pueden producir y subsiguientemente purificar las secuencias codificantes de interés, pero también representan células que pueden expresar una molécula de anticuerpo que se describe en la presente *in situ*, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas. Estos incluyen pero en un sentido no taxativo, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmidos o ADN de cósmidos que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas de células vegetales (por ejemplo, algas verdes tal como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus en mosaico de la coliflor, CaMV; virus en mosaico de tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contiene las secuencias de codificación del anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS (por ejemplo, COS1 o COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7O3O, HsS78Bst, HeLa y NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-

M, BSC1, BSC40, YB/20 y BMT10) que contienen construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7.5K del virus vaccinia). En una forma de realización específica, las células para expresar los anticuerpos descritos en la presente son células CHO, por ejemplo células CHO de CHO GS System™ (Lonza). En una forma de realización particular, las células para expresar los anticuerpos descritos en la presente son células humanas, por ejemplo, líneas celulares humanas. En una forma de realización específica, el vector de expresión de mamífero es pOptiVEC™ o pADNc3.3. En una forma de realización particular, se usan células bacterianas, tal como *Escherichia coli*, o células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero), en especial para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; y Cockett MI y col., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7 cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia en su totalidad). En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente se producen en células CHO o células NS0. En una forma de realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifica los anticuerpos descritos en la presente que se unen específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) está regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejidos.

[00268] En los sistemas bacterianos, se puede seleccionar ventajosamente una cantidad de vectores de expresión dependiendo del uso

pretendido para la molécula de anticuerpo que está siendo expresada. Por ejemplo, cuando se desea producir una gran cantidad de dicho anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, puede ser deseable emplear vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos de proteínas de fusión que se puedan purificar fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero en un sentido no taxativo, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), en el cual se puede ligar la secuencia de codificación del anticuerpo de manera individual en el vector en marco con la región de codificación de lac Z de modo tal que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia en sus totalidad; y semejantes. Por ejemplo, también se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con la glutatión 5-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de esferas de agarosa-glutatión seguido por elución en la presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de clivaje de trombina o proteasa de factor Xa para que el producto genético blanco clonado pueda ser liberado del grupo GST.

[00269] En un sistema de insectos, se puede usar el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por ejemplo, como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias codificantes del anticuerpo se pueden clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ubicar bajo el control de un promotor del AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

[00270] En las células huésped de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en donde se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación del anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de la transcripción/traducción adenoviral, por ejemplo, la secuencia del promotor tardío y de la directriz tripartita. Este gen quimérico se puede insertar luego en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y tiene la capacidad de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan J & Shenk T (1984) *PNAS* 81(12): 3655-9 que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad). También puede ser necesario usar señales de inicio específicas para una traducción eficiente de las secuencias codificantes del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Aún más, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales exógenas de control de la traducción y los codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Se puede mejorar la eficiencia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción apropiados, etc. (véase, por ejemplo, Bitter G y col., (1987) *Methods Enzymol.*, 153:516-544), que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad).

[00271] Además, se puede elegir la cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa al producto genético de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, clivaje) de los productos

proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Hay diferentes células huésped que tienen características y mecanismos específicos para efectuar el procesamiento de post-traducción y la modificación de las proteínas y los productos genéticos. Las líneas celulares o los sistemas de huéspedes apropiados se pueden elegir a fin de asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para tal fin, se pueden usar células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular apropiada para procesar el transcripto primario, para glicosilar y para fosforilar el producto genético. Dichas células de mamífero huésped incluyen, pero en un sentido no taxativo, células CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma de murino que no produce ninguna cadena de inmunoglobulina endógenamente), CRL7030, COS (por ejemplo, COS1 o COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 y HsS78Bst. En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

[00272] En una forma de realización específica, los anticuerpos descritos en la presente tienen un contenido reducido de fucosa o no contienen fucosa. Dichos anticuerpos se pueden producir usando técnicas conocidas por un especialista en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden expresar en células deficientes o carentes de la capacidad para fucosilar. En un ejemplo específico, se pueden usar líneas celulares con noqueo de ambos alelos de la α 1,6-fucosiltransferasa para producir anticuerpos con un contenido reducido de fucosa. El sistema Potelligent® (Lonza) es un ejemplo de un sistema tal que se puede usar para producir anticuerpos con un contenido reducido de fucosa.

[00273] Para una producción a largo plazo, de gran rendimiento, de las proteínas recombinantes se pueden generar células de expresión estable. Por

ejemplo, se pueden manipular líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente. En formas de realización específicas, una célula provista en la presente expresa de manera estable una cadena liviana/región variable de la cadena liviana y una cadena pesada/región variable de la cadena pesada que se asocian para formar un anticuerpo descrito en la presente.

[00274] En determinados aspectos, en lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por los elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN/polinucleótido extraño, las células manipuladas se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable al plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar foco que a su vez se puede clonar y expandir en líneas celulares. Este método se puede usar ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente o un fragmento del mismo. Dichas líneas celulares manipuladas mediante ingeniería genética pueden ser de particular utilidad para examinar y evaluar las composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

[00275] Se pueden utilizar numerosos sistemas de selección, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, los genes de la timidina quinasa (Wigler M y col, (1977) *Cell* 11 (1): 223-32), de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska EH & Szybalski W (1962) *PNAS* 48(12): 2026-2034) y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy I y col., (1980) *Cell* 22(3): 817-

23) del virus Herpes simple en células tk, hgprt o aprt, respectivamente, todas las cuales se incorporan a la presente como referencia en sus totalidades. Además, se puede usar resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler M y col, (1980) *PNAS* 77 (6): 3567-70; O'Hare K y col., (1981) *PNAS* 78: 1527-1531); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan RC & Berg P (1981) *PNAS* 78 (4): 2072-6); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu & Wu GY CH (1991) *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32: 573-596; Mulligan RC (1993) *Science* 260: 926-932; y Morgan RA & Anderson WF (1993) *Ann Rev Biochem* 62: 191-217; Nabel GJ y Felgner PL (1993) *Trends Biotechnol* 11 (5): 211-5); e hygromycin, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre RF y col, (1984) *Gene* 30 (1-3): 147-56 todas las cuales se incorporan a la presente como referencia en sus totalidades). Se pueden usar de manera rutinaria los métodos conocidos comúnmente en el arte de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel FM y col., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli NC y col., (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1981), que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia

[00276] Se pueden aumentar los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo mediante amplificación del vector (por una revisión, véase Bebbington CR & Hentschel CCG, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, volumen 3 (Academic Press, Nueva York, 1987) que se incorpora a la presente como

referencia en su totalidad). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa el anticuerpo es amplificable, un aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará la cantidad de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse y col GF, (1983) *Mol Cell Biol.* 3: 257-66 que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad).

[00277] La célula huésped se puede co-transfectar con dos o más vectores de expresión descritos en la presente, donde el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena liviana. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. Las células huésped se pueden co-transfectar con diferentes cantidades de dichos dos o más vectores de expresión. Por ejemplo, las células huésped se pueden transfectar con cualquiera de las siguientes relaciones de un primer vector de expresión a un segundo vector de expresión: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 ó 1:50.

[00278] Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifica, y puede expresar, ambos polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. En tales casos, la cadena liviana se debe ubicar antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot NJ (1986) *Nature* 322: 562-565; y Köhler G (1980) *PNAS* 77: 2197-2199 cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia en su totalidad). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y liviana pueden comprender ADNc o ADN genómico. El vector de expresión puede ser monocistrónico o multicistrónico. Una construcción de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, o un

rango de 2-5, 5-10 ó 10-20, de secuencias de genes/nucleótidos. Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico bicistrónica puede comprender, en el orden siguiente, un promotor, un primer gen (por ejemplo, de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente) y un segundo gen (por ejemplo, de la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente). En dicho vector de expresión, la transcripción de ambos genes puede ser dirigida por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen puede ser mediante un mecanismo de barrido dependiente de cap y la traducción del ARNm a partir del segundo gen puede ser por un mecanismo independiente de cap, por ejemplo, mediante un IRES.

[00279] Después de producir una molécula de anticuerpo descrita en la presente mediante expresión recombinante, se puede purificar con cualquier método conocido en el arte para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de una cromatografía en columna de exclusión por tamaño y Proteína A), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos descritos en la presente se pueden fusionar con las secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente o conocidas de otra manera en el arte para facilitar la purificación

[00280] En formas de realización específicas, un anticuerpo descrito en la presente está aislado o purificado. En general, un anticuerpo aislado es aquel que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas que el anticuerpo aislado. Por ejemplo, en una forma de realización particular, la preparación de un anticuerpo descrito en la presente está sustancialmente libre de material celular y/o de precursores químicos. El término “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de un

anticuerpo en las cuales la proteína está separada de los componentes celulares de las células de las cuales fueron aisladas o producidas de manera recombinante. Por consiguiente, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo que comprenden menos que aproximadamente un 30%, un 20%, un 10%, un 5%, un 2%, un 1%, un 0,5% o un 0,1% (en peso seco) de la proteína heteróloga (también denominada “proteína contaminante” en la presente) y/o variantes de un anticuerpo, por ejemplo, diferentes formas modificadas de postraducción de un anticuerpo u otras versiones diferentes de un anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo). Cuando el anticuerpo es producido de manera recombinante, también está sustancialmente libre en general de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20%, un 10%, un 2%, un 1%, un 0,5% o un 0,1% del volumen de la preparación de la proteína. Cuando el anticuerpo se produce mediante síntesis química, en general está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están relacionados con la síntesis de la proteína. Por lo tanto, dichas preparaciones del anticuerpo tienen menos que aproximadamente un 30%, un 20%, un 10% o un 5% (en peso seco) de precursores químicos o de compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una forma de realización específica, los anticuerpos que se describen en la presente están aislados o purificados.

[00281] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) se pueden producir mediante cualquier método conocido en el arte de síntesis de anticuerpos, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinantes. Los métodos que se describen en la presente emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular,

microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y áreas relacionadas propias del conocimiento del arte. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en las referencias citadas en la presente y se explican acabadamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Maniatis T y col., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J y col., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J y col., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B y col., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00282] En una forma de realización específica, un anticuerpo descrito en la presente es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo recombinante) preparado, expresado, creado o aislado mediante cualquier medio que comprende la creación, por ejemplo, mediante síntesis o ingeniería genética, de secuencias de ADN. En determinadas formas de realización, dicho anticuerpo comprende secuencias (por ejemplo, secuencias de ADN o secuencias de aminoácidos) que no existen de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos de un animal o mamífero (por ejemplo, seres humanos) *in vivo*.

[00283] En un aspecto, en la presente se provee un método de

elaboración de un anticuerpo, que se une específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) que comprende cultivar una célula o célula huésped descrita en la presente. En un aspecto determinado, en la presente se provee un método de elaboración de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano), que comprende expresar (por ejemplo, expresar de manera recombinante) el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la misma, usando una célula o una célula huésped descrita en la presente (por ejemplo, una célula o una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente). En una forma de realización particular, la célula es una célula aislada. En una forma de realización particular, se han introducido polinucleótidos exógenos en la célula. En una forma de realización particular, el método comprende además el paso de purificar el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, obtenido a partir de la célula o la célula huésped. Preferiblemente, el método se conduce *in vitro*.

[00284] Los métodos para producir anticuerpos policlonales son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, el capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) quinta edición, Ausubel FM y col, eds, John Wiley and Sons, Nueva York, que se incorpora a la presente comom referencia en su totalidad).

[00285] Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en el arte, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando procedimientos de hibridomas que incluyen aquellos conocidos en el arte y aquellos que se describen, por ejemplo, en Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,

2ª edición (1988); Hammerling GJ, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., (1981) en donde cada una de las mismas se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, no se limita a los anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir de manera recombinante a partir de células huésped que expresan exógenamente un anticuerpo descrito en la presente o un fragmento del mismo, por ejemplo, una cadena liviana y/o una cadena pesada de dicho anticuerpo.

[00286] En formas de realización específicas, un "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, es un anticuerpo producido por una sola célula (por ejemplo, un hibridoma o una célula huésped productora de un anticuerpo recombinante), en donde el anticuerpo se une específicamente al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano), determinada, por ejemplo, mediante un ELISA u otro ensayo de unión a antígenos o competitivo conocido en el arte o en los ejemplos provistos en la presente. En formas de realización particulares, un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En determinadas formas de realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monovalente o un anticuerpo multivalente (por ejemplo, bivalente). En formas de realización particulares, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoespecífico o multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico). Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente se pueden elaborar, por ejemplo, mediante el procedimiento del hibridoma como se describe en Kohler G y Milstein C (1975) *Nature* 256: 495 que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad, o se pueden aislar, por ejemplo, de bibliotecas de fagos utilizando, por ejemplo, las técnicas que se describen en la presente. Otros métodos de preparación de líneas de células clonales y de anticuerpos monoclonales

expresados de este modo son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, el capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) quinta edición, Ausubel FM y col, *supra*).

[00287] Los métodos para producir y detectar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son de rutina y bien conocidos en el arte. Por ejemplo, en el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como una oveja, cabra, conejo, rata, hámster o mono macaco, para generar linfocitos que producen o que pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína (por ejemplo, PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano)) usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan luego con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding JW (Ed), "*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*", páginas 59-103 (Academic Press, 1986) que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad). Además, se puede utilizar una técnica de RIMMS (sitios múltiples de inmunización repetitiva) para inmunizar a un animal (Kilpatrick KE y col, (1997) *Hybridoma* 16: 381-9, que se incorpora a la presente por completo a modo de referencia).

[00288] En algunas formas de realización, los ratones (u otros animales, tales como ratas, monos, burros, cerdos, ovejas, hámster o perros) se pueden inmunizar con un antígeno (por ejemplo, el PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano)) y después de detectar una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan luego con cualquier célula de mieloma apropiada, por ejemplo, células de la línea celular SP20, disponible en la *American Type Culture Collection* (ATTC, Manassas, Virginia, EE.UU.), de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los hibridomas

se seleccionan y clonan mediante dilución limitada. En determinadas formas de realización, se cosechan los nódulos linfáticos de los ratones inmunizados y se fusionan con células de mieloma NS0.

[00289] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma progenitoras no contienen la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), donde dichas sustancias impedirán el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[00290] En formas de realización específicas se emplean células de mieloma que se fusionan de manera eficiente, soportan un nivel de producción alto y estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y que son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Estas líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma de murino, tal como la línea celular NS0 o aquellas que derivan de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, CA, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8.653 disponibles de *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EE.UU.. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987), cada una de las cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia).

[00291] El medio de cultivo en el cual se hacen crecer las células de hibridoma es evaluado por la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos

contra un PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano). La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante métodos conocidos en el arte, por ejemplo, inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

[00292] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar utilizando métodos estándar (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para tal fin incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o RPMI1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascites en un animal.

[00293] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar convenientemente del medio de cultivo o líquido ascites o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía con proteína A-Sepharose, hidroxilapatita, electroforesis sobre gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[00294] Los anticuerpos que se describen en la presente incluyen fragmentos de anticuerpo que reconocen un PD-1 específico (por ejemplo, un PD-1 humano) y se pueden generar mediante cualquier técnica conocida por los especialistas en el arte. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ descritos en la presente se pueden producir mediante el corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Un fragmento Fab corresponde a uno de los dos brazos idénticos de una molécula de anticuerpo y contiene la cadena liviana completa apareada con los dominios VH y CH1 de la cadena

pesada. Un fragmento $F(ab')_2$ contiene los dos brazos de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo unidos mediante enlaces disulfuro en la región bisagra.

[00295] Además, los anticuerpos descritos en la presente, también se pueden generar usando varios métodos de presentación en fagos conocidos en el arte. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de los tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios V_H y V_L se recombinan junto con un conector de scFv por PCR y se clonan en un vector fagémido. El vector se puede introducir en *E. coli* mediante electroporación y luego se infecta *E. coli* con un fago auxiliar. Los fagos que se emplean en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, que incluyen los fagos fd y M13, y los dominios V_H y V_L habitualmente se fusionan por recombinación con el gen III o el gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une un antígeno particular se pueden seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una esfera. Los ejemplos de métodos de expresión en fagos que se pueden usar para elaborar los anticuerpos descritos en la presente incluyen aquellos que se divulgan en Brinkman U y col., (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS y col., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA y col., (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L y col., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; Solicitud PCT N°: PCT/GB91/001134; publicaciones Internacionales N°: WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.698.426, 5,223.409, 5.403.484,

5,580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821,047, 5,571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00296] Según se describió en las referencias precedentes, una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo obtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá más adelante. Las técnicas para producir de manera recombinante los fragmentos de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, también se pueden emplear usando métodos conocidos en el arte tales como los divulgados en la publicación PCT N°: WO 92/22324; Mullinax RL y col., (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H y col., (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; y Better M y col., (1988) *Science* 240: 1041-1043, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00297] En determinadas formas de realización, para generar anticuerpos completos, se pueden usar cebadores para PCR que incluyan secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueadora a fin de proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL a partir de un templado, por ejemplo, clones de scFv. El uso de las técnicas de clonación conocidas por los especialistas en el arte, permite clonar los dominios VH amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de VH y clonar los dominios VL amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de VL, por ejemplo, las regiones constantes kappa o lambda humanas. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Después se co-

transfectan los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena liviana en líneas celulares a fin de generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas por los especialistas en el arte.

[00298] Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual las diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede contener una región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón o rata fusionada a una región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD y col., (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 y 6.331.415, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00299] Un anticuerpo humanizado se puede unir a un antígeno predeterminado y que comprende una región de marco de trabajo que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, una inmunoglobulina de murino). En formas de realización particulares, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, en un sentido no taxativo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas en

el arte que incluyen, pero en un sentido no taxativo, injerto de CDR (Patente Europea N°: EP 239400; publicación Internacional N°: WO 91/09967; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), reformulación de los residuos de superficie [*veneering*] o reemplazo de residuos de superficie [*resurfacing*] (Patentes de Europa N°: EP 592106 y EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM y col., (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; y Roguska MA y col., (1994) *PNAS* 91: 969-973), entremezclado de cadenas (Patente de los EE.UU. N°: 5.565.332), y las técnicas divulgadas, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 6.407.213, Patente de los EE.UU. N°: 5.766.886, la publicación Internacional N°: WO 93/17105; Tan P y col., (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C y col., (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V y col., (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M y col., (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA y col., (1996) *Protein Eng* 9(10): 895 904; Couto JR y col., (1995) *Cancer Res.*, 55(suplemento 23): 5973s-5977s; Couto JR y col., (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 y Pedersen JT y col., (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades. Véase también la publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: US 2005/0042664 A1 (24 de febrero, 2005), que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia

[00300] Los métodos para elaborar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) están descritos, véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 7.951.917; 7.183.076; 8.227.577; 5.837.242; 5.989.830; 5.869.620; 6.132.992 y 8.586.713, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00301] Los anticuerpos de dominio único, por ejemplo, los anticuerpos que no contienen cadenas livianas, se pueden producir mediante

métodos bien conocidos en el arte. Véase Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD y col., (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302; Patente de los EE.UU. N°: 6.005.079; y publicaciones Internacionales N°: WO 94/04678, WO 94/25591 y WO 01/44301, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00302] Además, los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno PD-1 se pueden utilizar a su vez para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" un antígeno usando técnicas bien conocidas por los especialistas en el arte. (Véase, por ejemplo, Greenspan NS & Bona CA (1989) *FASEB J* 7(5): 437-444; y Nissinoff A (1991) *J Immunol* 147(8): 2429-2438, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia.

[00303] En formas de realización particulares, un anticuerpo descrito en la presente, que se une al mismo epítopo del PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) que un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente, es un anticuerpo humano. En formas de realización particulares, un anticuerpo descrito en la presente, que bloquea competitivamente (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) la unión de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, al PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano), es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, se pueden utilizar los ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de una inmunoglobulina humana. En particular, se pueden introducir complejos de genes de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulinas humanas aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, se puede introducir la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas en células madre

embrionarias de ratón además de los genes de la cadena pesada y liviana humanos. Los genes de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina de ratón se pueden volver no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de una inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, una delección homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Luego se crían los ratones quiméricos para producir una descendencia homocigota que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un antígeno (por ejemplo, PD-1). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados usando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de la inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente son sometidos a cambio de clases y mutación somática. Por lo tanto, el uso de una técnica de este tipo, permite producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Por una descripción general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg N & D Huszar (1995) *Int Rev Immunol* 13: 65-93, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. Por una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, la publicación Internacional N°: WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735.; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598 todas las cuales se incorporan a la presente como referencia en sus totalidades. Los ejemplos de ratones que pueden producir anticuerpos humanos

incluyen Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; Patentes de los EE.UU. N°: 6.075.181 y 6.150.184.), Huab-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; Patente de los EE.UU. N°: 5.545.806 y 5.569, 825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) y KM Mouse™ (Medarex/Kirin), todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00304] Los anticuerpos humanos que se unen específicamente a PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano) se pueden elaborar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte incluyendo métodos de presentación en fagos descritos precedentemente usando bibliotecas de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también las Patentes de los EE.UU. N°: 4.444.887, 4.716.111 y 5.885.793; y las publicaciones Internacionales N°: WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, todas las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en sus totalidades.

[00305] En algunas formas de realización, los anticuerpos humanos se pueden producir usando hibridomas de ratón-humano. Por ejemplo, se pueden fusionar linfocitos de sangre periférica humana transformados con el virus de Epstein-Barr (EBV) con células de mieloma de ratón para producir hibridomas de ratón-humano que secretan anticuerpos monoclonales humanos, y estos hibridomas ratón-humano se pueden examinar para determinar las que secretan anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a un antígeno blanco (por ejemplo, PD-1 (por ejemplo, un PD-1 humano)). Dichos métodos son conocidos y se describen en el arte, véase, por ejemplo, Shinmoto H y *col.*, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y y *col.*, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31, cada uno de los cuales se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia.

1.4

Conjuntos de componentes

[00306] También se proveen conjuntos de elementos que comprenden uno o más anticuerpos descritos en la presente, o una composición farmacéutica o conjugados de los mismos. En una forma de realización específica, en la presente se provee un envase o conjunto de elementos farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, tal como uno o más anticuerpos provistos en la presente. En algunas formas de realización, los conjuntos de elementos contienen una composición farmacéutica que se describe en la presente y cualquier agente profiláctico o terapéutico, tales como los que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, los conjuntos de elementos pueden contener un mitógeno de células T, tal como, por ejemplo, fitohemaglutinina (PHA) y/o acetato miristato de forbol (PMA) o un anticuerpo estimulante complejo del TCR, tal como un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Opcionalmente, puede haber una nota asociada con dicho(s) recipiente(s) en el formulario prescrito por una agencia gubernamental reguladora acerca de la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, donde dicha nota refleja la aprobación por la agencia de la elaboración, el uso o la venta para su administración a humanos.

[00307] También se proveen conjuntos de elementos que se pueden usar en los métodos precedentes. En una forma de realización, un conjunto de elementos comprende un anticuerpo descrito en la presente, preferiblemente un anticuerpo purificado, en uno o más recipientes. En una forma de realización específica, los conjuntos de elementos descritos en la presente contienen un antígeno PD-1 sustancialmente aislado (por ejemplo, un PD-1 humano) como control. En otra forma de realización específica, los conjuntos de elementos descritos en la presente comprenden además un anticuerpo control que no reacciona con un antígeno PD-1. En otra forma de realización específica, los

conjuntos de elementos descritos en la presente contienen uno o más elementos para detectar la unión de un anticuerpo a un antígeno PD-1 (por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radioactivo o un compuesto luminiscente; o se puede conjugar un segundo anticuerpo que reconoce al primero con un sustrato detectable). En formas de realización específicas, el conjunto de elementos provisto en la presente puede incluir un antígeno PD-1 producido de manera recombinante o sintetizado químicamente. El antígeno PD-1 provisto en el conjunto de elementos también se puede unir a un soporte sólido. En una forma de realización más específica, el medio de detección del conjunto de elementos descrito precedentemente incluye un soporte sólido al cual se une el antígeno PD-1. Dicho conjunto de elementos también puede incluir un anticuerpo anti-humano o un anticuerpo anti-ratón/rata marcado con informante no unido. En esta forma de realización, se puede detectar la unión del anticuerpo al antígeno PD-1 mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con informante. En una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un conjunto de elementos de la presente invención para evaluar y/o detectar *in vitro* el antígeno PD-1 humano en una muestra biológica.

6. EJEMPLOS

[00308] Los Ejemplos de esta sección (*es decir*, la Sección 6) se ofrecen a modo de ilustración, y no deben interpretarse como limitantes.

6.1 Ejemplo 1: Caracterización de anticuerpos anti-PD-1

[00309] Este ejemplo describe la caracterización de los anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humana, en particular, los anticuerpos llamados AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, y AGEN2047w. AGEN2033w y AGEN2046w comparten la misma secuencia de aminoácidos de región variable

de la cadena pesada (SEQ ID NO: 15) y la misma secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena liviana (SEQ ID NO: 16). AGEN2034w y AGEN2047w comparten la misma secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 17) y la misma secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena liviana (SEQ ID NO: 16). AGEN2033w y AGEN2034w son anticuerpos de IgG₄ humana que contienen una mutación S228P (*es decir*, sustitución de serina por prolina en la posición 228 en relación a la región constante de IgG₄ de tipo salvaje) de acuerdo con el sistema de numeración EU, mientras que AGEN2046w y AGEN2047w son anticuerpos de IgG₁ humana. Adicionalmente, también se caracterizaron tres mutantes de Fc de AGEN2047w: un mutante N297A, un doble mutante S267E/L328F, y un triple mutante S239D/A330L/I332E, numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU.

6.1.1 Unión de anticuerpo a PD-1 expresada por células T activadas

[00310] Los anticuerpos anti-PD-1 AGEN2046w, AGEN2047w, y AGEN2034w se examinaron para ver su unión a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas por citometría de flujo. Se plaquearon PBMC humanas crioconservadas preparadas a partir de células blancas no purificadas (Research Blood Components, Número de catálogo (Cat#) 002) o PBMC de cynomolgus crioconservadas (Worldwide Primates Inc., orden de cliente) a 10⁵ células/pocillo en medio RPMI1640 suplementado con NormocinTM (InvivoGen, Cat# ant-nr-1) y 10% de FBS inactivado con calor (Gibco, Cat# 16140063) en placas de superficie delta NUNCTM de 96 pocillos (NUNCTM). Las células se cultivaron en presencia de 100 ng/ml de Enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA; para las PBMC humanas) (Toxin Technologies, Cat# at101red) o Enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB; para PBMC de cynomolgus) (Toxin Technology, Cat# bt202red) durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂, y 97% de humedad. Las células se

lavarón luego una vez con solución amortiguadora para muestras (PBS + 2% de FBS + 0,09% de azida de sodio) y se incubaron en la oscuridad en hielo con 100 µl de anticuerpos diluidos en forma seriada o controles de isotipo (10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; y 0,0001 µg/ml de AGEN2046w, AGEN2047w, o control de isotipo de IgG₁ humana (LifeTein LLC, Cat# LT12031); o 25; 5; 1; 0,2; 0,04; 0,008; 0,0016; 0,00032; y 0,000064 µg/ml de AGEN2034w o control de isotipo de IgG₄ humana (LifeTein LLC, Cat# LT12034)). Después de 45 minutos, se lavaron las células dos veces con solución amortiguadora para muestras y luego se incubaron con LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies, Cat# L10119), CD4-BV421 (Biolegend, Cat# 317434), y anticuepro de cabra F(ab')₂ anti-IgG+A+M humanas, R-PE (Life Technologies, Cat# AHI1707) durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora para muestras y luego se resuspendieron en solución amortiguadora para muestras y se analizaron con un clitómetro FACS Fortessa (Becton Dickinson). Se seleccionaron las células T CD4+ y se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI).

[00311] Anticuerpos anti-PD-1 AGEN2046w y AGEN2047w unidos a las células T CD4+ humanas activadas (Figura 1A). AGEN2034w unido a células T CD4+ humanas y de cynomolgus activadas (Figuras 1B y 1C).

[00312] Se midió la unión de AGEN2034w a células T humanas primarias activadas nuevamente en un ensayo similar. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas en presencia de 100 ng/ml del péptido SEA durante 5 días y luego se tiñeron con AGEN2034w o un control de isotipo de IgG₄ humana diluidos en forma seriada (50; 10; 2; 0,4; 0,080; 0,016; 0,0032; 0,00064; 0,000128; 0,0000256; 0,00000512; y 0,000001024 µg/ml). Se analizaron las células con un clitómetro FACS Fortessa (Becton Dickinson). Se seleccionaron las células T CD4+ y se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células positivas a AGEN2034w.

[00313] Como se muestra en la Figura 1D, el AGEN2034w se unió a las células T CD4+ humanas primarias activadas.

6.1.2 Ensayo de selectividad del anticuerpo contra PD-1

[00314] Se ensayó la selectividad de AGEN2034w para PD-1 contra proteínas homólogas usando tecnología de arreglo en suspensión.

[00315] En base a su homología de secuencia de aminoácidos con PD-1, las proteínas de la superfamilia de Ig homólogo de *roundabout 2* (ROBO2), homólogo 7 de B7 (B7-H7), y proteína reguladora de señal gamma (SIRPy) se seleccionaron para su evaluación de unión por AGEN2034w usando un ensayo de arreglo en suspensión. ROBO2, B7-H7 y SIRPy se identificaron como homólogos de PD-1 por alineamiento de proteínas aplicando la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; NCBI). La homología de secuencia de PD-1 humana con sus homólogos fue como sigue: PD-1 humana *versus* (vs) ROBO2 humana: 27,9%; PD-1 humana vs SIRPy humana (SIRPG_HUMAN): 24,8%; y PD-1 humana vs B7-H7 humana: 22,6%.

[00316] Se acoplaron las proteínas recombinantes, quimera de ROBO2 humana-Fc (R&D systems, Cat# 3147-RB-050), quimera de B7-H7 humana-Fc (R&D systems, Cat# 8084-B7-050), quimera de SIRPy humana-His (Sino Biologicals, Cat# 11828-H08H), y quimera de PD-1 humana-Fc (R&D systems, Cat# 1086-PD) a microesferas Luminex® (Luminex Corp, Cat# LC10005-01, LC10022-01, LC10046-01, LC10048-01, y LC10059-01) usando química de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) y se incubaron con una titulación de dosis (7,5; 2,5; 0,833; 0,277; ,0,0926; 0,0309; 0,0103; 0,0034; 0,0011; 0,0004; 0,0001; y 0,00004 µg/ml) de AGEN2034w. Luego se agregó un anticuerpo anti- IgG humana marcado con ficoeritrina (PE) para detectar a AGEN2034w. La unión se evaluó por un sistema de detección Luminex® 200.

[00317] El anticuerpo AGEN2034w mostró unión específica a PD-1

humana, y no se observó una unión significativa a ROBO2, B7-H7, o SIRPy a las concentraciones ensayadas (Figura 2).

6.1.3 Actividad de bloqueo de ligando determinada por tecnología de arreglo en suspensión

[00318] Para determinar si los anticuerpos anti-PD-1 bloquean la unión de los ligandos PD-L1 y PD-L2, se llevó a cabo un ensayo de clasificación usando tecnología de arreglo en suspensión. Se agregaron esferas 1200 Luminex® en 5 µl de solución amortiguadora de ensayo (Luminex Corp, Cat# 48 LC10014-48) a cada pocillo de placas de media área de 96 pocillos (Corning, Inc., Cat# 3884). Las esferas se acoplaron con quimera de antígeno PD-1 y PD-1-Fc (R&D systems, Cat# 1086-PD) a través de acoplamiento con amina con los grupos COOH de la superficie de las esferas. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo usando 50 µg/ml de antígeno PD-1 y 1×10^7 esferas por ml. Se usó química de éster estándar NHS para formar los enlaces carbodiimida entre los grupos amina primarios del antígeno y los grupos carboxilo de la superficie de las esferas (Luminex Xmap Cookbook capítulo 3).

[00319] El acoplamiento de antígeno para proteínas es un procedimiento de carbodiimida simple de dos pasos durante el cual se activan primero los grupos carboxilo de las microesferas con reactivo EDC (clorhidrato de 1-Etil-3-[3- dimetilaminopropil]carbodiimida) en presencia de Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) para formar un intermediario sulfo-NHS-éster. El reactivo intermediario se reemplaza luego mediante reacción con la amina primaria de la molécula blanco (anticuerpo, proteína o péptido) para formar un enlace amida covalente. Las esferas acopladas se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-PD-1 por triplicado (concentraciones finales entre 7,5 µg/ml y 0,01 µg/ml por pocillo) durante 1 hora a 20°C y 650 rpm. Los anticuerpos ensayados fueron AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, y AGEN2047w, un

control de isotipo de IgG₁, y un control de isotipo de IgG₄. Subsiguientemente, se agregaron 30 µl de PD-L1-Fc (R&D Systems, Cat# 156-B7) o PD-L2-Fc marcados con R-PE (R&D Systems, Cat# 1224-PL) a una concentración de 1 nM a cada pocillo, dando un volumen total de pocillo de 60 µl (1200 esferas por pocillo y una concentración final de 0,5 nM de PD-L1 o PD-L2 marcados). La marcación del ligando se llevó a cabo usando los conjuntos de componentes para marcado de R-PE (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, Cat# LNK023RPE) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se analizaron las placas usando un sistema Luminex[®] 200 (Millipore). Se contaron 100 esferas por pocillo en 50 µl de volumen de muestra. El potencial de bloqueo de ligando se calculó usando los valores de MFI de la señal de no competencia (100% de unión) del control con solo ligando. Una señal detectable de PE indicó la unión del ligando al antígeno.

[00320] Todos los anticuerpos anti-PD-1 ensayados exhibieron unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 (Figuras 3A-3D).

[00321] La medida de la actividad de bloqueo de ligando de AGEN2034w se repitió de una forma similar. Brevemente, se acopló quimera de PD-1 recombinante-Fc (R&D systems, Cat# 1086-PD) a microesferas Luminex[®] (Luminex Corp, Cat# LC10048-01) usando química de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). Las esferas acopladas a PD-1 se incubaron con una titulación de dosis (entre $4,0 \times 10^{-5}$ y 7,5 µg/ml) de AGEN2034w o un anticuerpo control de isotipo, seguido por incubación de PD-L1-Fc (R&D Systems, Cat# 156-B7) o PD-L2-Fc fluorescentemente marcados (R&D Systems, Cat# 1224-PL). Subsiguientemente, se evaluó la unión de PD-L1 o PD-L2 a las esferas acopladas a PD-1 usando un sistema de detección Luminex[®] 200 y se registró la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI).

[00322] El anticuerpo AGEN2034w bloqueó eficazmente la unión de

PD-1 con sus ligandos, PD-L1 (Figura 3E) y PD-L2 (Figura 3F).

6.1.4 Efecto de los anticuerpos anti-PD-1 sobre PBMC humanas después de estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA)

[00323] La actividad funcional de los anticuerpos anti-PD-1 sobre células T humanas primarias se ensayó luego de la estimulación con SEA. Se plaquearon PBMC humanas crioconservadas preparadas a partir de células blancas no purificadas (Research Blood Components, Cat# 002) a 10^5 células/pocillo en medio RPMI1640 suplementado con NormocinTM (InvivoGen, Cat# ant-nr-1) y 10% de FBS inactivado con calor (Gibco, Cat# 16140063) en placas de superficie delta NUNCCLON de 96 pocillos (NUNCTM). Las células se cultivaron en presencia de una concentración fija (10 $\mu\text{g/ml}$) o cantidades dentro de un rango de dosis de anticuerpos (50; 10; 2; 0,4; 0,08; 0,016; y 0,0032 $\mu\text{g/ml}$) y una cantidad fija de SEA (100 ng/ml, Toxin Technology, Cat# at101red) durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂, y 97% de humedad. Los anticuerpos ensayados fueron AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w, y un control de isotipo de IgG₁. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Se midieron los títulos de IL-2 por electroquimioluminiscencia (MSD).

[00324] Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, los anticuerpos anti-PD-1 AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, y AGEN2047w incrementaron la producción de IL-2 de las PBMC en relación al control de isotipo en presencia de estimulación con SEA.

[00325] Además, se examinó la actividad antagonista de AGEN2034w ya sea solo o en combinación con los anticuerpos anti-CTLA-4, anti-TIGIT, anti-CD137, o anti-OX40 en el ensayo de PBMC primarias que se describió previamente. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas crioconservadas preparadas a partir de células blancas no purificadas (Research Blood Components, Cat #002) con el superantígeno SEA (Toxin Technology, Cat#

at101red) (100 ng/ml en las Figuras 4C, 4D, y 4F; 200 ng/ml en la Figura 4E) y AGEN2034w (10 µg/ml en las Figuras 4C y 4E; 5 µg/ml en la Figura 4D; un rango de dosis de 12; 6; 3; 0,3; 0,03; 0,003; 0,0003; y 0,0001 µg/ml en la Figura 4F) o un anticuerpo control de isotipo en presencia o ausencia de 5 µg/ml de anticuerpo anti-CTLA-4 Ipilimumab (Myoderm) (Figuras 4C), 10 µg/ml de anticuerpo anti-TIGIT pab2197 o pab2196 (Figura 4D), 5 µg/ml de anticuerpo anti-CD137 pab2225 (Figura 4E), o un rango de dosis (12; 6; 3; 0,3; 0,03; 0,003; 0,0003; y 0,0001 µg/ml) de anticuerpo anti-OX40 pab1928 durante 5 días. Se recolectaron los sobrenadantes y se midieron los títulos de IL-2 usando AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat# AL221C). Se generaron los anticuerpos anti-TIGIT pab2197 y pab2196 en base a las secuencias de región variable de los anticuerpos 10A7 y 1F4, respectivamente, provistos en la Publicación de Solicitud de los EE.UU. No. US2013/0251720 (incorporada en la presente a modo de referencia en su totalidad). El anticuerpo anti-CD137 pab2225 se generó en base a las secuencias de región variable del anticuerpo 20H4 provisto en la Patente de los EE.UU. No. 8.137.667 (incorporada en la presente a modo de referencia en su totalidad). El anticuerpo anti-OX40 pab1928 se generó en base a las secuencias de región variable del anticuerpo Hu106-122 provisto en la Publicación de Patente de los EE.UU. No. US 2013/0280275 (incorporada en la presente a modo de referencia en su totalidad). Las secuencias de los anticuerpos anti-TIGIT, anti-CD137, y anti-OX40 se listan en la Tabla 8.

Tabla 8. Secuencias de los anticuerpos anti-TIGIT, anti-CD137, y anti-OX40

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
---------------	-------------	--------------------------

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
66	cadena pesada de pab2197	EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMH WVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTI SRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHN TFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	cadena liviana de pab2197	DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVK ENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTG SGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFG DGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
68	cadena pesada de pab2196	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLM NWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFY AMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	cadena liviana de pab2196	DVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGTHQPPTFGP GTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
70	cadena pesada de pab2225	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYW SWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPGNY DWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWAYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
71	cadena liviana de pab2225	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de aminoácidos
72	cadena pesada de pab1928	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSM HWVRQAPGQGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGR FVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCANPYYDY VSYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV N HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
73	cadena liviana de pab1928	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYLYTGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYYCQQHYSTPRTFGQGKLEI KRSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

[00326] El anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w, ya sea solo o en combinación con anticuerpo anti-CTLA-4 Ipilimumab (Figura 4C), el anticuerpo anti-TIGIT pab2197 o pab2196 (Figura 4D), el anticuerpo anti-CD137 pab2225

(Figura 4E), o el anticuerpo anti-OX40 pab1928 (Figura 4F), aumentaron la producción de IL-2 en PBMC humanas en presencia del superantígeno SEA.

6.1.5 Efecto de la unión del receptor de Fc gamma sobre la actividad antagonista de los anticuerpos anti-PD-1

[00327] En este ejemplo, se examinó el efecto de la unión de FcγR sobre la actividad antagonista de los anticuerpos anti-PD-1.

[00328] Primero, se examinó la actividad antagonista de un anticuerpo de referencia anti-PD-1 en presencia o ausencia de bloqueantes de FcγR. Se plaquearon PBMC humanas crioconservadas preparadas a partir de células blancas no purificadas (Research Blood Components, Cat# 002) a 10^5 células/pocillo en medio RPMI1640 suplementado con NormocinTM (InvivoGen, Cat# ant-nr-1) y 10% de FBS inactivado con calor (Gibco, Cat# 16140063) en placas de superficie delta NUNCCLON de 96 pocillos (NUNCTM). Las células se cultivaron con 100 ng/ml de péptido SEA (Toxin Technology, Cat# at101red) y 10 μg/ml de un anticuerpo de referencia anti-PD-1 o control de isotipo en presencia o ausencia de una concentración fija de un cóctel de bloqueo de receptor Fc que contiene el anticuerpo anti-CD16 (1 μg/ml, R&D systems, Cat# AF1330) y IgG₁ irrelevante (25 μg/ml, LifeTein, Cat# LT12031) durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂, y 97% de humedad. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Se midieron los títulos de IL-2 por electroquimioluminiscencia (MSD).

[00329] El boqueo de FcγR usando un anticuerpo anti-CD16 incrementó la capacidad del anticuerpo de referencia anti-PD-1 para inducir la secreción de IL-2 en este ensayo con PBMC humanas primarias (Figura 5A).

[00330] Se llevó a cabo un estudio similar para examinar el impacto del bloqueo de FcγR sobre la actividad antagonista de AGEN2034w. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas con 100 ng/ml de péptido SEA (Toxin Technology, Cat# at101red), 10 μg/ml de AGEN2034w o un anticuerpo control de isotipo (HEL

IgG₁, LifeTein, Cat# LT12031), y 20 µg/ml de un anticuerpo anti-CD16 (Biolegend, Cat# 302013), un anticuerpo anti-CD32 (eBioscience, Cat# 16-0329-81) que se une tanto a CD32A como a CD32B, un anticuerpo anti-CD64 (Biolegend, Cat# 305016), o un control de isotipo (Biolegend, Cat# 400543) durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂, y 97% de humedad. Se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Se midieron los títulos de IL-2 por electroquimioluminiscencia (MSD).

[00331] En consistencia con el resultado de la Figura 5A, el bloqueo de FcγR usando un anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD32, o anticuerpo anti-CD64, incrementó la secreción de IL-2 inducida por AGEN2034w en este ensayo con PBMC humanas (Figura 5B).

[00332] Luego, se generaron tres mutantes de Fc IgG₁ de AGEN2047w (un mutante N297A, un mutante doble S267E/L328F, y un mutante triple S239D/A330L/I332E, numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU) y se compararon contra AGEN2047w, que comprende una región constante de IgG₁ de tipo salvaje, en el ensayo con SEA sobre PBMC humanas que se describió previamente. Brevemente, se incubaron las PBMC humanas crioconservadas con 100 ng/ml de SEA y 10 µg/ml de los anticuerpos anti-PD-1 AGEN2047w, AGEN2047w-N297A, AGEN2047w-S267E/L328F, AGEN2047w-S239D/A330L/I332E, o los anticuerpos controles de isotipo con las respectivas regiones de tipo salvaje o mutantes de Fc.

[00333] Como se muestra en la Figura 5C, el mutante N297A con unión a FcγR disminuida potenció más la secreción de IL-2. Por el contrario, el mutante doble S267E/L328F y el mutante triple S239D/A330L/I332E, ambos con mayor unión a FcγR, indujeron menos producción de IL-2 que la de AGEN2047w de tipo salvaje.

6.1.6 Efecto de anticuerpo anti-PD-1 en reacción con linfocitos

mezclados

[00334] Luego, el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w se examinó en una reacción con linfocitos mezclados. Se obtuvieron células dendríticas de células CD14+ aisladas (Stemcell Technologies, Cat# 18058) obtenidas de PBMC humanas criopreservadas HLA-A2+ y se diferenciaron primero en presencia de 500 U/ml de IL-4 (Peprotech, Cat# 200-04-20UG) y 1000 U/ml de GM-CSF (Peprotech, Cat# 300-03-20UG) durante 24 horas, y luego en presencia de 1000 U/ml de TNF α (Peprotech, Cat# 300-01A-50UG), 10 ng/ml de IL-1 β (Peprotech, Cat# 200-01B-10UG), 10 ng/ml de IL-6 (Peprotech, Cat# 200-06-20UG), y PGE2 1 μ M (Sigma, Cat# P0409-5MG) durante otras 24 horas. Se cocultivaron 50.000 células pan T purificadas a partir de un donante alogénico de PBMC humanas HLA-A2 por purificación en columna MACS (Miltenyi Biotec, Cat# 130-096-535) con 10.000 células dendríticas en ausencia de anticuerpo o en presencia de 10 μ g/ml de anticuerpo control de isotipo de IgG₄ humana (Biolegend, Cat# 403402) o 10 μ g/ml de AGEN2034w en RPMI (Corning, Cat# 10-040-CM) conteniendo 5% de suero AB humano (Corning, Cat# 35-060-CI) y Penicilina/Estreptomina (Gibco, Cat# 15140-122). Se incubaron los cultivos durante 5 días a 37°C y 5% de CO₂. Se ensayó el sobrenadante para concentraciones de estado estacionario de IFN γ usando AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat# AL217C).

[00335] Como se muestra en la Figura 6, el AGEN2034w indujo la producción de IFN γ en el cocultivo de células T humanas purificadas y células dendríticas alogénicas obtenidas *in vitro*.

6.1.7 Efecto del anticuerpo anti-PD-1 en un ensayo de supresión de fluido ascítico

[00336] En este ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w se examinó para ver su capacidad para revertir la supresión de la proliferación de células T inducida por fluido ascítico de cáncer de ovario. Brevemente, se

marcaron PBMC humanas primarias con CFSE (Biolegend, Cat# 423801) y luego se estimularon con 1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (eBioscience, Cat# 16-0037-85) y 50% volumen/volumen de fluido ascítico de cáncer de ovario en presencia de concentraciones crecientes (entre 0,00000102 y 50 µg/ml) de AGEN2034w o un anticuerpo control de isotipo de IgG₄ (Biolegend, Cat# 317434) entre 4 y 5 días. Las células se inmunotñeron con anticuerpo anti-CD4 humano (Biolegend, Cat# 317434) o anticuerpo anti-CD8 humano (Biolegend, Cat# 344710) y tinción de viabilidad LIVE-DEAD (Life Technologies, Cat# L10119). Se midió la proliferación de las células T CD4⁺ o CD8⁺, como se ilustra por dilución de CFSE, por citometría de flujo usando un BD Fortessa (Becton Dickinson).

[00337] Como se muestra en las Figuras 7A-7C, el cocultivo con fluido ascítico de cáncer de ovario redujo la proliferación de las células T estimuladas con anticuerpo anti-CD3 y esta reducción pudo ser parcialmente revertida por el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w.

6.1.8 Efecto de anticuerpo anti-PD-1 en un ensayo de reportero células Jurkat con reportero de NFAT-luciferasa.

[00338] Además, se usó un ensayo reportero para probar la actividad antagonista de AGEN2034w. Específicamente, en este ensayo, el cocultivo de células blanco que expresan PD-L1 y células reporteras que expresan PD-1 inhibió la expresión de un gen reportero de NFAT-luciferasa en las células reporteras. El bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 mediante un anticuerpo anti-PD-1 pudo reducir la señal inhibitoria, conduciendo a la expresión de luciferasa.

[00339] Brevemente, se cocultivaron células blanco PD-L1⁺ CHOK1 (Promega, Cat# CS187108) con células reporteras NFAT-luc2/PD-1 Jurkat GloResponseTM (Promega, Cat# CS187102) en presencia de concentraciones crecientes (entre 0 y 50 µg/ml) de AGEN2034w o un anticuerpo control de isotipo en medio RPMI-1640 (Corning, Cat# 21-040-CV) suplementado con 2% de FBS

inactivado con calor (Gemini, Cat# 100-106). Después de 6 horas de incubación, se determinó la eficacia de AGEN2034w para revertir la supresión del gen reportero inducida por la unión de PD-L1 a PD-1 por medida de luciferasa usando el Bio-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Cat# G7941).

[00340] Como se muestra en la Figura 8, el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w aumentó la señalización de TCR en forma dependiente de la dosis e este ensayo reportero de Jurkat NFAT-luciferasa.

6.2 Ejemplo 2: Caracterización de anticuerpos adicionales anti-PD-1

[00341] En este ejemplo, se caracterizaron los siguientes seis anticuerpos anti-PD-1 adicionales: AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_pl1_B03, EP11_pl1_B05, EP11_pl1_C02, y EP11_pl1_C03. Las secuencias de cadena pesada variable y cadena liviana variable de estos anticuerpos se divulgan en la Tabla 6.

6.2.1 Análisis de unión y bloqueo de ligando de anticuerpos anti-PD-1

[00342] Se analizó la afinidad de los seis anticuerpos anti-PD-1 descritos previamente por resonancia de plasmón superficial. Los seis anticuerpos se unieron a PD-1 humana recombinante (datos no mostrados).

[00343] Se examinó la actividad de bloqueo de ligando de los seis anticuerpos anti-PD-1 usando tecnología de arreglo en suspensión en un ensayo similar al que se describió en la Sección 6.1.3. Se incubaron las esferas acopladas con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-PD-1 por duplicado (concentraciones finales entre 7,5 µg/ml y 0,01 µg/ml por pocillo) durante 1 hora a 20°C y 650 rpm. Luego se agregó PD-L1-Fc (R&D Systems, Cat# 156-B7) o PD-L2-Fc (R&D Systems, Cat# 1224-PL) marcado con R-PE. Los anticuerpos anti-PD-1 ensayados fueron AGEN2001w, AGEN2002w, EP11_pl1_B03,

EP11_pl1_B05, EP11_pl1_C02, y EP11_pl1_C03. Como se muestra en las Figuras 9A-9F, todos los anticuerpos anti-PD-1 ensayados bloquearon la unión de PD-1 a PD-L1 y PD-L2 en forma dependiente de la dosis.

6.2.2 Efecto de anticuerpo anti-PD-1 sobre PBMC humanas después de estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA)

[00344] Se ensayó la actividad funcional del anticuerpo anti-PD-1 AGEN2002w sobre PBMC humanas en un ensayo similar al que se describió en la Sección 6.1.4. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas crioconservadas preparadas a partir de células blancas no purificadas (Research Blood Components, Cat# 002) en presencia de 10 µg/ml del anticuerpo anti-PD-1 AGEN2002w o un anticuerpo control de isotipo (HEL IgG₁, LifeTein, Cat# LT12031) y 100 ng/ml de péptido SEA (Toxin Technologies, Cat# at101red) durante 4 días a 37°C, 5% de CO₂, y 97% de humedad. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Se midieron los títulos de IL-2 por electroquimioluminiscencia (MSD).

[00345] Como se muestra en la Figura 10, el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2002w incrementó la producción de IL-2 de las PBMC humanas primarias en presencia de estimulación con SEA.

6.3 Ejemplo 3: Mapeo de epitope de anticuerpo anti-PD-1

[00346] Se caracterizó el epitope del anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w usando espectrometría de masa de intercambio hidrógeno-deuterio (HDX) y un análisis Pepscan.

6.3.1 Mapeo de epitope de Fab anti-PD-1 usando espectrometría de masa de intercambio hidrógeno-deuterio

[00347] La interacción de un fragmento Fab de AGEN2034w (AGEN2034w-Fab) con el dominio extracelular de PD-1 humana se estudió por

espectrometría de masa de intercambio hidrógeno-deuterio.

[00348] Se obtuvo PD-1 humana recombinante marcada con His de Sino Biological Inc (Cat# 10377-H08H). Cuando se usó, se preparó PD-1 desglucosilada a partir de 300 µg de proteína PD-1 recombinante marcada con His incubada con 6 µl de PNGasa F a 37°C durante 4 horas. Se preparó fragmento Fab de anticuerpo anti-PD-1 a partir de AGEN2034w por tratamiento con proteasas.

[00349] Para la digestión con pepsina/proteasa XVIII, se desnaturalizaron 4,0 µg de PD-1 humana nativa o desglucosilada en 125 µl de solución amortiguadora control (fosfato 50 mM, cloruro de sodio 100 mM a pH 7,4) por agregado de 135 µl de clorhidrato de guanidina 4 M, solución amortiguadora TCEP 0,85 M (el pH final es 2,5), e incubando la mezcla durante 3 minutos a 11°C. Luego, se sometió la mezcla a una digestión en columna con pepsina/proteasa XVIII usando una columna empaquetada en forma casera con pepsina/proteasa XVIII y los péptidos resultantes se analizaron usando un sistema UPLC-MS compuesto de una Waters Acquity UPLC acoplada a un Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo). Los péptidos se separaron en una columna C8 de 50 mm × 1 mm con un gradiente de 19 min entre 2 y 27% de solvente B (0,2% de ácido fórmico en acetonitrilo). La identificación peptídica se hizo a través de búsqueda de datos de MS/MS contra la secuencia de PD-1 humana con Mascot. La tolerancia de masa para los iones precursores y producto fue de 10 ppm y 0,05 Da, respectivamente.

[00350] Se incubaron 10 µl de PD-1 humana (4,0 µg) o 10 µl de mezcla de PD-1 humana y Fab (4,0 µg: 4,0 µg) con 125 µl de solución amortiguadora de marcación de óxido de deuterio (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 100 mM a pH 7,4) durante 0 segundos, 60 segundos, 600 segundos, y 3600 segundos a 11°C. El intercambio de hidrógeno/deuterio se

extinguió por agregado de 135 μ l de clorhidrato de guanidina 4 M, solución amortiguadora TCEP 0,85 M (el pH final es 2,5). Subsiguientemente, se sometieron las muestras extinguidas a una digestión en columna con pepsina/proteasa XVIII y análisis por LC-MS como se describió previamente. Los espectros de masa se registraron en modo MS solo.

[00351] Los datos crudos de MS se procesaron usando el programa HDX WorkBench, para el análisis de los datos de MS de intercambio H/D (J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521, incorporada en la presente a modo de referencia en su totalidad). Los niveles de deuterio se calcularon usando la diferencia de masa promedio entre el péptido deuterado y su forma nativa (t_0).

[00352] Se consiguió una cobertura de secuencia de 85,4% para la PD-1 humana desglucosilada sin His-tag. La mayoría de los péptidos PD-1 mostraron niveles de deuterio idénticos o similares con y sin la presencia del Fab anti-PD-1 humana. Se halló que varios segmentos peptídicos, sin embargo, tuvieron una incorporación significativamente menor de deuterio ante la unión de Fab. Todos los residuos en este párrafo están numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 74. La PD-1 humana desglucosilada mostró una fuerte reducción de la captación de deuterio ante la unión a Fab anti-PD-1 humana en los residuos 107-122 (SLAPKAQIKESLRAEL) (SEQ ID NO: 75). Adicionalmente, se observó una disminución de la captación de deuterio en los residuos 5-22 (LDSPDRPWNPPTFSPALL) (SEQ ID NO: 76) ante la unión al Fab anti-PD-1 humana.

6.3.2 Mapeo de epítopo de anticuerpo anti-PD-1 usando un análisis Pepscan

[00353] Se midió la unión del anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w contra fragmentos peptídicos de PD-1 sintetizados preparados como un arreglo peptídico unido a chip. El análisis se llevó a cabo en Pepscan Presto BV,

Lelystad, Países Bajos. Brevemente, para reconstruir los epitopes de PD-1 humana, se sintetizó una biblioteca de péptidos. Se obtuvo un soporte de polipropileno funcionalizado con amino mediante injerto con una formulación polimérica hidrofílica de marca registrada, seguido por reacción con t-butiloxicarbonil-hexametilendiamina (BocHMDA) usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) con N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y subsiguiente clivaje de los grupos Boc usando ácido trifluoroacético (TFA). Se usó una síntesis estándar de Fmoc-péptido para sintetizar los péptidos sobre el soporte sólido funcionalizado con amino en estaciones de manipulación de líquidos JANUS modificadas a medida (Perkin Elmer). La síntesis de las imitaciones estructurales se llevó a cabo usando tecnología Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) patentada por Pepscan. La tecnología CLIPS permite estructurar péptidos en bucles simples, bucles dobles, bucles triples, plegamientos tipo hoja, plegamientos tipo hélice y combinaciones de los mismos. La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se ensayó en un ELISA basado en PEPSCAN. Los arreglos peptídicos se incubaron con solución primaria de anticuerpo durante una noche a 4°C. Después de lavar, los arreglos peptídicos se incubaron con un conjugado de anticuerpo de cabra anti-HRP humano (Southern Biotech, Cat# 2010-05) durante una hora a 25°C. Después de lavar, se agregaron el sustrato de la peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etilbenztiazolina sulfonato (ABTS) y 20 µl/ml de H₂O₂ al 3%. Después de una hora, se midió el desarrollo de color y se cuantificó con una cámara con dispositivo acoplado de carga (CCD) y un sistema de procesamiento de imágenes.

[00354] El estudio de Pepscan mostró que el anticuerpo anti-PD-1 AGEN2034w reconoció tramos de la PD-1 humana que incluyen a los residuos 6-15 (DSPDRPWNPP) (SEQ ID NO: 77), los residuos 130-138 (EVPTAHPSP) (SEQ ID NO: 78), y los residuos 106-113 (ISLAPKAQ) (SEQ ID NO: 79), numerados de

acuerdo con SEQ ID NO: 74.

* * *

[00355] El alcance de la invención no está limitado por las realizaciones específicas descritas en la presente. Aún más, varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente serán evidentes para los especialistas en el arte a partir de la descripción precedente y las figuras adjuntas. Se considera que dichas modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[00356] Todas las referencias (por ejemplo, las publicaciones o las patentes o las solicitudes de patente) citadas en la presente se incorporan por completo aquí como referencia y para todo fin en la misma extensión que si se indicara la incorporación de cada referencia (por ejemplo, publicación o patente o solicitud de patente) específicamente e individualmente por completo a modo de referencia para todo fin. Otras formas de realización están incluidas en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Agenus Inc.
Ludwig Institute for Cancer Research Ltd
Memorial Sloan Kettering Cancer Center

<120> ANTICUERPOS ANTI-PD1 Y SUS MÉTODOS DE USO

<130> 584180:AGBW-003PC

<150> US 62/212,851
<151> 2015-09-01

<150> US 62/216,043
<151> 2015-09-09

<150> US 62/257,195
<151> 2015-11-18

<160> 79

<170> PatentIn, versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> AGEN2033w Kabat CDRH1

<400> 1
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> AGEN2033w Kabat CDRH2

<400> 2
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> AGEN2033w Kabat CDRH3

<400> 3
Asn Val Asp Tyr

1

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w Kabat CDRL1

<400> 4
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w Kabat CDRL2

<400> 5
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w Kabat CDRL3

<400> 6
 Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2034w Kabat CDRH3

<400> 7
 Asn Gly Asp His
 1

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w IMGT CDRH1

<400> 8
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w IMGT CDRH2

<400> 9
 Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w IMGT CDRH3

<400> 10
 Ala Ser Asn Val Asp Tyr
 1 5

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w IMGT CDRL1

<400> 11
 Gln Ser Val Ser Ser Asn
 1 5

<210> 12
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w IMGT CDRL2

<400> 12
 Gly Ala Ser
 1

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRL3

<400> 13

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2034w IMGT CDRH3

<400> 14

Ala Ser Asn Gly Asp His
1 5

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2046w VH

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110
Ser

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL

<400> 16

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45


```

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
   50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65                      70                      75                      80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg
                        85                      90                      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100                      105

```

```

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> AGEN2034w, AGEN2047w VH

```

```

<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20                      25                      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                      40                      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                        85                      90                      95
Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                100                      105                      110
Ser

```

```

<210> 18
<211> 440
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> AGEN2033w, cadena pesada, IgG4 S228P

```

```

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20                      25                      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                      40                      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                        85                      90                      95
Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                100                      105                      110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

```

		115					120					125				
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	
	130					135					140					
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
				165					170					175		
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	
				180				185					190			
Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
		195				200						205				
Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
	210					215					220					
Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
225					230					235					240	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
				245					250					255		
Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
			260					265					270			
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
		275					280					285				
Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
	290					295					300					
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	
305					310					315					320	
Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
				325					330					335		
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	
			340					345					350			
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
		355					360					365				
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
	370					375					380					
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
385					390					395					400	
Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	
				405					410					415		
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
			420					425					430			
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
		435					440									

```
<210> 19
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>
<223> AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w, cadena liviana

<400> 19
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr	Glu Phe Thr Leu Thr	Ile Ser Ser Leu Gln Ser		
65	70	75		80
Glu Asp Phe Ala Val	Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr	Asn Asn Trp Pro Arg		
	85	90		95
Thr Phe Gly Gln Gly	Thr Lys Val Glu Ile Lys	Arg Thr Val Ala Ala		
	100	105		110
Pro Ser Val Phe Ile	Phe Pro Pro Ser Asp	Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120		125
Thr Ala Ser Val Val	Cys Leu Leu Asn Asn Phe	Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135		140
Lys Val Gln Trp Lys	Val Asp Asn Ala Leu Gln	Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155		160
Glu Ser Val Thr Glu	Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170		175
Ser Thr Leu Thr Leu	Ser Lys Ala Asp Tyr	Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185		190
Ala Cys Glu Val Thr	His Gln Gly Leu Ser	Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200		205
Phe Asn Arg Gly Glu	Cys			
210				

<210> 20

<211> 440

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2034w, cadena pesada, IgG4 S228P

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly	Val Val Gln Pro Gly Arg
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser	Cys Ala Ala Ser Gly	Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
	20	25
Gly Met His Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly	Lys Gly Leu Glu Trp Val
	35	40
Ala Val Ile Trp Tyr	Asp Gly Ser Asn Lys Tyr	Tyr Ala Asp Ser Val
	50	55
Lys Gly Arg Phe Thr	Ile Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
	85	90
Ala Ser Asn Gly Asp	His Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val Ser
	100	105
Ser Ala Ser Thr Lys	Gly Pro Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Cys Ser
	115	120
Arg Ser Thr Ser Glu	Ser Thr Ala Ala Leu	Gly Cys Leu Val Lys Asp
	130	135
Tyr Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145	150	155
Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
	165	170
Ser Leu Ser Ser Val	Val Thr Val Pro Ser	Ser Ser Leu Gly Thr Lys
	180	185
Thr Tyr Thr Cys Asn	Val Asp His Lys Pro	Ser Asn Thr Lys Val Asp
	195	200
Lys Arg Val Glu Ser	Lys Tyr Gly Pro Pro	Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210		215		220
Pro Glu Phe Leu Gly	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
225		230		240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		235		
		245		255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		250		
		260		270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		265		
		275		285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		280		
		290		300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		295		
305		310		320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		315		
		325		335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		330		
		340		350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		345		
		355		365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		360		
		370		380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		375		
385		390		400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		395		
		405		415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		410		
		420		430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		425		
		435		440

<210> 21

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2046w, cadena pesada, IgG1

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1	5
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	10
	20
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	25
	30
	35
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	40
	45
	50
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	55
	60
65	70
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	75
	80
	85
Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	90
	95
	100
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser	105
	110
	115
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp	120
	125
130	135
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr	140

```

145              150              155              160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
              165              170              175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
              180              185              190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
              195              200              205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
              210              215              220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225              230              235              240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
              245              250              255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
              260              265              270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
              275              280              285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
              290              295              300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305              310              315              320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
              325              330              335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
              340              345              350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
              355              360              365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
              370              375              380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385              390              395              400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
              405              410              415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
              420              425              430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
              435              440

```

<210> 22

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1

<400> 22

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
              20              25              30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
              50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```

				85				90					95				
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser		
			100					105					110				
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser		
		115					120					125					
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp		
	130					135					140						
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr		
145					150					155					160		
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr		
				165					170					175			
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln		
		180						185					190				
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp		
	195					200					205						
Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro		
	210					215					220						
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr		
				245					250					255			
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn		
		260						265					270				
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg		
	275					280						285					
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val		
	290					295					300						
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser		
305					310					315					320		
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys		
				325					330					335			
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu		
		340						345					350				
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
	355						360					365					
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
	370					375					380						
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
385					390					395					400		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
				405					410					415			
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
		420						425					430				
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
		435					440										

<210> 23

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 N297A

<400> 23

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr

			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70						75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
		115					120					125			
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	130					135					140				
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
145				150						155				160	
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
			165						170					175	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
			180					185					190		
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195					200					205			
Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
225				230						235				240	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
			245						250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
		260						265					270		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
	275						280					285			
Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
	290					295					300				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
305				310						315				320	
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
			325						330					335	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
			340					345					350		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
	370					375									

```
<210> 24
<211> 443
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
```

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 S267E/L328F

<400> 24

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
		115					120					125			
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	130					135					140				
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
145					150					155					160
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165					170					175	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
			180					185					190		
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
	195						200					205			
Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
225					230				235					240	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
			260					265					270		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
		275					280					285			
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
	290					295					300				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
305					310					315					320
Asn	Lys	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
			325						330					335	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
			340					345					350		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
	370					375					380				
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
385					390					395					400
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				405					410					415	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr

																420				425				430			
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys																	
		435						440																			
<210> 25																											
<211> 443																											
<212> PRT																											
<213> Secuencia artificial																											
<220>																											
<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 S239D/A330L/I332E																											
<400> 25																											
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg												
1			5						10					15													
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr												
			20					25					30														
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val												
		35					40					45															
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val												
	50					55					60																
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr												
65					70					75				80													
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys												
			85						90					95													
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser												
			100					105					110														
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser												
		115					120					125															
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp												
	130					135					140																
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr												
145					150					155				160													
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr												
			165						170					175													
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln												
			180					185					190														
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp												
		195					200					205															
Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro												
	210					215					220																
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro												
225				230						235				240													
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr												
			245						250					255													
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn												
			260					265					270														
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg												
		275					280					285															
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val												
	290					295					300																
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser												
305					310					315				320													
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr																	

```

          355                      360                      365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          370                      375                      380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385                      390                      395                      400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
          405                      410                      415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          420                      425                      430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435                      440

```

```

<210> 26
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> AGEN2001w VH (BADD426-2614)

```

```

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20                      25                      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35                      40                      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85                      90                      95
Ala Thr Asn Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100                      105                      110
Ser

```

```

<210> 27
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> AGEN2002w VH (BADD426-2615)

```

```

<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20                      25                      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35                      40                      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85                      90                      95

```

Ala Ser Asn Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 28
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> EP11_pl1_B03 (BADD438-2743)

<400> 28
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 29
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> EP11_pl1_B05 (BADD438-2745)

<400> 29
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> EP11_pl1_C02 (BADD438-2746)

<400> 30

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	His	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		

Ser

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EP11_pl1_C03 (BADD438-2747)

<400> 31

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Met	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		

Ser

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRH2 consenso

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4) .. (4)

<223> Tyr o Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> Lys o Glu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)..(16)
 <223> Lys o Met

<400> 32
 Val Ile Trp Xaa Asp Gly Ser Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Xaa
 1 5 10 15
 Gly

<210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDRH3 consenso

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Gly o Val

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> His o Tyr

<400> 33
 Asn Xaa Asp Xaa
 1

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDRH2

<400> 34
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDRH2

<400> 35

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRH2

<400> 36

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

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRH3

<400> 37

Asn Gly Asp Tyr
 1

<210> 38

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH FR1

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH FR1

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH FR2

<400> 40
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH FR3

<400> 41
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
 20 25 30

<210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH FR3

<400> 42
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH FR4

<400> 43
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH FR4

<400> 44

Trp	Gly	His	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL FR1

<400> 45

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys									
				20											

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL FR2

<400> 46

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL FR3

<400> 47

Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20				25					30		

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL FR4

<400> 48

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10

<210> 49
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH consenso sequence

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> Val o Met

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(53)
 <223> Tyr o Phe

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (58)..(58)
 <223> Lys o Glu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (65)..(65)
 <223> Lys o Met

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (98)..(98)
 <223> Ser o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (100)..(100)
 <223> Gly o Val

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (102)..(102)
 <223> His o Tyr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (105)..(105)
 <223> Gln o His

<400> 49
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Xaa Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Xaa Asp Gly Ser Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Xaa Asn Xaa Asp Xaa Trp Gly Xaa Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 50
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 51
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 52
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AGEN2033w, cadena pesada, IgG4 S228P (sin lisina en el extremo C)

<400> 52
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                      25                      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      100                     105                     110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
      115                     120                     125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
      130                     135                     140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
      145                     150                     155                     160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
      165                     170                     175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
      180                     185                     190
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
      195                     200                     205
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
      210                     215                     220
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      225                     230                     235                     240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      245                     250                     255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
      260                     265                     270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
      275                     280                     285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
      290                     295                     300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
      305                     310                     315                     320
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      325                     330                     335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
      340                     345                     350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      355                     360                     365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      370                     375                     380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      385                     390                     395                     400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
      405                     410                     415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      420                     425                     430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
      435

```

```

<210> 53
<211> 439
<212> PRT

```

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> AGEN2034w, cadena pesada, IgG4 S228P (sin lisina en el extremo C)

<400> 53

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70				75						80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100				105					110			
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser
		115				120					125				
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	130					135				140					
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
145				150					155					160	
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
			165					170					175		
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys
			180				185					190			
Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195				200					205				
Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
	210					215				220					
Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
225				230					235					240	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
			245					250				255			
Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
			260					265				270			
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
		275				280						285			
Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
	290					295				300					
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly
305				310						315				320	
Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
			325						330				335		
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr
			340					345				350			
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val						

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser Ser Leu Ser Leu Gly
 435

<210> 54

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2046w, cadena pesada, IgG1 (sin lisina en el extremo C)

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350

Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
	370					375					380				
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
385					390					395					400
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				405					410					415	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
			420					425					430		
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
		435					440								

<210> 55

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 (sin lisina en el extremo C)

<400> 55

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105					110		
Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
		115					120					125			
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	130					135					140				
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
145					150					155					160
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165					170					175	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
			180					185					190		
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
	195					200						205			
Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
225					230				235					240	
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
			260					265					270		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
		275					280						285		

```

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290                      295                      300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305                      310                      315                      320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
                      325                      330                      335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
                      340                      345                      350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                      355                      360                      365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                      370                      375                      380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385                      390                      395                      400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                      405                      410                      415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                      420                      425                      430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                      435                      440

```

<210> 56

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 N297A (sin lisina en el extremo C)

<400> 56

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                      20                      25                      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                      35                      40                      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                      50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                      85                      90                      95
Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                      100                     105                     110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
                      115                     120                     125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130                     135                     140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145                     150                     155                     160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                      165                     170                     175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
                      180                     185                     190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
                      195                     200                     205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210                     215                     220

```

```

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225          230          235          240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
          245          250          255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
          260          265          270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
          275          280          285
Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
          290          295          300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305          310          315          320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
          325          330          335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
          340          345          350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
          355          360          365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
          370          375          380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385          390          395          400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
          405          410          415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
          420          425          430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
          435          440

```

<210> 57

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 S267E/L328F (sin lisina en el extremo C)

<400> 57

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
          100          105          110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
          115          120          125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
          130          135          140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr

```



```

145              150              155              160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
              165              170              175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
              180              185              190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
              195              200              205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
              210              215              220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225              230              235              240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
              245              250              255
Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
              260              265              270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
              275              280              285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
              290              295              300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305              310              315              320
Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
              325              330              335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
              340              345              350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
              355              360              365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
              370              375              380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385              390              395              400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
              405              410              415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
              420              425              430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
              435              440

```

<210> 58

<211> 442

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AGEN2047w, cadena pesada, IgG1 S239D/A330L/I332E (sin lisina en el extremo C)

<400> 58

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
              20              25              30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
              50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
      100                    105                    110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
      115                    120                    125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
      130                    135                    140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
      145                    150                    155                    160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
      165                    170                    175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
      180                    185                    190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
      195                    200                    205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
      210                    215                    220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro
      225                    230                    235                    240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
      245                    250                    255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
      260                    265                    270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
      275                    280                    285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
      290                    295                    300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
      305                    310                    315                    320
Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
      325                    330                    335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
      340                    345                    350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
      355                    360                    365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
      370                    375                    380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
      385                    390                    395                    400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
      405                    410                    415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
      420                    425                    430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      435                    440

```

<210> 59

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

```

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

```

[illegible]

```
<210> 60
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 60															
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 Leu Leu 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 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
    275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    325                      330

```

```

<210> 61
<211> 329
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> IgG1 N297A (sin lisina en el extremo C)

```

```

<400> 61
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 Leu Leu 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 Ala 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
      275      280      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290      295      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305      310      315      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      325

```

```

<210> 62
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> IgG1 N297A

```

```

<400> 62
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 Leu Leu 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 Ala 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
                      275                      280                      285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290                      295                      300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                      310                      315                      320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                      325                      330

```

```

<210> 63
<211> 326
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> IgG4 S228P (sin lisina en el extremo C)

```

```

<400> 63
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1                      5                      10                      15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                      20                      25                      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                      35                      40                      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50                      55                      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                      70                      75                      80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                      85                      90                      95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100                      105                      110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115                      120                      125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130                      135                      140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                      150                      155                      160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                      165                      170                      175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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> 64
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> IgG4 S228P

```

```

<400> 64
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1      5      10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65      70      75      80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
      100      105      110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
      115      120      125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130      135      140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145      150      155      160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
      165      170      175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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 Lys
 325

<210> 65
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 66
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pab2197, cadena pesada

<400> 66
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Thr Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Arg Ser Gly Ser Gly Ile Val Phe Tyr Ala Asp Ala Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser 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	Leu	Leu	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	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> 67
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pab2197, cadena liviana

<400>	67																
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Gly		
1				5					10					15			
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Tyr	Tyr	Ser		
			20					25					30				
Gly	Val	Lys	Glu	Asn	Leu	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln		
		35					40					45					
Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ser	Ile	Arg	Phe	Thr	Gly	Val			
	50					55				60							
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr		
65				70						75				80			
Ile	Thr	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Met	Gly	Gln	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln		
				85					90					95			
Gly	Ile	Asn	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Asp	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile		
		100						105					110				
Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp		

		115					120					125					
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn		
	130					135					140						
Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu		
145					150					155					160		
Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp		
			165						170					175			
Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr		
			180					185					190				
Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser		
	195						200					205					
Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
	210					215					220						

<210> 68

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pab2196, cadena pesada

<400> 68

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Thr		
1				5					10					15			
Ser	Met	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	His		
			20				25					30					
Leu	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	Ile		
		35				40					45						
Gly	Leu	Ile	Ile	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe		
	50					55					60						
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys		
			85					90					95				
Ser	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
			100					105					110				
Thr	Ser	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	Leu	Leu	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> 69

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pab2196, cadena liviana

<400> 69

Asp	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Gly		
1			5					10					15				
Asp	Gln	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	Asn	Ser		
		20						25					30				
Tyr	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Ser	Trp	Tyr	Leu	His	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser		
		35					40					45					
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Phe	Gly	Ile	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	Thr	Ile	Lys	Pro	Glu	Asp	Leu	Gly	Met	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Gly		
			85					90					95				
Thr	His	Gln	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Val	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> 70
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pab2225, cadena pesada

<400> 70
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1      5      10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20      25      30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35      40      45
Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50      55      60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65      70      75      80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85      90      95
Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100     105     110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115     120     125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130     135     140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145     150     155     160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165     170     175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180     185     190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195     200     205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210     215     220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225     230     235     240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245     250     255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260     265     270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275     280     285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290     295     300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305     310     315     320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325     330     335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340     345     350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355     360     365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

```

```

      370                      375                      380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                      390                      395                      400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      405                      410                      415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420                      425                      430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      435                      440                      445
Pro Gly
      450

```

```

<210> 71
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> pab2225, cadena liviana

```

```

<400> 71
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1                      5                      10                      15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20                      25                      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35                      40                      45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                      70                      75                      80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
      85                      90                      95
Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
      100                      105                      110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
      115                      120                      125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
      130                      135                      140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145                      150                      155                      160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
      165                      170                      175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
      180                      185                      190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
      195                      200                      205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210                      215

```

```

<210> 72
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> pab1928, cadena pesada

```

<400> 72

Gln 1	Val	Gln	Leu		Val 5	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu 10	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly 15	Ala
Ser	Val	Lys	Val		Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20						25					30		
Ser	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
	50					55					60					
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	
				70						75					80	
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Val	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	
			100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
		115					120					125				
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
	130					135					140					
Ala 145	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
				150						155				160		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
			165						170					175		
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
			180					185					190			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
		195					200					205				
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
	210					215					220					
Cys 225	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				230						235				240		
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
				245					250				255			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
			260					265					270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
		275					280					285				
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
	290					295					300					
Tyr 305	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				310						315				320		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
				325					330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
			340													

450

<210> 73
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pab1928, cadena liviana

<400> 73
 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 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 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 Leu Tyr Thr 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 74
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30
 Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60
 Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

```

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
      100                      105                      110
Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
      115                      120                      125
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
      130                      135                      140
Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser
145                      150                      155                      160
Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
      165                      170                      175
Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
      180                      185                      190
Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
      195                      200                      205
Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
      210                      215                      220
Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225                      230                      235                      240
Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
      245                      250                      255
Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
      260                      265

```

```

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 75
Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
1                      5                      10                      15

```

```

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 76
Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1                      5                      10                      15
Leu Leu

```

```

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 77
Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro
1                      5                      10

```

```

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 78
Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro

```



```
1                5

<210>  79
<211>  8
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  79
Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln
1                5
```